



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA
PLATA FACULTAD DE CIENCIAS
VETERINARIAS**



**Trabajo de Tesis realizado como requisito para
optar al título de DOCTOR EN CIENCIAS
VETERINARIAS**

Título

**DESARROLLO Y EVALUACIÓN CLÍNICA DE
UNA FORMULACIÓN INTRANASAL DE
BUTORFANOL PARA USO EN EQUINOS.**

AUTORA: Lic. María Inés Velloso

DIRECTORA: Prof. Dra. María Fabiana Landoni, PhD

CODIRECTOR: Dr Alfredo Andreetta

LUGAR DE TRABAJO: Cátedra de Farmacología
General y Clínica. Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional de La Plata.

MIEMBROS DEL JURADO

Dr. Marcos Muriel – FCV-UNLP

Dr. Luis Álvarez – FCV-UNCPBA

Dr. Martin Marcos –FCV-UNLP

La Plata, febrero de 2023

DEDICATORIA

A Felipe

AGRADECIMIENTOS

Primero, quiero agradecer a Fabiana Landoni, mi directora, por su confianza al incorporarme en este proyecto y darme la oportunidad de realizar esta tesis. Estaré eternamente agradecida por su guía, contención y compromiso constante. Su motivación inspiradora y su vocación por la enseñanza lograron ganarse mi admiración.

A mi codirector, Alfredo Andreetta, por su apoyo y colaboración.

A la Facultad de Ciencias Veterinarias por abrirme sus puertas. A CONICET y a la Agencia Nacional de Promoción de la Investigación, el Desarrollo Tecnológico y la Innovación por las becas que me fueron otorgadas para la realización de este trabajo.

A Mariángeles Vita y la cátedra de anatomía, por la enorme ayuda que me dieron durante la primera parte de la tesis.

Al personal de Chacra Experimental Mercedes del Ministerio de Desarrollo Agrario, quienes con mucha amabilidad me brindaron el espacio para poder realizar los ensayos en su ciudad.

A Violeta Ferreira, por su tiempo, consejos y ayuda desinteresada que más de una vez fueron clave para superar inconvenientes que surgieron en el camino.

A Coqui, al cuervo y el personal de la estaciencia "Don Joaquín" por su tiempo, alegría y buena disposición para realizar parte del trabajo.

A Silvina Vaz por sus palabras alentadoras, charlas y sonrisas cotidianas.

A Camilo, por su compañía y amor. Por escucharme, contenerme, por sus consejos y su tiempo.

A mis padres que siempre creyeron en mí. Sin ellos, no sería quien soy.

A mis hermanas y sus familias, amigos y amigas que siempre estuvieron presentes y me alentaron para que siguiera el camino de mi felicidad.

CITAS DE LAS PUBLICACIONES PARCIALES

1. Velloso MI, Andreetta A, Landoni MF. **Puesta a punto un método espectrofotométrico UV/Vis en microplaca para la cuantificación de butorfanol.** Exposición oral en VIII Jornadas de Jóvenes Investigadores – 2018. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de Buenos Aires. 6, 7 y 8 de junio de 2018.
2. Velloso MI, Vita M, Andreetta A, Landoni MF. **Estudio in vitro de la permeabilidad de butorfanol a través de la mucosa nasal equina.** IX Jornadas de Jóvenes Investigadores – 2019. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de Buenos Aires. 6 y 7 de junio de 2019.
3. Velloso MI, Vita M, Andreetta A, Landoni MF. **Efecto de un surfactante no iónico en la permeabilidad de butorfanol a través de mucosa nasal equina.** VII Jornada de Difusión de la investigación y Extensión. Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral. Esperanza, Santa Fe. 13 de noviembre de 2019.

4. Ferreira V, Velloso MI, Vita M, Landoni MF. Artículo de revisión: **Vía intranasal: una alternativa para la administración de fármacos de acción central en equinos**, *Analecta Veterinaria*. 2019; 39(1): p. 10-20. doi.org/10.24215/15142590e033

5. Ferreira V, Velloso MI, Landoni MF. **Bioavailability of butorphanol after intranasal administration to horses**. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*. 2020. ISSN 1311-1477; DOI: 10.15547/bjvm.2019-0051.

6. Velloso MI, Andreetta A, Landoni MF. **Desarrollo y evaluación clínica de una formulación intranasal de butorfanol para uso en equinos**. Encuentro de becarios de la UNLP. Secretaria de Ciencia y técnica de la Universidad Nacional de La Plata. La Plata, 12 de noviembre del 2020 (modalidad e-póster) <https://congresos.unlp.edu.ar/ebec2020/becarie/maria-ines-velloso/>

7. Velloso MI, Andreetta H, Landoni MF. **Effect of two surfactants on in vitro permeation of butorphanol through horse nasal mucosa**. *Uniciencia*. 2021; 35(2): p. 1-10. <https://doi.org/10.15359/ru.35-2.1>

8. Velloso MI, Vita M, Andreeta H, Landoni MF. **Efecto de un surfactante no iónico en la permeabilidad de butorfanol a través de mucosa nasal equina.** Suplemento especial FAVE Sección Ciencias Veterinarias. 2021; 19: p.1-3.

9. Velloso MI, Landoni F. **Penetration Enhancers for Development of Intranasal Formulations for Use in Equines.** International Journal of Equine Science. 2022; 1 (1): p. 16 - 32.

10. Velloso MI, Landoni F. **The use of dodecyltrimethylammonium bromide as penetration enhancer in the development of intranasal formulation in equine.** Current Topics in Biochemical Research (en prensa)

INDICE

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS.....	i
CITAS DE LAS PUBLICACIONES PARCIALES.....	ii
ÍNDICE.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS Y FOTOS.....	xi
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	xiv
ÍNDICE DE TABLAS.....	xv
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	xix
RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	3
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	5
1.1. LA RELACIÓN ENTRE LA VÍA DE ADMINISTRACIÓN DE UN FÁRMACO Y SU FORMULACIÓN.....	5
1.2. ANATOMÍA E HISTOLOGÍA DE LA CAVIDAD NASAL EQUINA.....	8
1.2.1. FUNCIÓN Y ESTRUCTURA DE LA CAVIDAD NASAL.....	8
1.2.2. REGIÓN VESTIBULAR.....	9
1.2.3. REGIÓN RESPIRATORIA.....	9
1.2.4. REGIÓN OLFATORIA.....	10
1.2.5. GLÁNDULAS OLFATORIAS Y EL ÓRGANO VOMERONASAL.....	12
1.3. LA VÍA INTRANASAL.....	13
1.3.1. CARACTERÍSTICAS DE LA VÍA INTRANASAL.....	13
1.3.2. MECANISMOS Y VÍAS DE TRANSPORTE DESDE LA	

CAVIDAD NASAL AL SNC.....	16
1.3.2.1. <i>Vía intracelular</i>	18
1.3.2.2. <i>Vía extracelular</i>	20
1.4. DESARROLLO DE FORMULACIONES UTILIZADAS EN LA VÍA INTRANASAL.....	25
1.4.1. FACTORES QUE AFECTAN LA PERMEABILIDAD DE LOS FÁRMACOS.....	25
1.4.2. EXCIPIENTES MEJORADORES DE LA PENETRACIÓN....	27
1.4.2.1. <i>Ciclodextrinas</i>	28
1.4.2.2. <i>Quitosano y derivados</i>	29
1.4.2.3. <i>Surfactantes</i>	30
1.4.2.4. <i>Ácidos biliares, sus sales y derivados</i>	33
1.4.2.5. <i>Taurodihidrofusidato de sodio</i>	34
1.4.2.6. <i>Fosfolípidos</i>	35
1.5. BUTORFANOL.....	36
2. <u>OBJETIVOS</u>	41
2.1. OBJETIVOS GENERALES.....	41
2.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	41
3. <u>HIPÓTESIS MÁS RELEVANTES</u>	42
4. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	43
4.1. SECCIÓN IN VITRO: ESTUDIO DE LA PENETRABILIDAD DE FORMULACIONES INTRANASALES DE BUTORFANOL EN EQUINOS.....	43
4.1.1. LUGAR DE TRABAJO.....	43

4.1.2. COMPOSICIÓN DE LAS FORMULACIONES.....	43
4.1.3. MÉTODO DE PREPARACIÓN DE LAS FORMULACIONES.....	44
4.1.4. CELDAS DE DIFUSIÓN DE FRANZ.....	45
4.1.5. PUESTA A PUNTO DEL ENSAYO DE PENETRACIÓN IN VITRO A TRAVÉS DE MUCOSA NASAL EQUINA.....	47
4.1.5.1. <i>Ensayo de viabilidad de mucosa nasal equina</i>	47
4.1.6. ENSAYO IN VITRO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA VELOCIDAD DE PENETRACIÓN UTILIZANDO CELDAS DE DIFUSIÓN DE FRANZ.....	49
4.1.7. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO	51
4.1.7.1. <i>Metodología y preparación del material</i>	51
4.1.7.2. <i>Cálculos y estadística</i>	53
4.1.8. DOSAJE DE LAS CONCENTRACIONES DE BUTORFANOL DE LAS MUESTRAS OBTENIDAS EN LOS ESTUDIOS DE PENETRACIÓN IN VITRO.....	54
4.1.9. CÁLCULO DE LOS COEFICIENTES Y VELOCIDADES DE PERMEABILIDAD.....	56
4.1.9.1. <i>Cálculo de parámetros</i>	56
4.1.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS COEFICIENTES Y VELOCIDADES DE PERMEABILIDAD.....	59
4.2. SECCIÓN IN VIVO: Parte I: DESCRIPCIÓN DE LA DISPOSICIÓN PLAMÁTICA DE BUTORFANOL TRAS LA ADMINISTRACIÓN INTRANASAL E INTRAVENOSA DE LA	

FORMULACIÓN DESARROLLADA.....	60
4.2.1. LUGAR DE TRABAJO.....	60
4.2.2. FORMULACIÓN.....	60
4.2.3. ESTUDIO DE LA DISPOSICIÓN PLASMÁTICA DEL BUTORFANOL TRAS SU ADMINISTRACIÓN INTRANASAL E INTRAVENOSA EN EQUINOS.....	61
4.2.4. DOSAJE DE LAS MUESTRAS OBTENIDAS DEL ENSAYO DE DISPOSICIÓN PLASMÁTICA TRAS APLICACIÓN INTRANASAL E INTRAVENOSA DE BUTORFANOL.....	64
4.2.4.1. <i>Curva de calibración</i>	64
4.2.4.2. <i>Dosaje de las muestras</i>	65
4.2.5. ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO.....	66
4.3. SECCIÓN IN VIVO. Parte II: EVALUACIÓN CLÍNICA DEL EFECTO ANALGÉSICO TRAS LA ADMINISTRACIÓN INTRANASAL DE LA FORMULACIÓN DESARROLLADA.....	68
4.3.1. LUGAR DE TRABAJO.....	68
4.3.2. FORMULACIÓN.....	68
4.3.3. ESTUDIO DE LA EFICACIA ANALGÉSICA DE BUTORFANOL TRAS SU ADMINISTRACIÓN INTRANASAL E INTRAVENOSA EN EQUINOS.....	69
4.3.4. MEDICIÓN DEL TIEMPO DE LATENCIA DEL REFLEJO CORNEAL.....	70
4.3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	71
5. <u>RESULTADOS</u>	73

5.1. SECCIÓN IN VITRO: ESTUDIO DE LA PENETRABILIDAD DE FORMULACIONES INTRANASALES DE BUTORFANOL EN EQUINOS.....	73
5.1.1. PUESTA A PUNTO DEL ENSAYO DE PENETRACIÓN IN VITRO A TRAVÉS DE MUCOSA NASAL EQUINA.....	73
5.1.1.1. <i>Ensayo de viabilidad de mucosa nasal equina</i>	73
5.1.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO.	75
5.1.3. ENSAYO IN VITRO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA VELOCIDAD DE PENETRACIÓN UTILIZANDO CELDAS DE DIFUSIÓN DE FRANZ.....	77
5.1.3.1. <i>Formulación control</i>	77
5.1.3.2. <i>Formulación I</i>	80
5.1.3.3. <i>Formulación II</i>	82
5.1.3.4. <i>Formulación III</i>	84
5.2. SECCIÓN IN VIVO. Parte I: ESTUDIO DE LA DISPOSICIÓN PLASMÁTICA DE BUTORFANOL TRAS LA ADMINISTRACIÓN INTRANASAL DE LA FORMULACIÓN DESARROLLADA.....	92
5.2.1. ESTUDIO DE LA DISPOSICIÓN PLASMÁTICA DEL BUTORFANOL TRAS SU ADMINISTRACIÓN INTRANASAL E INTRAVENOSA EN EQUINOS.....	92
5.3. SECCIÓN IN VIVO. Parte II: EVALUACIÓN CLÍNICA DEL EFECTO ANALGÉSICO TRAS LA ADMINISTRACIÓN INTRANASAL DE LA FORMULACIÓN DESARROLLADA.....	100
5.3.1. ESTUDIO DE LA EFICACIA ANALGÉSICA DE	

BUTORFANOL TRAS SU ADMINISTRACIÓN INTRANASAL E INTRAVENOSA EN EQUINOS.....	100
6. <u>DISCUSIÓN</u>	108
7. <u>CONCLUSIONES</u>	132
8. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	135

INDICE DE FIGURAS Y FOTOS

N°1: Región respiratoria de la cavidad nasal. El epitelio descansa sobre una lámina propia y se compone por las células ciliares, basales, caliciformes y de sostén que se unen entre sí mediante uniones estrechas.....	10
N°2: Región olfatoria de la cavidad nasal. El epitelio se compone por tres clases de células: neuronales olfatorias, basales y de sostén. El epitelio olfatorio descansa sobre la lámina propia y ella sobre la placa cribiforme.....	12
N° 3: Sinopsis de las vías de transporte que puede seguir un fármaco luego de su administración intranasal.....	17
N°4: Mecanismos de pasaje de sustancias desde la cavidad nasal al SNC. La sustancia se une a un receptor y es internalizada, por ejemplo, por endocitosis mediada por receptor. Luego viaja a través de la célula neuronal olfatoria hacia el bulbo olfatorio. Otra posibilidad es que el fármaco viaje mediante vía paracelular o mediante transporte transcelular hacia la lámina propia. A partir de allí la sustancia puede, (1) ser absorbida por los vasos sanguíneos locales que llegan a la circulación (Vía sistémica) (2) ser absorbida por los vasos linfáticos y ser drenada hacia los ganglios linfáticos cervicales profundos del cuello (3) la sustancia puede utilizar los espacios perineurales entre las células de envoltura olfatoria y los fibroblastos del nervio olfatorio para viajar asociada a los nervios olfatorios al bulbo olfatorio.	

Después de atravesar la placa cribosa, la sustancia puede llegar también al líquido cefalorraquídeo y distribuirse por las diferentes regiones del cerebro.....	23
N°5: (a) Esquema de la estructura química de la molécula de un surfactante catiónico (cetrimida) (b) Esquema de la estructura química de la molécula de un surfactante aniónico (dodecil sulfato de amonio) (c) Esquema de la estructura química de un surfactante no iónico (Tween 80) (d) Esquema de la estructura química de un surfactante zwitterion (fosfolípido de huevo).....	32
N°6: Estructura de los ácidos biliares. El núcleo esteroide consiste en cuatro anillos (A, B, C y D). El lado cóncavo es hidrofílico y el lado convexo, hidrofóbico.....	33
N°7: Estructura química del tartrato de butorfanol.....	37
N°8: (A) Equipo utilizado en los ensayos. Seis celdas de Franz (asentadas sobre planchas termo-magnéticas) conectadas entre sí y a un baño térmico (B) Celda de Franz desmontada. 1: Cámara aceptora; 2: Cámara donora; 3: Buzo magnético; 4: Arandela plana de plástico; 5: Tuercas mariposas de hierro; 6: Tapones de vidrio de los brazos de los compartimentos; (C) Celda Franz montada. 1: Cámara donora; 2: Cámara aceptora; 3: Mucosa nasal equina; 4: Desprendimiento o tubuladura de la cámara donora; 5: Desprendimiento o tubuladura de la cámara aceptora; 6: Plancha de agitación magnética; 7: Camisa de agua.....	47

N°9: Equino con la vena yugular izquierda cateterizada para la toma de muestras sanguíneas.....	62
N° 10: A) 1: Actuador nasal; 2: Recipiente donante; 3 Bomba spray monodosis calibrada en 200 µl/disparo, (Coster Packaging, Argentina) B) Dispositivo utilizado para la administración IN de butorfanol.....	63
N°11: Inducción del reflejo corneal mediante estímulo mecánico (hisopo).....	71
N°12: Estructura histológica de mucosas equinas con distintos tratamientos de conservación.....	74
N°13: Estructura histológica de mucosa fresca equina tras su contacto por 2 horas con el vehículo de la formulación IV que conteniendo cloruro de bencetonio a la concentración de 0,03%.....	75

INDICE DE GRÁFICOS

N°1: Curvas cantidad acumulada de butorfanol administrado a la dosis de 24,4 mg/ cm ² en función del tiempo permeada a través de mucosa nasal respiratoria y olfatoria equina para las cuatro formulaciones testeadas.....	88
N°2: Concentración plasmática (media ± DS) en función del tiempo de butorfanol tras su administración IV e IN a equinos a la dosis de 0,05 mg/kg (n=4).....	95
N° 3: Tiempo de latencia del reflejo corneal tras la administración de vehículo, butorfanol IV y butorfanol IN a la dosis de 0.05 mg/kg (n=3).....	106
N°4: Tiempos de latencia del reflejo corneal normalizado por basal tras la administración del vehículo, butorfanol IV y butorfanol IN a la dosis de 0.05 mg/kg (n=3). Inbox: áreas bajo la curva % de cambio desde basal vs tiempo.....	107

INDICE DE TABLAS

N°1: Composición de las formulaciones desarrolladas (g/100 ml de agua destilada).....	44
N°2: Composición de la solución de Hanks (g/l) utilizada para el descongelado de mucosa nasal.....	49
N°3: Cálculos para la obtención de las curvas cantidad acumulativa de butorfanol sobre área de difusión ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) en función del tiempo (h) para una porción de mucosa equina, de una formulación.....	58
N°4: Ordenadas al origen, pendientes, r y r^2 de las rectas obtenidas en los gráficos absorbancias corregidas en función de la concentración.....	76
N°5: Pendientes, ordenadas al origen, r^2 y r obtenidos de la regresión lineal de la curva cantidad acumulativa de butorfanol sobre área de difusión en función del tiempo utilizando la formulación control (n= 2 olfatorias; 2 respiratorias).....	78
N° 6: Promedios, desvíos estándar (DS) y coeficientes de variación porcentual (CV%) de J_{ss} , K_p y t_{lag} de las regiones olfatoria y respiratoria de la mucosa nasal equina utilizando la formulación control.....	79
N°7: Pendientes, ordenadas al origen, r^2 y r obtenidos de la regresión lineal de la curva cantidad acumulativa de butorfanol sobre área de difusión en función del tiempo utilizando FI (n= 4 olfatorias; 2 respiratorias).....	80

N°8: Promedios, desvíos estándar (DS) y coeficientes de variación porcentual (CV%) de J_{ss} , K_p y t_{lag} de las regiones olfatoria y respiratoria de la mucosa nasal equina utilizando FI.....	81
N°9: Pendientes, ordenadas al origen, r^2 y r obtenidos de la regresión lineal de la curva cantidad acumulativa de butorfanol sobre área de difusión en función del tiempo utilizando FII (n= 3 respiratoria; 3 olfatoria).....	82
N° 10: Promedios, desvíos estándar (DS) y coeficientes de variación porcentual (CV%) de J_{ss} , K_p y t_{lag} de las regiones olfatoria y respiratoria de la mucosa nasal equina utilizando FII.....	83
N° 11: Pendientes, ordenadas al origen, r^2 y r obtenidos de la regresión lineal de la curva cantidad acumulativa de butorfanol sobre área de difusión en función del tiempo utilizando FIII (n= 3 respiratorias; 2 olfatorias).....	84
N° 12: Promedios, desvíos estándar (DS) y coeficientes de variación porcentual (CV%) de J_{ss} , K_p y t_{lag} de las regiones olfatoria y respiratoria de la mucosa nasal equina utilizando FIII.....	85
N°13: Parámetros de permeabilidad in vitro de butorfanol a través de la mucosa nasal equina (promedio \pm DS) utilizando celdas de difusión de Franz para las cuatro formulaciones testeadas.....	87

N°14: Concentraciones plasmáticas (ng/ml) de butorfanol, promedios y desvíos estándar para cada tiempo de muestreo luego de la administración IV de butorfanol a la dosis de 0,05 mg/kg (n=4).....	96
N°15: Concentraciones plasmáticas (ng/ml) de butorfanol, promedios y desvíos estándar para cada tiempo de muestreo luego de la administración IN de butorfanol a la dosis de 0,05 mg/kg (n=4).....	97
N°16: Parámetros cinéticos de butorfanol tras su administración IV en equinos a la dosis de 0,05 mg/kg aplicando un modelo no compartimental (n=4).....	98
N°17: Parámetros cinéticos de butorfanol tras su administración IN en equinos a la dosis 0,05 mg/kg aplicando un modelo no compartimental (n=4).....	99
N°18: Medias, desvíos estándar y coeficientes de variación porcentual de los tiempos de latencia del reflejo corneal en equinos tras la administración IN del vehículo (n= 3).....	103
N°19: Medias, desvío estándar y coeficientes de variación porcentual de los tiempos de latencia del reflejo corneal en equinos tras la administración IV de butorfanol a la dosis de 0,05 mg/kg (n= 3).....	103
N°20: Medias, desvíos estándar y coeficientes de variación porcentual de los tiempos de latencia del reflejo corneal en equinos tras la administración IN de butorfanol a la dosis de 0,05	

mg/kg (n= 3).....	104
N°21: Medias, desvíos estándar y coeficientes de variación porcentual de los porcentajes de aumento desde basal del tiempo de latencia del reflejo corneal en equinos tras la administración IN de vehículo (n= 3).....	104
N°22: Medias, desvíos estándar y coeficientes de variación porcentual de los porcentajes de aumento desde basal del tiempo de latencia del reflejo corneal en equinos tras la administración IV de butorfanol a la dosis de 0,05 mg/kg (n= 3).....	105
N°23: Medias, desvíos estándar y coeficientes de variación porcentual de los porcentajes de aumento desde basal del tiempo de latencia del reflejo corneal en equinos tras la administración IN de butorfanol a la dosis de 0,05 mg/kg (n= 3).....	105

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

°C	Grados centígrados
κ	Receptor kappa
μ	Receptor mu
μg	Microgramos
μg/cm ²	Microgramos por centímetros al cuadrado
μg/cm ² h	Microgramos por centímetros al cuadrado hora
μg/ml	Microgramos por mililitros
μl	Microlitros
μl/disparo	Microlitro por disparo
λ	Longitud de onda
≈	Aproximado
≡	Equivalencia
%	Porcentaje
% p/v	Porcentaje peso a volumen
®	Marca registrada
$\sum_{i=0}^{n-1}$	Sumatoria desde 0 hasta n-1
0,1 M	0,1 molar
1 N	1 normal
a	Pendiente de la recta de la curva de calibración
a'	Pendiente de la recta del gráfico cantidad acumulativa de butorfanol sobre área de difusión en función del tiempo
A	Área de difusión
Abs	Absorbancia

ANOVA	Análisis de varianza
AUC	$_{0-\infty}$ Área bajo la curva concentración plasmática vs tiempo de 0 a ∞
AUC _{RC}	Áreas bajo la curva para el reflejo corneal.
b	Ordenada al origen de la recta obtenida de la curva de calibración
b'	Ordenada al origen de la recta obtenida del gráfico de cantidad acumulativa de butorfanol sobre área de difusión en función del tiempo
Cd	Concentración inicial de fármaco
CICUAL	Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio
cm	Centímetros
cm ²	Centímetros cuadrado
CMC	Concentración micelar crítica
cm/h	Centímetros por hora
C _{máx}	Concentración máxima
CIB	Aclaramiento corporal
CTAB	Bromuro de cetiltrimetil amonio
CV%	Coefficiente de variación porcentual
Da	Dalton
DATB	Bromuro de dodeciltrimetilamonio
DS	Desvío estándar
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético

ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
F	Biodisponibilidad
FI	Formulación I
FII	Formulación II
FIII	Formulación III
g	Gramos
g/l	Gramos por litro
h	Hora
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia (High Performance Liquid Chromatography)
IASP	Asociación Internacional para el Estudio del Dolor
IM	Intramuscular
IN	Intranasal
IV	Intravenosa
J_{ss}	Flujo en estado estacionario
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramo
K_p	Coeficiente de permeabilidad
LC	Límite de cuantificación
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LD	Límite de detección
l	Litro
l/h	Litro por hora

l/kg	Litro por kilogramo
l/kg/h	Litro por kilogramo por hora
logP	Logaritmo del coeficiente de reparto octanol-agua
mg	Miligramos
mg/cm ²	Miligramos por centímetros al cuadrado
mg/kg	Miligramos por kilo
min	Minutos
ml	Mililitros
mm	Milímetros
MNEC	Mucosa nasal equina congelada
MNECH	Mucosa nasal equina congelada sumergida en medio Hanks
MNEF	Mucosa nasal equina fresca
ng/ml	Nanogramo por mililitro
ng/ml*min	Nanogramo sobre mililitro por minuto
nm	Nanómetro
Q	Cantidad
Q/A	Cantidad de butorfanol sobre área de difusión
r ²	Coeficiente de determinación
r	Coeficiente de regresión lineal
RC	Reflejo corneal
rpm	Revoluciones por minuto
SC	Subcutánea
SNC	Sistema nervioso central

STDHF	Taurodihidrofusidato de sodio
t 1/2	Vida media
T _{máx}	Tiempo de concentración máxima
t _{lag}	Tiempo lag
TLRC	Tiempo de latencia del reflejo corneal
UV	Ultravioleta
UV/Vis	Ultravioleta/visible
V _{ss}	Volumen de distribución
WGA-HRP	aglutinina de germen de trigo conjugada con peroxidasa de rábano picante

RESUMEN

DESARROLLO Y EVALUACIÓN CLÍNICA DE UNA FORMULACIÓN INTRANASAL DE BUTORFANOL PARA USO EN EQUINOS

PALABRAS CLAVE: butorfanol, vía intranasal, equinos, formulaciones farmacéuticas.

El butorfanol es un opioide sintético utilizado para el tratamiento de dolor en equinos. Actualmente se aplica por vía intravenosa (IV), sin embargo, esta metodología se asocia a desventajas que alientan la búsqueda de vías de administraciones alternativas. La vía intranasal (IN) podría resolver estos inconvenientes, puesto que es una vía incruenta, no invasiva e indolora, que además posee un acceso directo al sistema nervioso central (SNC).

Este trabajo de tesis tiene como objetivo desarrollar y evaluar clínicamente una formulación de butorfanol para uso en equinos. Para ello, se realizaron ensayos *in vitro* donde se hicieron estudios de penetrabilidad de tres formulaciones distintas y un control. Los resultados indicaron que el tween 80 fue el excipiente con mayor efectividad para incrementar la penetrabilidad *in vitro* del butorfanol a través de la región olfatoria de la mucosa nasal equina.

A continuación, se llevó a cabo una sección *in vivo*, en la cual se realizó un estudio de disposición plasmática de aquella formulación que mostró mejor perfil *in vitro* y luego se evaluó su efecto analgésico.

El ensayo de disposición plasmática de butorfanol mostró que tras la administración IN de la formulación desarrollada, la absorción del fármaco fue rápida, la biodisponibilidad fue de $49,84 \pm 27,49$ %, el volumen de distribución fue de $0,524 \pm 0,41$ l/kg, y el aclaramiento corporal fue de $0,231 \pm 0,22$ l/kg/h.

El estudio de eficacia analgésica, reflejó a través del perfil temporal del incremento del tiempo de latencia del reflejo corneal que la administración de butorfanol por vía IN utilizando la formulación desarrollada posee un eficacia similar a la observada tras la administración IV.

Se postula que pasaje *in vivo* de butorfanol utilizando la formulación con tween 80 desde la cavidad nasal al SNC ocurrió preferentemente a través de la mucosa olfatoria.

SUMMARY

DEVELOPMENT AND CLINICAL EVALUATION OF AN INTRANASAL FORMULATION OF BUTORFANOL FOR USE IN EQUINES

KEY WORDS: butorphanol, intranasal route, horses, pharmaceutical formulations.

Butorphanol is a synthetic opioid used for the treatment of pain in horses. Currently it is administered intravenously (IV), however, this methodology is associated with disadvantages that encourage the search for alternative administration routes. The intranasal route (IN) could solve these drawbacks, since it is a bloodless, non-invasive and painless route, which also has direct access to the central nervous system (CNS).

This thesis work aims to develop and clinically evaluate a formulation of butorphanol for use in horses. For this, in vitro tests were carried out where penetrability studies of three different formulations and a control were carried out. The results indicated that tween 80 was the most effective excipient to increase the in vitro penetrability of butorphanol through the olfactory region of the equine nasal mucosa.

An in vivo section was carried out, in which a plasma disposition study of that formulation that showed the best in vitro profile was carried out and then its analgesic effect was evaluated.

Butorphanol plasma disposition assay showed that after IN administration, drug absorption was rapid, bioavailability was $49.84 \pm 27.49\%$, volume of distribution was 0.524 ± 0.41 l/kg. , and body clearance was 0.231 ± 0.22 l/kg/h.

The study of the analgesic efficacy of butorphanol, reflected through the temporal profile of the increase in the latency time of the corneal reflex that the administration of butorphanol via IN using the formulation developed has an efficacy similar to that observed after IV administration.

It is postulated that in vivo passage of butorphanol using the tween 80 formulation from the nasal cavity to the CNS occurred preferentially through the olfactory mucosa.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. RELACIÓN ENTRE LA VÍA DE ADMINISTRACIÓN DE UN FÁRMACO Y SU FORMULACIÓN

Para que un fármaco sea eficaz debe alcanzar el sitio de acción en concentración suficiente y permanecer el tiempo adecuado para ejercer su efecto farmacológico. Esto depende de la vía de administración, la formulación farmacéutica y la velocidad de administración (Ashford, 2004).

Un fármaco puede ingresar al organismo mediante diferentes rutas de administración como la oral, intravenosa (IV), subcutánea (SC), intramuscular (IM), inhalatoria y tópica, entre otras. Es importante que, al momento de administrar un fármaco, se logre determinar la vía más eficaz para alcanzar un perfil temporal de concentración adecuado al tratamiento que se requiera (Martin - Jiménez, 2002).

Por otro lado, una vez elegida la vía de administración, hay que tener en cuenta que existen numerosas formas farmacéuticas en las que puede incorporarse un fármaco para tratar una enfermedad de manera eficiente y práctica. Las formas farmacéuticas pueden diseñarse para ser administradas por vías clásicas y no clásicas, con el objetivo de conseguir una respuesta terapéutica máxima (Ashford, 2004).

Sin embargo, antes de que pueda hacerse una combinación correcta entre el fármaco y su presentación farmacéutica, es necesario relacionar la sustancia farmacológicamente activa con la patología que se

busca tratar, pues cada enfermedad suele precisar un tipo específico de tratamiento farmacológico. Además, cuando se diseña una forma farmacéutica, hay que considerar los factores que rigen la elección de la vía de administración y los requisitos específicos de dicha vía que influyen en la absorción del fármaco (Ashford, 2004).

En otras palabras, para que el tratamiento farmacológico sea efectivo, la combinación entre la vía de administración, el fármaco y la forma farmacéutica debe ser lo más ingeniosa posible para que el fármaco alcance el sitio de acción en la cantidad necesaria y se mantenga en éste durante el tiempo adecuado.

En este punto, el diseño de las formulaciones adquiere un papel fundamental. Un fármaco como parte de una formulación, puede contar con características fisicoquímicas prometedoras para llegar al sitio de acción, sin embargo, si la formulación o la vía de administración no son adecuadas puede que sus parámetros farmacocinéticos no reflejen un uso óptimo del ingrediente farmacológicamente activo. Por el contrario, si un fármaco no tiene una naturaleza química promisorio para alcanzar un sitio de acción sin desafíos, una vía de administración adecuada o una formulación bien diseñada pueden contribuir a que el uso del fármaco sea lo más eficiente posible. Es decir, que la combinación entre el diseño adecuado de la formulación para un fármaco particular y la vía de administración específica es importante para alcanzar el objetivo terapéutico propuesto.

Tomando en cuenta estas consideraciones, se abre la posibilidad de cuestionar las vías de administraciones actualmente utilizadas.

Particularmente, el butorfanol es un opioide utilizado como analgésico para el tratamiento del dolor en equinos (Plumb, 2006). Actualmente se administra mayoritariamente por vía IV, y en menor medida por vía IM (Ferreira, 2020). A pesar que la vía de administración IV es adecuada se propone optimizarla puesto que su uso está asociado al estrés del animal, por ser invasiva y dolorosa; esto es importante especialmente, para fármacos de acción corta, como butorfanol, que requieren dosificaciones frecuentes (Davis y col., 2011). Asimismo, su carácter estresante trae consecuencias directas sobre la práctica veterinaria debido a que el comportamiento, tamaño, y la percepción dolorosa del animal vuelve compleja y peligrosa la maniobra de administración.

Nuestro grupo de trabajo cuenta con una línea de investigación sobre la aceptación, tolerancia y aplicabilidad de la vía IN en equinos. Estos estudios, parte de otra tesis doctoral ya defendida, han demostrado que la vía IN es aceptada y tolerada por los equinos (Ferreira, 2020).

La vía IN podría ser la respuesta a los problemas prácticos que le surgen al médico veterinario durante la administración de butorfanol por la vía IV. Es una alternativa no invasiva, incruenta, indolora y rápida que dirige el principio activo de manera directa al sitio de acción, disminuyendo la exposición sistémica al fármaco y con ello, los posibles

efectos secundarios que este puede llegar a ocasionar (Ferreira y col., 2019).

1.2. ANATOMÍA E HISTOLOGÍA DE LA CAVIDAD NASAL EQUINA

1.2.1. FUNCIÓN Y ESTRUCTURA DE LA CAVIDAD NASAL

La nariz es un órgano estructural y funcionalmente complejo que alberga uno de los cinco sentidos, que además es el sitio donde se filtra, humidifica y controla la temperatura del aire que ingresa hacia los pulmones (Keller y col., 2022).

En equinos, la cavidad nasal se encuentra dividida simétricamente por el *septum* nasal en la fosa derecha e izquierda. Se conecta a la cavidad craneal mediante la lámina etmoidal, la cual tiene forma de criba cóncava donde se ubica el bulbo olfatorio, y se encuentra atravesada en el plano medio por la *cresta galli* (Hare, 1982).

El interior de cada fosa nasal está ocupado por tres cornetes, conchas o turbinetes que se encargan del acondicionamiento del aire que ingresa por los ollares y que subdividen cada lado de la cavidad nasal en meatos, superior, medio e inferior (Hare, 1982; Tortora y Derrickson, 2006).

La cavidad nasal está irrigada por las arterias esfenopalatina, palatina mayor y ramas de la etmoidal. El flujo sanguíneo arterial irriga una densa red de capilares y vasos cerca del turbinete en la región respiratoria. El retorno venoso está constituido por las venas

esfenopalatina, facial y oftálmica que drenan a la vena yugular interna. Está inervada por el nervio olfatorio (par craneal I), cuyos filamentos se extienden directamente desde el bulbo olfatorio hacia la mucosa nasal y también por las ramas del nervio trigémino (par craneal V) que transmite información quimiosensorial y termosensorial desde las mucosas oral, ocular y nasal (Djupersland y col., 2014; Grassin-Delye y col., 2012).

La cavidad nasal se divide en tres regiones: vestibular, respiratoria y olfatoria.

1.2.2. REGIÓN VESTIBULAR

La región vestibular de la cavidad nasal se continúa con la piel. En caballos, la parte rostral del vestíbulo se halla revestido por piel con pelos y glándulas sebáceas y sudoríparas, y en la parte caudal está cubierto por epitelio escamoso estratificado, pigmentado y no queratinizado. El epitelio se encuentra firmemente sujeto a la submucosa propia por numerosas papilas de tejido regular y denso (Dellmann, 1976).

1.2.3. REGIÓN RESPIRATORIA

La región respiratoria se sitúa en la zona cercana al turbinete dorsal y la mucosa se visualiza de tono rojizo por su gran vascularización. En su superficie contiene epitelio pseudoestratificado, prismático, ciliado, formado por cuatro tipos de células: ciliares, basales, caliciformes y de sostén (figura 1). En la región de transición entre las regiones vestibular y

respiratoria, el epitelio limitante es de tipo transicional (Dellmann, 1976; Lochhead y Thorne, 2014; Ross y Pawlina, 2013).

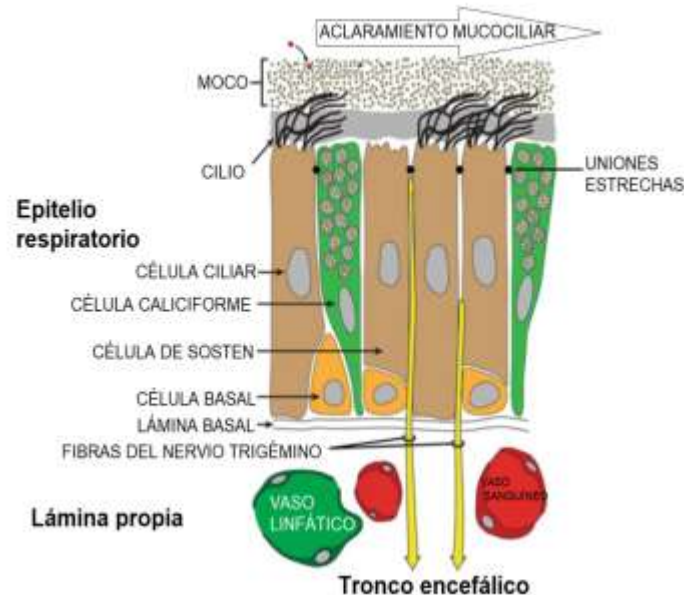


Figura 1: Región respiratoria de la cavidad nasal. El epitelio descansa sobre una lámina propia y se compone por las células ciliares, basales, caliciformes y de sostén que se unen entre sí mediante uniones estrechas. Modificado de Lochhead y Thorne, 2014

1.2.4. REGIÓN OLFATORIA

Esta región comprende las partes caudales de los huesos etmoidales y las áreas adyacentes del cornete nasal dorsal y del *septum* nasal y el órgano vomeronasal. Está recubierta por una mucosa de color amarillento (mucosa olfatoria) debido al contenido de pigmentos de las células sustentaculares (células de sostén), lo cual la distingue de manera macroscópica de la respiratoria (Dellmann, 1976; Geneser y col., 2015; Hare, 1982; Ross y Pawlina, 2013).

La lámina propia de la mucosa olfatoria es contigua al periostio del hueso subyacente y contiene abundantes vasos sanguíneos y linfáticos,

nervios amielínicos y mielínicos y glándulas olfatorias (figura 2) (Ross y Pawlina, 2013).

El epitelio olfatorio, al igual que el epitelio de la región respiratoria, es pseudoestratificado, aunque se compone de tres clases de células: neuronales olfatorias, basales y de sostén; carece de células caliciformes (figura 2) (Lochhead y Thorne, 2014; Ross y Pawlina, 2013).

Las células neuronales olfatorias son neuronas bipolares que se prolongan a lo largo de toda la altura del epitelio. Constan de una porción apical delgada (dendrita) que se proyecta hasta la superficie del epitelio, una parte central gruesa (pericarión) que contiene al núcleo y una porción basal delgada (axón). El proceso dendrítico apical de las células sensoriales se proyecta por encima de las células de sostén. Dichas terminaciones sensoriales sostienen varios cilios típicos que se proyectan en todas direcciones y terminan en una prolongación larga estrecha atípica. Los axones amielínicos forman haces delgados entre las células basales y llegan a estar rodeados por células de Schwann tras perforar la membrana basal de la mucosa olfatoria (figura 2) (Dellmann, 1976).

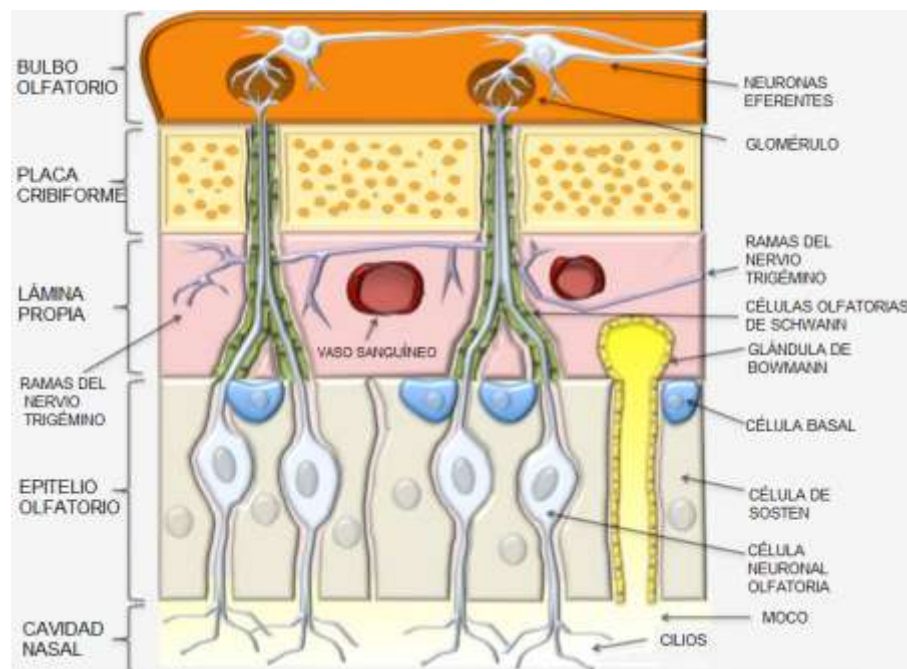


Figura 2: Región olfatoria de la cavidad nasal. El epitelio se compone por tres clases de células: neuronales olfatorias, basales y de sostén. El epitelio olfatorio descansa sobre la lámina propia y ella sobre la placa cribriforme. Figura modificada de Veronesi y col., 2020

1.2.5. GLÁNDULAS OLFATORIAS Y EL ÓRGANO VOMERONASAL

Las glándulas olfatorias (glándulas de Bowman) son características de la mucosa olfatoria. Estas son glándulas tubuloalveolares serosas ramificadas que envían sus secreciones proteicas hacia la superficie olfatoria a través de conductos (figura 2) (Ross y Pawlina, 2013).

Entremezcladas con las glándulas olfatorias y algo por debajo de ellas se hallan haces de fibras nerviosas olfatorias amielínicas. Algunas fibras mielínicas originadas en el nervio trigémino pierden su mielina conforme penetran en la lámina basal y se convierten en terminaciones nerviosas desnudas entre las células epiteliales. Estas fibras nerviosas no juegan papel alguno en la sensopercepción olfatoria (Dellmann, 1976).

El órgano vomeronasal es un órgano accesorio que forma parte del sistema olfatorio; se encuentra en las dos fosas nasales y está conectado al bulbo olfatorio a través de proyecciones axonales. Su superficie está cubierta por mucosa respiratoria en su cara lateral y de mucosa olfatoria en su cara medial. Tiene una función importante en el comportamiento de las especies porque es capaz de detectar feromonas (Dellman, 1976; Ross y Pawlina, 2013).

1.3. LA VÍA INTRANASAL

1.3.1. CARACTERÍSTICAS DE LA VÍA INTRANASAL

La vía IN se ha utilizado con objetivos terapéuticos desde la antigüedad. Durante el siglo pasado, su uso como vía de administración de fármacos estaba limitado al tratamiento de la sintomatología de la rinitis estacional y para enfermedades infecciosas del tracto respiratorio; sin embargo para finales del siglo XX comenzó a extender sus implicancias, aplicándola, por ejemplo, para tratamientos de patologías sistémicas como insuficiencia cardíaca (Keller y col, 2022; Landau y col., 1994).

En el año 1989, William Frey II y colaboradores exploraron la posibilidad de utilizar la vía IN para administrar fármacos desde la cavidad nasal al sistema nervioso central (SNC). Fue así como este grupo de investigación demostró que la administración IN de fármacos podía utilizarse para el suministro de ingredientes farmacológicamente activos

hacia el cerebro para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como Parkinson y Alzheimer, patentándolo en 1991 (Frey, 1991). Desde entonces, el interés en el estudio de la vía IN para administración de fármacos de acción central ha crecido de manera significativa (Keller y col, 2022).

La vía IN puede utilizarse para inoculación de vacunas o administración de fármacos de acción local, sistémica o para la llegada directa al SNC. Para lograr estos objetivos, la aplicación del fármaco debe llevarse a cabo en distintas regiones de la mucosa nasal. La inoculación de vacunas, por ejemplo la vacuna de la gripe estacional o la vacuna de adenitis equina, se realiza sobre el tejido linfoide y las células inmunitarias presentes en el piso de la zona vestibular. La administración local de fármacos, por ejemplo anestésicos locales, antihistamínicos y corticoides, se realiza en las regiones del vestíbulo y del epitelio respiratorio. Para realizar una administración sistémica, la aplicación se realiza predominantemente en el epitelio respiratorio; su aplicación para el tratamiento de la migraña, prevención de infecciones, manejo del dolor, terapia de reemplazo hormonal y terapia de emergencia (estatus epiléptico) está investigándose (Keller y col, 2022).

La transferencia de fármacos desde la cavidad nasal al SNC ha sido estudiada extensivamente para insulina y oxitocina (Crowe y Hsu, 2022; Gänger y Schindowski, 2018).

A pesar de sus ventajas, entre ellas, la posibilidad de acceder de manera directa al SNC, la rápida absorción sistémica y la evasión del

metabolismo intestinal, en medicina veterinaria no es una vía utilizada rutinariamente (Bonferoni y col., 2019).

Dado que es una vía de administración parenteral, es posible utilizarla en pacientes con problemas gástricos y vómitos y es una alternativa para la administración de fármacos que sufren degradación enzimática o causada por el ácido del estómago. También cuenta con la ventaja de no requerir el uso de agujas, disminuyendo el estrés del paciente asociado a su uso (Bailey y col., 2017; Dufes y col., 2003; Tayebati y col., 2013).

En animales de laboratorio, se publicaron estudios que demuestran que los fármacos administrados por la vía IN alcanzan el cerebro y generan un efecto terapéutico en un plazo corto. Estudios en ratones utilizando moléculas pequeñas y lipofílicas como cocaína (Chow y col., 1999), morfina (Westin y col., 2005) y testosterona (Banks y col., 2009; de Souza Silva y col., 2009) demuestran que tras su administración IN alcanzan niveles en cerebro en un lapso de minutos (Dhuria y col., 2010).

Particularmente para la especie equina, la gran superficie e irrigación de su cavidad nasal permite inferir la viabilidad de esta vía para la administración de fármacos (Ferreira y col., 2019).

Hasta el momento en humanos se han patentado más de 60 medicamentos de administración IN, entre ellos Buserelina *Suprefact nasal*®; Nafarelina *Synarel*®; Desmopresina *Minirin*®; Calcitonina *Miacalcin*®; Dihidroergotamina *Diervo-spray*®; Sumatriptan *Imigran*®; Butorfanol *Stadol NS*®; Fentanilo *Instanyl*® y *ecFent*®; Estradiol

Aerodiol®; Nicotina *Nicotrol NS®*; Oxitocina *Syntocinon®* y Cianocobalamina *Nascoba®*. Estos son utilizados para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, desórdenes psiquiátricos, migraña, lesiones cerebrales traumáticas, dolor, obesidad, trastornos del sueño y cáncer. Esta amplitud de fármacos refuerza la idea que la vía IN es una vía de administración de gran potencial terapéutico (Crowe y Hsu, 2022).

No existe una formulación única y universal para la administración de fármacos en la cavidad nasal que asegure la llegada al SNC; sin embargo, existe una amplia variedad de excipientes, solventes, co-solventes y nanocarriers que han demostrado mejorar la llegada a este sitio (Crowe y Hsu, 2022).

1.3.2. MECANISMOS Y VÍAS DE TRANSPORTE DESDE LA CAVIDAD NASAL AL SNC

Para avanzar en el desarrollo de formulaciones IN para fármacos de acción central, es fundamental el conocimiento de las vías y mecanismos de pasaje desde la cavidad nasal al SNC (Ferreira y col., 2019).

Cuando el fármaco ingresa a la cavidad nasal, lo primero que experimenta es un aclaramiento mucociliar en la región vestibular (Williams y col., 2006). Luego las moléculas de fármaco se dirigen hacia la región posterior de la cavidad donde se ponen en contacto con las mucosas respiratoria y olfatoria (Lochhead y Thorne, 2014). Allí, el transporte del fármaco desde el epitelio nasal al SNC tiene lugar por

diferentes mecanismos en función de su naturaleza química, de los parámetros fisicoquímicos de la formulación, de las condiciones fisiológicas de la mucosa y del dispositivo de administración (figura 3) (Gänger y Schindowski, 2018).

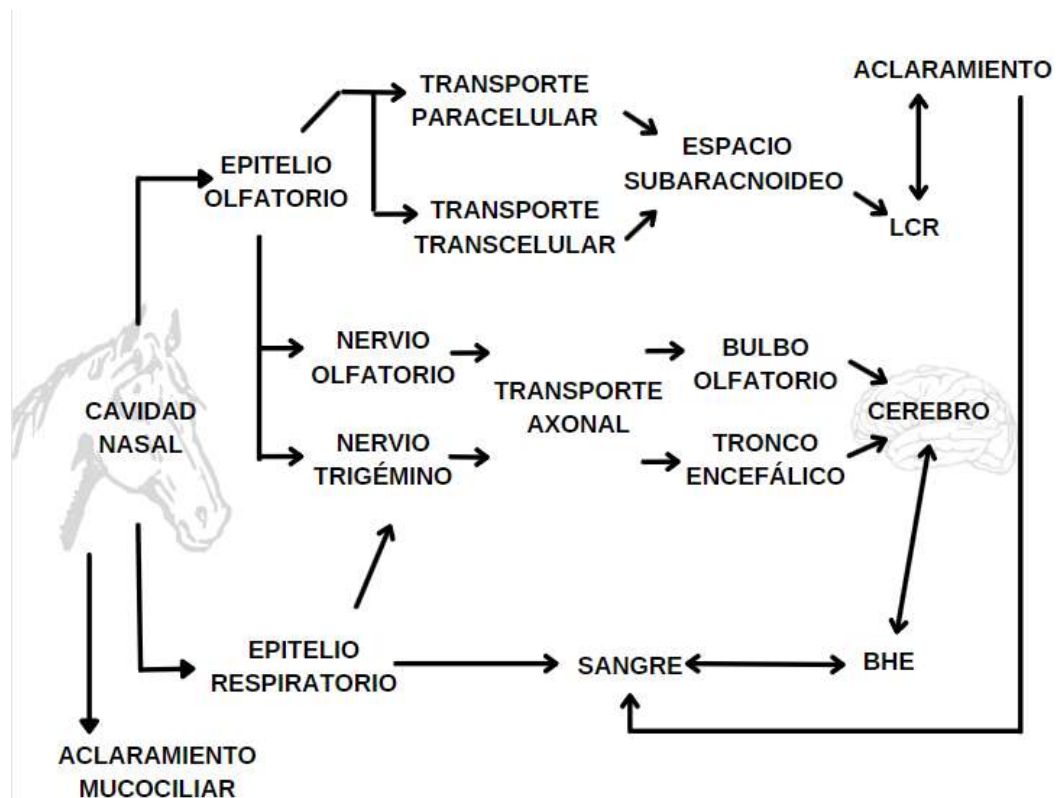


Figura 3: Sinopsis de las vías de transporte que puede seguir un fármaco luego de su administración intranasal. Modificado de Selvaraj y col., 2018

Los mecanismos de transporte desde la cavidad nasal hacia el SNC están englobados dentro de dos vías:

- Vía intracelular: involucra los mecanismos de transporte intracelular a través de los nervios trigémino y olfatorio (figura 3).
- Vía extracelular: involucra los mecanismos de transporte a través de la circulación sistémica o vía linfática – LCR (figura 3).

1.3.2.1. *Vía intracelular*

Los nervios olfatorio y trigémino conectan anatómicamente la cavidad nasal y el SNC. Los axones de las células neuronales olfatorias forman haces que viajan a través de los forámenes en la placa cribosa y hacen sinapsis en los glomérulos en el bulbo olfatorio (Lochhead y Davis, 2019). El nervio trigémino (par craneal V) es el nervio craneal más largo; tiene tres ramas (oftálmica, maxilar y mandibular) dos de las cuales inervan la cavidad nasal. El trigémino inerva principalmente el epitelio respiratorio y el vestíbulo de la cavidad nasal, aunque curiosamente una pequeña porción del nervio también termina en el epitelio olfatorio (Schaefer y col., 2002). Además establece conexión con el SNC, especialmente con la región caudal del cerebro, el tallo cerebral y la médula espinal, y transmite la información sensorial desde la cavidad nasal hasta estas regiones (Clerico y col., 2003; Gray, 1978).

La vía del nervio trigémino es un tipo de pasaje poco reportado, sin embargo, en el último tiempo está siendo reconocida su importancia (Ferreira y col., 2019; Misra y col., 2008).

En este tipo de transporte, el fármaco es captado por las células neuronales olfatorias o los nervios trigéminos mediante endocitosis, difusión pasiva o endocitosis mediada por receptor e introducido en un endosoma que se transporta a través de la red de Golgi mediante transporte axonal intracelular hacia el bulbo olfatorio o al tallo cerebral, respectivamente (figura 4). Cuando el fármaco alcanza el SNC, es

excitado y comienza a distribuirse (Crowe y Hsu, 2022; Gänger y Schindowski, 2018; Mittal y col., 2014; Xu y col., 2020).

Se ha demostrado que los nervios olfatorio y trigémino son capaces de endocitar virus de varias cepas de influenza, herpesvirus y poliovirus que posteriormente resultan en infecciones en el SNC (Crowe y col., 2018; Lochhead y Thorne, 2012). Las neuronas olfatorias, en particular, son capaces de endocitar sustancias de tamaños muy variados, que van desde lactato de aluminio (294 Da) y partículas de oro (50 nm) hasta el péptido de insulina (5,8 kDa) y la aglutinina de germen de trigo conjugada con peroxidasa de rábano picante (WGA-HRP, 80 kDa). Sin embargo, también se ha reportado que el proceso de translocación neuronal es muy lento. Debido a que la mayor parte de los estudios publicados hasta la fecha reportan que el transporte desde la cavidad nasal al cerebro lleva solo minutos, se estima que la vía intracelular es una ruta de transporte viable, pero no primaria (Gänger y Schindowski, 2018; Keller y col., 2022).

El nervio terminal (nervio craneal cero) y el órgano vomeronasal (órgano de Jacobson) también están localizados en la cavidad nasal, pero hasta el momento no se ha estudiado su rol como ruta hacia el SNC. Sin embargo, se postula que los fármacos podrían absorberse a través de los nervios vomeronasal y terminal y llegar al cerebro de manera directa (Erdő y col., 2018; Lochhead y Thorne, 2014; Monti-Bloch y col., 1998).

La vía del nervio olfatorio, la vía del nervio trigémino y la vía vomeronasal proveen un acceso directo a ciertas regiones del cerebro, que de otra manera no serían alcanzables (Erdő y col., 2018). El bulbo

olfatorio es usado como transporte de fármacos para su distribución en diferentes partes del cerebro como la corteza piriforme, amígdala y el hipotálamo (Khan y col., 2017). Sin embargo, todavía es necesaria la optimización de estas vías para tener un entendimiento completo de la dosis y de la seguridad de la administración IN de fármacos (Xu y col., 2020).

1.3.2.2. *Vía extracelular*

Dentro de la cavidad nasal, los fármacos deben cruzar el epitelio mediante transporte paracelular o transcitosis para acceder a la lámina propia. Las micrografías electrónicas de la mucosa nasal demuestran la existencia de uniones estrechas en esta región. Las uniones estrechas pueden modularse e incrementar o decrecer la permeabilidad a través de la membrana primaria a través de vías de señalización de fosforilación de ocludinas (Crowe y Hsu, 2022; Lochhead y Thorne, 2014). Varios componentes han sido utilizados para disminuir en forma transitoria la tensión de las uniones estrechas e incrementar los pasajes de fármacos administrados por vía IN, incluyendo papaverina, poli-L-arginina y acetato de tetradecanoilforbol (Koizumi y col., 2008; Krishan y col., 2014; Ohtake y col., 2003). Sin embargo, es posible que la modulación de las uniones estrechas no sea un método efectivo para incrementar la penetración de moléculas debido al rápido recambio de células. De hecho, se postula que el recambio rápido y continuo de células basales así como, de uniones estrechas le otorgan al epitelio nasal una permeabilidad relativamente alta

comparado con otros sitios epiteliales (Crowe y Hsu, 2022; Lochhead y Thorne, 2014).

Una vez que el fármaco alcanza la lámina propia, es posible que utilice para distribuirse alguna de las vías extracelulares que se mencionan a continuación (Lochhead y Thorne, 2014) (figura 4).

Primero puede absorberse y entrar a la circulación sistémica. La absorción es rápida porque la mucosa se encuentra muy vascularizada y el flujo de sangre es alto en especial en la región respiratoria (Lochhead y Thorne, 2014).

Asociado a la absorción vascular, se ha reportado una vía de ingreso directo al SNC a través de los vasos de la mucosa nasal; un proceso llamado “transferencia de contracorriente” que está relacionado con la transferencia de fármacos desde la circulación venosa nasal a la circulación arterial (carotídea) y de ahí al cerebro y la médula espinal (Einer-Jensen y Hunter, 2005; Ferreira, 2020). Por otro lado, se ha reportado un segundo mecanismo de transporte directo al SNC que involucra los canales asociados con los vasos sanguíneos de la mucosa nasal, también llamados canales perivasculares (Rennels y col., 1995). Los canales perivasculares están limitados por la capa más externa de los vasos sanguíneos y la membrana basal del tejido circundante y actúan como sistema linfático para el cerebro; a través de ellos, sustancias derivadas de las neuronas se eliminan desde el fluido intersticial cerebral a los vasos sanguíneos (Rennels y col., 1995). El transporte perivascular es, a diferencia de la difusión, un mecanismo de flujo masivo que obtiene

su energía cinética de las pulsaciones sistólicas (Groothuis y col., 2007). La presencia de la denominada “bomba perivascular de transporte” explica la distribución rápida de los agentes terapéuticos a todo el cerebro (Hadaczek y col., 2006; Schley y col., 2006). De esta manera los fármacos administrados por la vía IN pueden ingresar a los espacios perivasculares de la cavidad llegando posteriormente al cerebro con una distribución generalizada (Ferreira y col., 2019).

Por último, las sustancias y moléculas pueden ser absorbidas desde la submucosa a través el sistema linfático (Lochhead y Davis, 2019).

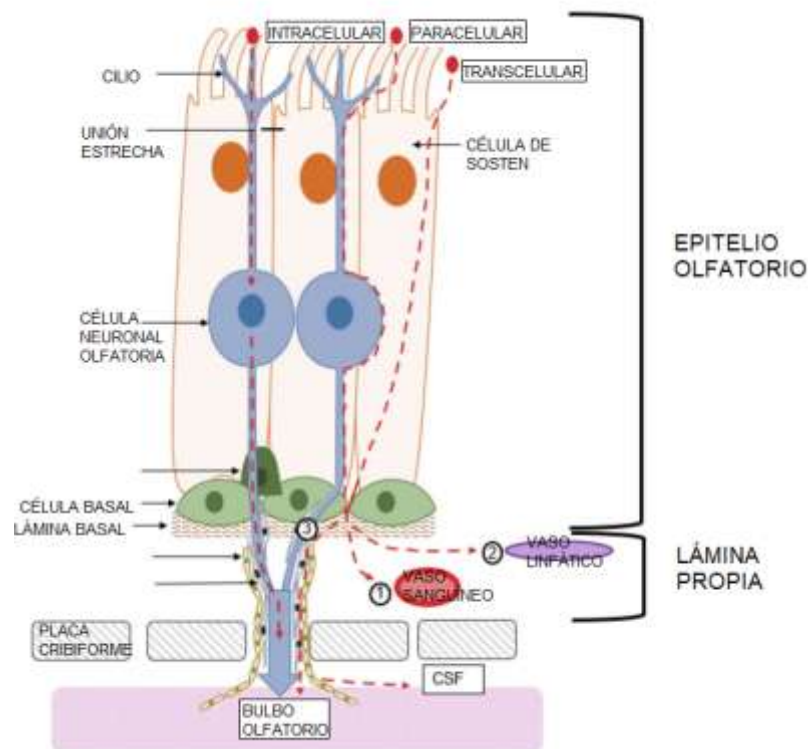


Figura 4: Mecanismos de pasaje de sustancias desde la cavidad nasal al SNC. La sustancia se une a un receptor y es internalizada, por ejemplo, por endocitosis mediada por receptor. Luego viaja a través de la célula neuronal olfatoria hacia el bulbo olfatorio. Otra posibilidad es que el fármaco viaje mediante vía paracelular o mediante transporte transcelular hacia la lámina propia. A partir de allí la sustancia puede, (1) ser absorbida por los vasos sanguíneos locales que llegan a la circulación (Vía sistémica) (2) ser absorbida por los vasos linfáticos y ser drenada hacia los ganglios linfáticos cervicales profundos del cuello (3) la sustancia puede utilizar los espacios perineurales entre las células de envoltura olfatoria y los fibroblastos del nervio olfatorio para viajar asociada a los nervios olfatorios al bulbo olfatorio. Después de atravesar la placa cribosa, la sustancia puede llegar también al líquido cefalorraquídeo y distribuirse por las diferentes regiones del cerebro. Figura modificada de Keller y col., 2022

Datos experimentales basados en modelos murinos demostraron que los fármacos administrados por vía IN alcanzan el SNC dentro de los primeros 5 minutos post-administración y llegan a regiones distales del cerebro en 30 minutos. Luego de realizada la administración, el tiempo que tardan en generarse los picos de concentración de fármaco varían según la región del cerebro. El bulbo olfatorio alcanza su punto máximo a

los 10 minutos post-administración, mientras que regiones más profundas como el cuerpo estriado, e incluso localizaciones más distales como el mesencéfalo o el hipotálamo requieren al menos media hora. El rango de tiempos para alcanzar la concentración máxima en todo el cerebro va desde 30 minutos a 2 horas. Por último, el aclaramiento completo del fármaco del SNC es de aproximadamente 4 horas (Crowe y Hsu, 2022).

Por otro lado, se reporta que el transporte axonal (vía intracelular) requiere entre 0,74 y 2,67 horas para el nervio olfatorio y entre 3,69 y 13,33 horas para el nervio trigémino (Crowe y Hsu, 2022).

Toda esta evidencia en conjunto indicaría que la mayor parte del transporte de fármacos desde la cavidad nasal hacia el SNC ocurre por vía extracelular. Solo la vía extracelular en combinación con los movimientos pulsátiles de la arteriola proporciona tiempos de transporte similares a los reportados (Crowe y Hsu, 2022; Ichimura y col., 1991). Estudios *in vitro* reportan que a medida que las arteriolas se expanden en la sístole, comprimen el líquido de la vaina circundante y crean una onda que se mueve a una velocidad de 214 $\mu\text{m}/\text{min}$ (Crowe y Hsu, 2022). Esta “bomba perivascular” es un modo de transporte muy eficiente, que se traduce en tiempos de latencia de 0,33 h y 1,7 h para los nervios olfatorio y trigémino, respectivamente. Aun cuando estos tiempos no alcanzan la evidencia *in vivo* plasmada en la literatura, es razonable pensar que la ausencia de huesos del cráneo alrededor de los canales en los estudios *in vitro* permite una mayor disipación de energía y, en consecuencia, una desaceleración en el transporte (Crowe y Hsu, 2022). Pese a eso, la vía

extracelular impulsada por pulsaciones sistólicas es el mecanismo más aceptable y cuenta con evidencia *in vivo* e *in vitro*, por lo tanto, debe ser una de las consideraciones principales para el diseño de formulaciones IN (Crowe y Hsu, 2022).

1.4. DESARROLLO DE FORMULACIONES UTILIZADAS EN LA VÍA INTRANASAL

1.4.1. FACTORES QUE AFECTAN LA PERMEABILIDAD DE LOS FÁRMACOS

Para el desarrollo de formulaciones para administración IN es importante tener presente algunos factores que afectan la permeabilidad de los fármacos (Grassin-Delyle y col., 2012).

La nariz, al ser una puerta de entrada al organismo, posee reflejos que evitan el paso y expulsan los agentes que el organismo reconozca como potencialmente lesivos, induciendo el estornudo, aumentando el aclaramiento mucociliar y la secreción de moco (Guzman Moreno, 2018).

El flujo sanguíneo en la cavidad nasal influye sobre la absorción nasal de fármacos y se ve afectado por la temperatura ambiental, la humedad, la presencia de fármacos vasoactivos, traumas e inflamación (Gizurarson, 2012; Illum, 2002; Singh y col., 2012; Talegaonka y Mishra, 2004).

La citocromo P450 nasal, proteasas y peptidasas presentes en la cavidad nasal pueden metabolizar fármacos. Se ha reportado que las

isoenzimas del citocromo P450 metabolizan cocaína, nicotina, alcoholes, progesterona y descongestivos (Soane y col., 1999). A pesar que el metabolismo nasal suele ser más débil que el hepático e intestinal no puede ignorarse por completo (Singh y col., 2012).

Por otro lado, hay tres características propias de los fármacos que influyen en su transporte a través de las mucosas: su peso molecular, su naturaleza hidrofílica/hidrofóbica y el grado de ionización (Grassin-Delyle y col., 2012).

La solubilidad del fármaco y su velocidad de disolución son factores importantes a tener en cuenta. Una disolución rápida es crucial para que las partículas de fármaco no se vean sujetas al aclaramiento mucociliar que reducirá su biodisponibilidad (Dey y col., 2011; Singh y col., 2012; Stütze y col., 2015).

Otro factor importante es la lipofilidad del fármaco. Si la lipofilidad es demasiado alta, el fármaco no se disuelve fácilmente en el ambiente acuoso de la cavidad nasal, por lo tanto, con un aclaramiento mucociliar acelerado, el tiempo de contacto con la membrana nasal disminuye, generándose una penetración reducida (Dey y col., 2011; Sam y col., 1995).

La absorción del fármaco se ve influenciada, además, por características de la formulación (como viscosidad, tonicidad y pH) y del actuador con el que se aplica (dosis aplicada, el volumen de administración, el ángulo y el tamaño de gota) (Dey y col., 2011; Grassin-Delyle y col., 2012; Pires y col., 2009).

Se recomienda que la formulación tenga un pH entre 4,0 y 6,5 para no inducir la irritación de la mucosa (Dey y col., 2011; Sam y col., 1995).

En el desarrollo de formulaciones, se pueden incorporar excipientes que mejoren la penetración y absorción de fármacos como ciclodextrinas, surfactantes, quitosanos y fosfolípidos (Velloso y Landoni, 2022).

1.4.2. EXCIPIENTES MEJORADORES DE LA PENETRACIÓN

Tras su administración IN los fármacos deben evadir tres tipos de barreras: física (moco y epitelio), temporal (aclaramiento mucociliar) y química (actividad enzimática); por lo que en el diseño de formulaciones se vuelve relevante el estudio de los factores que modifiquen estas barreras (Cornaz Gudet y Buri, 1994).

Los mejoradores de la penetración son excipientes funcionales que se agregan en las formulaciones para mejorar la penetración del principio activo a través de las barreras biológicas (Ghadiri y col., 2019).

Un mejorador de la penetración ideal debe, a la concentración utilizada, ser farmacológicamente inerte, tener acción inmediata, tener un efecto predecible de duración determinada, no generar irritación, toxicidad o alergia, y ser activo a bajas concentraciones. Además debe ser compatible con el principio activo y otros adyuvantes presentes en la formulación, ser capaz de mantenerse en contacto con la mucosa nasal el tiempo suficiente para lograr un efecto máximo, no tener un gusto u olor desagradables, no dañar la membrana sobre la cual se aplica y, en caso

de que esto ocurra, el efecto debe ser completamente reversible (Behl y col., 1998; Na y col., 2010).

No es posible realizar una clasificación categórica de los mejoradores de penetración porque las propiedades químicas de estos excipientes se solapan y, el hecho de que aún no se conozcan en detalle sus mecanismos de acción, complica la identificación de las diferencias. Como se mencionó previamente, dentro de los mejoradores de penetración podemos encontrar ciclodextrinas, quitosano y derivados, surfactantes, ácidos biliares y sus sales y derivados, taurodihidrofusidato de sodio y fosfolípidos.

1.4.2.1. *Ciclodextrinas*

Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos de seis o más unidades de α -D-glucopiranososa unidas por enlaces glicosídicos 1-4 formadas por la acción de ciertas enzimas sobre el almidón (Brewster y Loftsson, 2007; Connors, 1997).

Se utilizan en formulaciones IN para mejorar la absorción de fármacos lipofílicos incrementando su solubilidad acuosa y/o mejorando su absorción (Davis y Illum, 2003; Leyva y col., 2004; Merkus y col., 1999)

Las ciclodextrinas interactúan con compuestos de poca solubilidad en agua incrementando su solubilidad aparente (Ghadiri y col., 2019).

El mecanismo de acción de estas sustancias como mejoradores de la penetración de fármacos a través de membranas biológicas ocurre solo

bajo condiciones específicas y actualmente no se encuentra totalmente dilucidado (Ghadiri y col., 2019).

Su toxicidad depende de la ruta de administración. A pesar de que son bien toleradas y no tóxicas cuando se administran oralmente, no es seguro administrarlas de manera IV debido a su capacidad de cristalizar (Merkus y col., 1999)

Las ciclodextrinas han sido utilizadas como mejoradores de penetración IN para calcitonina, insulina, glucagón y factor estimulante de colonias de granulocitos recombinante (Merkus y col., 1999).

1.4.2.2. *Quitosano y derivados*

Los quitosanos son polisacáridos catiónicos lineales que se obtienen a partir de la deacetilación de quitina (Cheung y col., 2015; Schipper y col., 1999).

El quitosano y sus derivados son materiales versátiles por tener una actividad diversa, son biocompatibles, biodegradables, atóxicos, tienen bajo costo y suelen ser poco alergénicos. Además tienen gran área de superficie, porosidad, conductividad y pueden moldearse fácilmente en diferentes formas tales como películas, fibras, esponjas, geles, perlas, nanopartículas, micropartículas, polvo y soluciones (Bansal y col., 2011; Cheung y col., 2015; Dodane y Vilivalam, 1998; Shariatinia, 2019).

Se utilizan en la industria farmacéutica como mejoradores de la penetración eficaces para fármacos hidrófilos con poca absorción y como carriers de fármacos, no solo mejorando su penetración, sino también

mejorando su liberación y estabilizando sus componentes para su direccionamiento (Dodane y Vilivalam, 1998; Shariatinia, 2019).

Varios estudios han reportado que el quitosano tiene propiedades mucoadhesivas y que puede utilizarse de manera segura en formulaciones para administración IN de proteínas (Martín y col., 1998). Fue demostrado que el mecanismo de mejoramiento de transporte de fármacos es una combinación entre la bioadhesividad y la apertura transitoria de las uniones estrechas de la mucosa nasal (Bansal y col., 2011). Una formulación IN con quitosano podría mejorar el tiempo de residencia de fármacos en las células de la mucosa nasal conduciendo a una liberación sostenida y con ello aumentando la biodisponibilidad y reduciendo la frecuencia de administración (Kim, 2008; Illum, 2002).

1.4.2.3. *Surfactantes*

Los surfactantes son moléculas anfifílicas compuestas por una cabeza de naturaleza hidrofílica y una cola hidrofóbica formando una estructura asimétrica y polar. Tienen la capacidad de disminuir la tensión superficial entre las fases aire-agua o agua-aceite, mejorando la miscibilidad de las sustancias y permitiendo que difundan o se mezclen voluntariamente como emulsiones en agua u otros líquidos (Kulkarni y Shaw, 2015; Suhail y col., 2019).

Presentan gran actividad de superficie y, en agua, cuando se encuentran por arriba de la concentración micelar crítica (CMC), pueden asociarse sobre sí mismos formando agregados polimoleculares como

micelas y liposomas (Schreier y col., 2000; Sekhon, 2013, Velloso y Landoni, 2022).

Los surfactantes se clasifican en aniónicos, catiónicos, no iónicos y zwitterionicos (Suhail y col., 2019).

Los surfactantes aniónicos y catiónicos tienen, respectivamente, una carga negativa y positiva en la región hidrofílica de la molécula (figura 5 (A) (B)) (Kulkarni y Shaw, 2015; Sekhon, 2013; Suhail y col., 2019, Velloso y Landoni, 2022).

Los surfactantes no iónicos no poseen carga en la cabeza de la molécula; los más utilizados son los ésteres de los ácidos grasos de sorbitán (denominados Spans) y sus derivados etoxilados (llamados Tweens) (figura 5 (C)) (Sekhon, 2013; Suhail y col., 2019)

Los surfactantes zwitterionicos o anfóteros tienen una carga positiva y una negativa en su molécula. Dependiendo del pH del medio circundante, pueden adquirir carga positiva, negativa o no tenerla; en soluciones de pH ácido, tienen carga positiva, mientras que, en soluciones de pH alcalino, tienen carga negativa y en soluciones con un pH definido (punto isoeléctrico) ambos grupos iónicos tienen igual ionización (Kulkarni y Shaw, 2015; Suhail y col., 2019; Tadros, 2014; Velloso y Landoni, 2022).

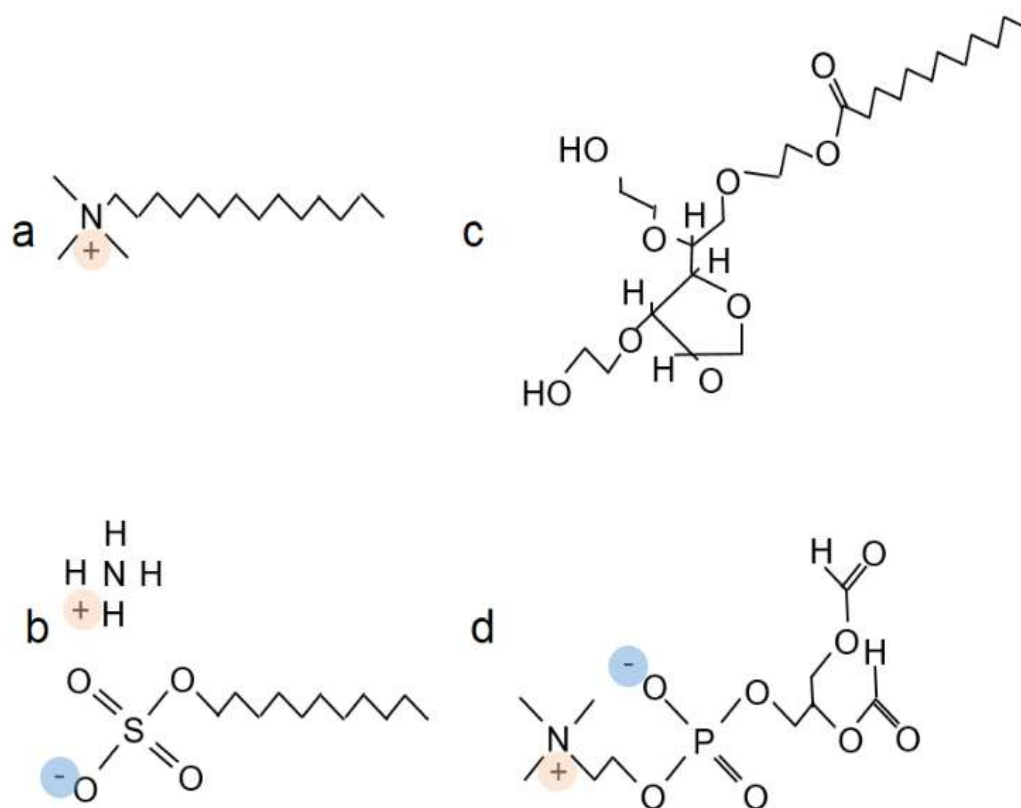


Figura 5: (A) Esquema de la estructura química de la molécula de un surfactante catiónico (cetrimida) (B) Esquema de la estructura química de la molécula de un surfactante aniónico (dodecil sulfato de amonio) (C) Esquema de la estructura química de un surfactante no iónico (Tween 80) (D) Esquema de la estructura química de un surfactante zwitterion (fosfolípido de huevo) (Velloso y Landoni, 2022)

Los surfactantes son uno de los excipientes más efectivos para lograr el mejoramiento de la permeabilidad de fármacos a través de las mucosas (Bhise y col., 2014).

El agregado de surfactante en las formulaciones intranasales podría modificar la permeabilidad facilitando la absorción nasal de fármacos (Chhajed y col., 2011). Además, han sido extensamente utilizados en formulaciones aerosolizadas y, no solo reducen la tensión superficial en agua, sino que también facilitan la atomización de la formulación (Kulkarni y Shaw, 2015).

Algunos de ellos, sin embargo, pueden ocasionar irritación nasal, toxicidad epitelial y actividad ciliostática (Bhise y col., 2014), como es el caso del cloruro de benzalconio, que es tóxico para los cilios (Quadri y col., 1999) y el laureth-9, que induce alteraciones morfológicas en el epitelio (Ennis y col., 1990) e inhibe el transporte mucociliar en condiciones *in vitro* (Gizurarson y col., 1990).

1.4.2.4. Ácidos biliares, sus sales y derivados

Los ácidos biliares son moléculas anfifílicas que en su estructura química poseen un núcleo esteroide de cuatro anillos, de gran tamaño, rígido y plano (figura 6) (Moghimpour y col., 2015; Pavlović y col., 2018).

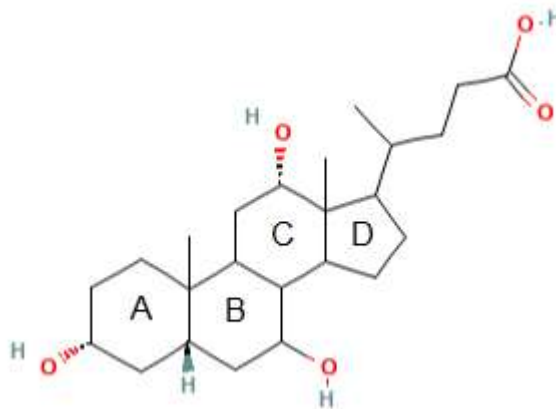


Figura 6: Estructura de los ácidos biliares. El núcleo esteroide consiste en cuatro anillos (A, B, C y D). El lado cóncavo es hidrofílico y el lado convexo, hidrofóbico (Moghimpour y col., 2015)

Cuando se combinan con lípidos polares, surfactantes convencionales o fármacos anfifílicos forman micelas simples o mixtas y de esta manera facilitan el pasaje transcelular y mejoran la penetración de fármacos (Stojančević y col., 2013, Velloso y Landoni, 2022). Además

pueden formar otros sistemas vesiculares que actúan como mejoradores de la penetración de fármacos como bilosomas (compuestos por sales biliares y liposomas), micelas de tamaño nanométrico, estructuras hiperramificadas e hidrogeles (Faustino y col., 2016; Moghimipour y col., 2015; Pavlović y col., 2018).

Los mecanismos de acción de las sales biliares como mejoradores de penetración incluyen el incremento de la fluidez de la membrana, la formación reversible de micelas en la membrana biológica y la creación de canales acuosos. Además, pueden reducir la viscosidad y elasticidad de la capa de moco adherida a las superficies mucosas e inhibir la acción de las peptidasas. También, se ha reportado que estas sustancias pueden inducir la apertura reversible de la barrera hematoencefálica (Lalić-Popović y col., 2013; Moghimipour y col., 2015; Pavlović y col., 2018).

Se ha reportado que el uso de los ácidos biliares hidrófobos como excipientes farmacéuticos presenta graves efectos secundarios, como daño hepático, asociado a su acumulación en este órgano (Pavlović y col., 2018), y, en el caso específico del ácido desoxicólico, promoción de tumores (Berstein y col., 2011). En la administración IN el uso de algunos ácidos biliares como el desoxicolato de sodio, puede causar inhibición leve del aclaramiento mucociliar (Quadri y col., 1999) e irritación nasal (Moses y col., 1983).

1.4.2.5. *Taurodihidrofusidato de sodio*

El taurodihidrofusidato de sodio (STDHF por sus siglas en inglés) es un derivado semisintético de la sal sódica del ácido fusídico (Beaudoin y col., 1975; Lee y col., 1992; Longenecker y col., 1987).

El STDHF fue utilizado extensamente como mejorador de la penetración IN para fármacos de naturaleza peptídica y proteica. Su uso como mejorador de penetración se asoció a un incremento en la biodisponibilidad de proteínas y péptidos como insulina, calcitonina, hormona de crecimiento y octreótido administradas IN (Bhise y col., 2014).

Se ha reportado que STDHF mejora la absorción de fármacos inhibiendo la actividad de las proteasas y se ha propuesto también que forma poros transitorios en las membranas lipídicas (Dondeti, 1991).

Con respecto a su toxicidad tisular, se reportó un efecto leve sobre la morfología de la mucosa nasal con una ligera influencia sobre el movimiento ciliar (Behl y col., 1998; Hermens y col., 1990).

El STDHF tiene dos limitaciones muy importantes. Una de ellas es la tendencia de promover la agregación de proteínas y péptidos a un pH por debajo de sus puntos isoeléctricos que da como resultado una disminución de su solubilidad. Otra limitación es que su capacidad como mejorador de la penetración varía ampliamente de acuerdo a la proteína, convirtiéndolo en un mejorador de penetración específico (Lee y col., 1992).

1.4.2.6. Fosfolípidos

Estas sustancias son lípidos que en su estructura química contienen fósforo, una cabeza hidrofílica y una cola hidrofóbica. Se clasifican dependiendo de su fuente de obtención como sintéticos y naturales (Drescher y van Hoogevest, 2020; Li y col., 2015).

Los fosfolípidos son sustancias anfifílicas capaces de autoensamblarse en estructuras coloidales como liposomas, emulsiones o microsferas lipídicas. Además, tienen características emulsificantes y humectantes que les otorga la capacidad de estabilizar emulsiones; tienen baja toxicidad y pueden usarse en formulaciones para distintas vías de administración (Drescher y van Hoogevest, 2020; Ishii y Nii, 2005; Li y col., 2015)

Con respecto a su uso en la vía de administración IN, un estudio en humanos comparó la absorción de una formulación de insulina conteniendo el fosfolípido didecanoil-L- α -fosfatidilcolina como mejorador de la penetración con las vías subcutánea e IV; reportando que con este excipiente, la absorción IN fue rápida, con una biodisponibilidad 8,3% mayor que la de la vía SC y con irritación leve a nula (Drejer y col., 1992). Además el uso de liposomas del fosfolípido dipalmitoilfosfatidilcolina y colesterol para la administración de aciclovir por vía IN en forma de hidrogel en conejos mostró un significativo aumento de la permeabilidad del fármaco (Alsarra y col., 2008).

1.5. BUTORFANOL

El tartrato de butorfanol es un fármaco utilizado frecuentemente en equinos para el tratamiento del dolor moderado a severo (Sellon y col., 2001).

Este fármaco es un opioide sintético cuya fórmula molecular es $C_{25}H_{35}NO_8$ y su estructura química (sal tartrato) es 1-N-ciclobutilmetil-6, 10 α β -dihidroxi-1, 2, 9, 10 α hexahidro-(4H) 10,4 α -imino-etanofenantreno la cual se muestra en la figura 7 (Cárdenas Tirado, 2010; Dias y col., 2014; Yarbrough y col., 2014). Se presenta como un polvo cristalino de sabor amargo escasamente soluble en agua (logP de 3,77) (Grassin-Delye y col., 2012; Plumb, 2006).

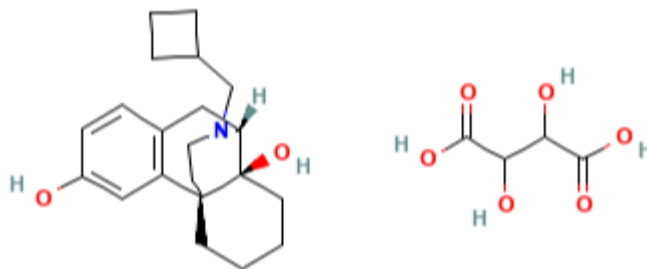


Figura 7: Estructura química del tartrato de butorfanol

El butorfanol, al igual que la buprenorfina, son compuestos de estructura fenantrénica clasificados como agonistas parciales de los receptores opioides. Estos compuestos exhiben, sobre estos receptores, efectos agonistas y antagonistas. Al unirse al receptor μ inducen una respuesta intrínseca más baja comparado con los agonistas μ potentes como la morfina, por esto se los denomina agonistas débiles. Contrariamente, son potentes agonistas a nivel del receptor κ . Esta

característica, les otorga un perfil analgésico caracterizado por una potente analgesia espinal y periférica y más pobre a nivel supraespinal (Vogelsang y Hayes, 1991). Es importante remarcar que debido a su débil agonismo μ , pueden competir con agonistas μ más potentes y en estas circunstancias, comportarse como antagonistas (Ferreira, 2020).

Se considera que el butorfanol tiene, en base molar, una potencia analgésica entre 4 a 7 veces superior a la morfina, 15 a 30 veces superior a la pentazocina y 30 a 50 veces superior que la meperidina (Fang y col., 2016; Plumb, 2006).

Para el tratamiento del dolor en equinos, este fármaco se administra generalmente por vía IV, en forma de bolo o infusión, cada 3-4 horas a una dosis de 0,1-0,4 mg/kg (Papich, 2015). El butorfanol por vía oral no tiene buena absorción debido al efecto de primer paso hepático; solo alrededor de la sexta parte de la dosis administrada alcanza la circulación sistémica. Tras su administración IM su biodisponibilidad no supera el 40% (Sellon y col., 2009). En la actualidad, las presentaciones comerciales autorizadas en el mercado argentino para uso en equinos están indicadas para administración IV.

Cuando se administra por vía IV en caballos, la acción comienza aproximadamente a los 3 min post-administración y alcanza el efecto analgésico máximo entre los 15 y 30 min. La duración de acción puede llegar a las 4 horas luego de una sola dosis (Plumb, 2006).

En un estudio realizado en equinos por Sellon y col., (2009) se determinó que la absorción del butorfanol por vía IM es muy rápida (la

vida media de absorción fue de 6 min), pero su biodisponibilidad baja (37%). El volumen de distribución fue 1,1 l/kg y el aclaramiento corporal 21 ml/kg/min.

El butorfanol tiene buena distribución y alcanza los niveles más elevados en el hígado, riñones e intestino (Plumb, 2006). Las concentraciones en pulmones, glándulas endócrinas, bazo, corazón, tejido adiposo y células sanguíneas son más elevadas que las plasmáticas (Plumb, 2006). En seres humanos, alrededor del 80% se une a proteínas plasmáticas (Plumb, 2006), en equinos este valor no ha sido reportado.

Hasta el momento la identificación exacta de los metabolitos en equinos no ha sido reportada (Keen y col., 2021), pero se asume que es metabolizado de la misma manera que en humanos. En esta especie, el butorfanol se metaboliza en el hígado mediante hidroxilación, N-alquilación y conjugación. Los metabolitos que se generan carecen de actividad analgésica y se eliminan por orina, bilis y heces en forma de hidroxibutorfanol (aproximadamente 50% de la dosis), norbutorfanol libre o conjugado (aproximadamente 11 % de la dosis), y butorfanol libre (7% de la dosis).

El butorfanol está contraindicado en pacientes con hipersensibilidad conocida a la droga y debe utilizarse cuidadosamente en pacientes con hipotiroidismo, insuficiencia renal grave, insuficiencia adrenocortical y en animales muy debilitados o de avanzada edad (Plumb, 2006).

Los efectos adversos en equinos pueden incluir ataxia y sedación transitoria, pero también excitación (Plumb, 2006). Si bien parece causar menos excitación que los agonistas totales de los receptores μ , como la morfina, es usual que se administre simultáneamente con un tranquilizante debido a la posibilidad de un aumento de la actividad locomotora o excitación, la cual depende de la dosis aplicada (Fang y col., 2016). A dosis altas (0,5 a 1 mg/kg) administradas en forma de bolo intravenoso rápido se presenta excitación transitoria (tironeo, sacudidas de cabeza, aumento de la ambulación, respuesta de evasión aumentada ante estímulos auditivos; dosis mayores (1 a 2 mg/kg) pueden causar nistagmo, salivación, convulsiones, hipertemia y reducción de la motilidad gastrointestinal. Igualmente, se considera que estos efectos son de carácter transitorio (Fang y col., 2016; Plumb, 2006).

Respecto al butorfanol administrado por vía IN, Ferreira (2020) evaluó la aplicabilidad de esta vía como alternativa a la administración IV en el tratamiento del dolor en equinos (Ferreira, 2020) y concluyó que es una vía práctica, no estresante y bien tolerada. La absorción fue rápida ($T_{1/2}$ abs: $0,426 \pm 0,320$ h) con una biodisponibilidad de $54,45 \pm 20,09\%$.

De aquí se desprende que la vía IN es muy promisorio para la administración de fármacos de acción central, como los analgésicos opiáceos, gracias a su gran potencial de absorción sistémica y pasaje directo al SNC. Estos resultados abren la puerta al estudio profundo del desarrollo de formulaciones de butorfanol para administración IN en equinos.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar y evaluar clínicamente una formulación de butorfanol para uso en equinos.

2.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el efecto de solubilizantes en la difusión de butorfanol a través de la mucosa olfatoria equina.
- Evaluar el efecto de solubilizantes en la difusión de butorfanol a través de la mucosa respiratoria nasal equina.
- Evaluar el efecto de surfactantes en la difusión de butorfanol a través de la mucosa olfatoria equina.
- Evaluar el efecto de surfactantes en la difusión de butorfanol a través de la mucosa respiratoria nasal equina.
- Describir la cinética plasmática y biodisponibilidad de la formulación desarrollada que muestre *in vitro* el mejor perfil de difusión.
- Describir y cuantificar la eficacia analgésica de la formulación desarrollada que muestre *in vitro* el mejor perfil de difusión.

3. HIPÓTESIS MÁS RELEVANTES

- La aplicación de datos especie-específicos de las características anatómicas, histológicas y fisiológicas de la cavidad nasal del equino permitirá desarrollar una formulación de butorfanol de administración intranasal con máxima biodisponibilidad.
- La biodisponibilidad de las formulaciones para administración intranasal para equinos es significativamente mayor cuando se adicionan solubilizantes y/o surfactantes.
- Debido al pasaje directo desde la cavidad nasal al sistema nervioso central (vía nervios olfatorio y trigémino) la analgesia tiene menor tiempo de latencia y una menor concentración efectiva 50 (EC50%).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. SECCIÓN *IN VITRO*: ESTUDIO DE LA PENETRABILIDAD DE FORMULACIONES INTRANASALES DE BUTORFANOL EN EQUINOS

4.1.1. LUGAR DE TRABAJO

Las formulaciones fueron elaboradas en el laboratorio de la Cátedra de Farmacología General y Clínica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata.

Para el estudio de las formulaciones control, FI y FIII las mucosas de la cavidad nasal procedentes de equinos sanos se obtuvieron del servicio de necropsia de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata y se transportaron en una conservadora con refrigerantes hacia el laboratorio de la Cátedra de Farmacología General y Clínica de dicha facultad donde se realizó el estudio *in vitro*.

La mucosa nasal equina utilizada para estudiar la formulación FII fue gentilmente donada por el frigorífico equino LAMAR S.A., ubicado en Mercedes, Provincia Buenos Aires y analizada en las instalaciones de la Chacra Experimental Mercedes del Ministerio de Desarrollo Agrario de la Provincia de Buenos Aires, en la Ciudad de Gowland.

4.1.2. COMPOSICIÓN DE LAS FORMULACIONES

La composición de las formulaciones desarrolladas en este trabajo de tesis se muestra en tabla 1 y se expresa como g/100 ml de agua

destilada. El ácido cítrico, citrato de sodio y cloruro de sodio fueron obtenidos en Laboratorios Cicarelli SRL (Santa Fe, Argentina). El bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) fue comprado en Anedra Research AG SA (Buenos Aires, Argentina). El bromuro de dodeciltrimetilamonio (DTAB) fue comprado en Merck Argentina (Buenos Aires, Argentina) y el monooleato de polioxietilen sorbitano 80 (tween 80) fue gentilmente donado por la Cátedra de Farmacotecnia de la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.

Tabla 1: Composición de las formulaciones desarrolladas (g/100 ml de agua destilada)

	Formulación control	Formulación I (FI)	Formulación II (FII)	Formulación III (FIII)
Ácido cítrico	0,33	0,33	0,33	0,33
Citrato de sodio	0,64	0,64	0,64	0,73
Cloruro de sodio	0,64	0,64	0,64	0,64
CTAB	-	0,03	-	-
DATB	-	-	0,03	-
Tween 80	-	-	-	0,03
Tartrato de butorfanol	3	3	3	3

CTAB: Bromuro de cetiltrimetil amonio; DATB: Bromuro de dodeciltrimetilamonio; Tween 80: monooleato de polioxietilen sorbitano 80

4.1.3. MÉTODO DE PREPARACIÓN DE LAS FORMULACIONES

Para elaborar las formulaciones desarrolladas y estudiadas en este trabajo, primero se prepararon los vehículos. Para ello se pesaron cada uno de los componentes en una balanza analítica (Ohaus, Adventurer), se colocaron en un frasco de vidrio graduado con tapa, se añadió el volumen necesario de agua destilada y se mezcló en shacker (DeCaLab), con buzo magnético, a temperatura ambiente hasta la completa disolución de los

componentes. Para el caso particular de FIII, existió una pequeña variación en su composición debido a la presencia de tween 80, que se presenta en estado líquido; se pesaron todos los componentes sólidos, se agregó la cantidad requerida de agua destilada y, mientras la solución se agitaba en shacker muy suavemente, se añadieron 33 μ l de tween 80 (respetando la proporción $0,030 \text{ g} \equiv 0,033 \text{ ml} \equiv 33 \mu\text{l}$) evitando la formación de espuma.

Una vez superada esta etapa se continuó con el siguiente paso que consistió en tomar una alícuota de 8 ml del vehículo, colocarla en un tubo de ensayo de vidrio y agregarle tartrato de butorfanol sólido en una concentración de 3 % p/v.

Para obtener soluciones homogéneas, cada formulación fue sometida a agitación/vortex durante 10 minutos (Thorbell, modelo VR-1) seguido por sonicación de 15 minutos (sonicador Testlab) y, finalmente, agitación con shacker durante 10 minutos.

Una vez elaboradas, las formulaciones se protegieron de la luz natural envolviendo los tubos de ensayo con papel aluminio y se guardaron en la heladera hasta su uso posterior (generalmente, no más de 24 horas).

Una hora antes de su utilización en el ensayo *in vitro*, las formulaciones se retiraron de la heladera para que alcanzaran la temperatura ambiente.

4.1.4. CELDAS DE DIFUSIÓN DE FRANZ

Para realizar el estudio *in vitro* de la penetrabilidad de las formulaciones de butorfanol a través de mucosas nasales equinas se utilizó un equipo de celdas de difusión de Franz de tipo encadenado con soporte térmico magnético termostatzado (Figura 8 A).

Las celdas de Franz (Figura 8) son recipientes bicompartimentales de vidrio que permiten realizar estudios de permeabilidad bajo condiciones controladas. En la figura 8 B se muestra cada una de las partes que constituyen una celda de Franz.

Las celdas se componen de dos cámaras o celdas, la donora y la aceptora, que se encuentran separadas por la membrana a través de la cual se pretende evaluar la difusión del fármaco de una cámara hacia otra, en este caso mucosa nasal equina (Figura 8, C).

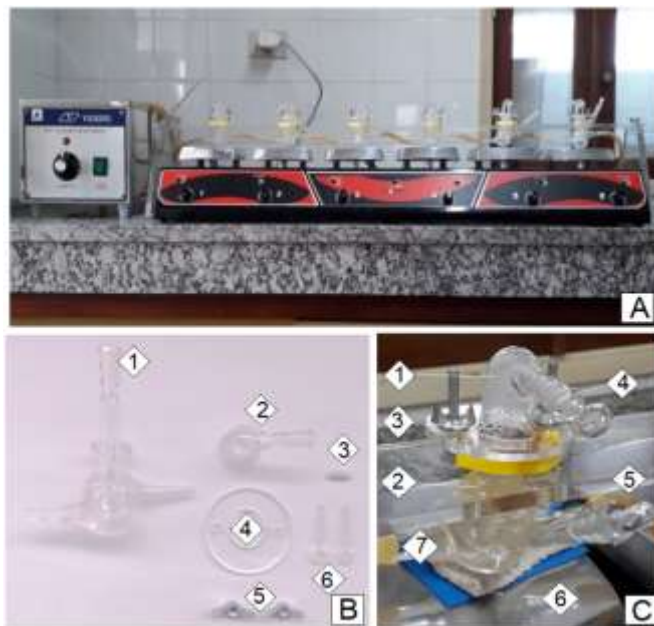


Figura 8: (A) Equipo utilizado en los ensayos. Seis celdas de Franz (asentadas sobre placas termo-magnéticas) conectadas entre sí y a un baño térmico
 (B) Celda de Franz desmontada. 1: Cámara aceptora; 2: Cámara donora; 3: Buzo magnético; 4: Arandela plana de plástico; 5: Tuercas mariposas de hierro; 6: Tapones de vidrio de los brazos de los compartimentos
 (C) Celda Franz montada. 1: Cámara donora; 2: Cámara aceptora; 3: Mucosa nasal equina; 4: Desprendimiento o tubuladura de la cámara donora; 5: Desprendimiento o tubuladura de la cámara aceptora; 6: Plancha de agitación magnética; 7: Camisa de agua

En el compartimento superior (cámara donora), se agrega la formulación que se desea testear. El compartimento inferior (cámara aceptora) posee un desprendimiento o tubuladora lateral desde la cual se extraen muestras a intervalos regulares de tiempo en las que se cuantifica la molécula de interés mediante técnicas analíticas.

4.1.5. PUESTA A PUNTO DEL ENSAYO DE PENETRACIÓN IN VITRO A TRAVÉS DE MUCOSA NASAL EQUINA

4.1.5.1. *Ensayo de viabilidad de mucosa nasal equina*

Antes de realizar el ensayo *in vitro* para la determinación de la velocidad de penetración de las formulaciones, se determinaron las condiciones más apropiadas con las que debía utilizarse la mucosa nasal durante el ensayo.

Para ello se extrajo una muestra de mucosa nasal de un equino sacrificado minutos antes (no más de 60 minutos) y se dividió en seis porciones. Dos de ellas (mucosa nasal equina fresca: MNEF), se colocaron frescas en un recipiente con formol al 10%. Las siguientes cuatro se congelaron en freezer durante 5 días. Transcurrido ese tiempo, dos porciones se pusieron en un recipiente con formol al 10% (mucosa nasal equina congelada: MNEC) y las últimas dos, se sumergieron en medio de Hanks a 4°C durante 24 horas y una vez pasado el tiempo de incubación, se colocaron en un recipiente con formol al 10% (mucosa nasal equina congelada + Hanks: MNECH). La composición de la solución de Hanks (expresada en g/l) se muestra en la tabla 2. Para su elaboración, cada uno de los componentes se pesó en una balanza analítica y se disolvió en agua destilada, asegurándose la correcta disolución aplicando agitación con shaker. La solución fue almacenada a 4 °C hasta su uso posterior.

Tabla 2: Composición de la solución de Hanks (g/l) utilizada para el descongelado de mucosa nasal

Solución de Hanks	
Cloruro de sodio	8
Cloruro de potasio	0,4
Cloruro de calcio	0,14
Sulfato de magnesio heptahidratado	0,1
Cloruro de magnesio hexahidratado	0,1
Hidrogenofosfato de disodio	0,06
Dihidrógenofosfato de potasio	0,06
Glucosa	1
Bicarbonato de sodio	0,35

Los recipientes de formol con las muestras fueron enviados al Servicio de Patología Anatómica de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata donde se llevó a cabo la evaluación histopatológica.

4.1.6. ENSAYO IN VITRO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA VELOCIDAD DE PENETRACIÓN UTILIZANDO CELDAS DE DIFUSIÓN DE FRANZ

Se utilizaron las mucosas nasales de cuatro equinos extraídas dentro de su primera hora de muerte. Por cada animal utilizado, se analizó una única formulación. Las mucosas nasales equinas se lavaron con solución fisiológica estéril y fría, se secaron cuidadosamente con papel tissue, para luego cortarlas en cuadrados simétricos de 4 cm de lado. Se distinguieron las regiones olfatoria y respiratoria y se montaron sobre las celdas de difusión de Franz.

Por cada estudio se utilizaron seis celdas de difusión de Franz (figura 8 A). Las cámarasceptoras se cargaron con solución fisiológica estéril, y sobre su boca esmerilada se colocó una porción de mucosa nasal tomando la precaución de que el lado de la mucosa apuntara hacia el compartimento superior. Las áreas de difusión fueron de $1,23 \text{ cm}^2$.

A tiempo cero, a través del desprendimiento de la cámara donora se agregó 1 ml de la formulación de butorfanol a analizar (correspondiente a una dosis de $24,4 \text{ mg/cm}^2$) utilizando una cánula de 4 cm de longitud adosada a una jeringa hipodérmica descartable; esto permitió evitar que la formulación tocara las paredes de la celda y favoreció el vertido directo sobre la mucosa.

Desde el desprendimiento lateral de la cámara aceptora se extrajeron alícuotas de 800 μl cada una hora durante un total de 7 horas. Para la toma de muestras se utilizó una sonda de alimentación nasogástrica de 2,3 mm de calibre (Bio-Fil, Laboratorio Filenza SRL, Buenos Aires, Argentina) acoplada a una jeringa hipodérmica descartable. Las muestras fueron guardadas en tubos de plástico, limpios y previamente rotulados. A efectos de mantener las condiciones de sumidero ("sink") cada alícuota removida de la cámara aceptora fue reemplazada por el mismo volumen de solución fisiológica fresca.

Durante todo el estudio se mantuvieron constantes la temperatura y la velocidad de agitación. La temperatura se conservó estable gracias a un flujo constante de agua proveniente de un baño térmico de $37 \text{ }^\circ\text{C}$ a través de las camisas térmicas que rodeaban las celdas. La velocidad del

flujo de agua (100 l/h) desde el baño térmico hacia las camisas de las celdas de Franz se mantuvo constante mediante el uso de una bomba sumergible (Kangde, modelo BL-109).

La velocidad de agitación permaneció constante a través de las placas de agitación acopladas a las celdas, que regulaban las revoluciones por minuto de los buzos magnéticos en el interior de las cámarasceptoras.

Una vez finalizado el ensayo, las muestras fueron almacenadas en freezer hasta el dosaje de butorfanol y las mucosas fueron enviadas al Servicio de Patología Anatómica de la Facultad de Ciencias Veterinarias para la evaluación de la viabilidad.

4.1.7. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

4.1.7.1. *Metodología y preparación del material*

Debido a la inexistencia de un método eficaz y económico para medir concentraciones de butorfanol en muestras de pequeño volumen fue necesario desarrollar y validar uno innovador.

El método desarrollado durante la realización del trabajo de tesis utilizó microplacas de plástico uniformemente planas y gruesas para proporcionar superficies ópticamente transparentes y detección espectrofotométrica horizontal UV/Vis.

La validación del método se realizó en dos días consecutivos para estimar la variabilidad intradía e interdía.

Se partió de una solución madre de butorfanol de concentración 1000 µg/ml con la cual se realizaron los siguientes patrones 0,5 - 1,0 - 3,0 - 5,0 - 10,0 - 20,0 - 30,0 - 40,0 - 50,0 y 60,0 µg/ml, utilizando como solvente un buffer acetato 0,1 M pH 4,4. La selección de este rango se basó en las concentraciones de butorfanol teóricamente esperadas en las muestras obtenidas en los estudios *in vitro*.

La solución madre se realizó pesando el tartrato de butorfanol en una balanza analítica, disolviéndose en metanol grado HPLC (J.T. Baker, Avantor, Inc, Pensilvania, USA) aplicando agitación/vortex hasta su homogeneización.

Para la preparación del buffer acetato 0,1 M pH 4,4 se realizaron dos soluciones; una solución de ácido acético 0,2 M (solución A) y otra de acetato de sodio de la misma concentración (solución B). Para obtener la solución A se disolvieron 11,55 ml de ácido acético glacial en 1 l de agua destilada y para la solución B se pesaron 27,2 g de acetato de sodio (3 H₂O) y se disolvieron en 1 l de agua destilada.

Finalmente se obtuvo la solución buffer acetato, mezclando 305,0 ml de la solución A, 195,0 ml de la solución B y agua destilada hasta completarse el litro en un frasco de vidrio que se agitó hasta obtener una solución homogénea. Se comprobó su pH, midiéndolo a temperatura ambiente mediante un pHmetro digital de mesada (Altronix, modelo EZDO-PC).

Las soluciones patrón se realizaron el día del ensayo a temperatura ambiente. Una vez lista la batería de patrones, cada concentración se

sembró en una placa de 96 pocillos por octuplicado a un volumen de 100 μl por pocillo. La absorbancia se midió utilizando un espectrofotómetro de lectura horizontal (Thermoscientific Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific). Para seleccionar la longitud de onda apropiada, se realizó un espectro de absorción de concentración en un amplio rango de longitudes de onda sobre la placa a estudiar y se vio un pico máximo cerca de la región 280 nm. Este dato fue reforzado por bibliografía.

Las muestras fueron leídas por triplicado a una longitud de onda de 280 nm.

Al día siguiente, se repitió este protocolo, con la diferencia que se utilizaron dos soluciones madres nuevas, cada una con su correspondiente batería de patrones, sembradas en sus respectivas placas, respetando todas las condiciones con las que se había desarrollado el protocolo del día uno.

4.1.7.2. *Cálculos y estadística*

Para cada concentración se determinaron la media, el desvío estándar y el coeficiente de variación porcentual.

Se corrigieron las concentraciones, restando el promedio de los blancos. Se graficó la absorbancia en función de la concentración y sobre este gráfico se hizo una regresión lineal de la cual se obtuvieron la pendiente, la ordenada al origen, el coeficiente de correlación lineal y el coeficiente de determinación de la recta.

Desde las curvas obtenidas, se extrapolaron las concentraciones para obtener las concentraciones reales y se calculó el porcentaje de recuperación. Luego se calcularon las medias, los desvíos estándar y los coeficientes de variación.

Se hizo la estimación de reproducibilidad y la evaluación de la repetitividad. Asimismo, se estimó la linealidad, la exactitud, el límite de detección (LD) y el límite cuantificación (LC). El análisis estadístico de los datos fue realizado mediante el test de t de Student donde el límite de significación fue establecido en 5%.

4.1.8. DOSAJE DE LAS CONCENTRACIONES DE BUTORFANOL DE LAS MUESTRAS OBTENIDAS EN LOS ESTUDIOS DE PENETRACIÓN IN VITRO

Las concentraciones de butorfanol en las muestras obtenidas fueron estimadas a través del método espectrofotométrico desarrollado y validado. Se trabajó con placas paralelas, para muestras y para curvas de calibración, aun cuando la lectura se llevó a cabo en el mismo momento.

Las curvas de calibración se construyeron con las siguientes concentraciones: 1,0 - 3,0 - 5,0 - 10,0 - 20,0 - 30,0 - 40,0 - 50,0 - 60,0 - 80,0 y 100,0 $\mu\text{g/ml}$ utilizando como solvente solución buffer acetato 0,1 M pH 4,4. Las curvas de calibración se sembraron en una microplaca UV de 96 pocillos (100 μl por pocillo) por octuplicado utilizando un dispensador de líquidos (MiniLab201) con jeringas de 1,25 ml. Una de las calles se sembró con buffer acetato para utilizarla como blanco.

El día del estudio, las muestras obtenidas en el ensayo *in vitro* fueron descongeladas a temperatura ambiente y sometidas a agitación/vortex durante 1 minuto. Las muestras fueron cargadas manualmente en una placa de 96 pocillos UV por duplicado (100 μ l por pocillo) utilizando un dispensador de líquidos con jeringas de 1,25 ml. Dos calles se sembraron con solución fisiológica para utilizarlas como blanco.

Las concentraciones de butorfanol fueron dosadas por espectrofotometría UV a una longitud de onda de 280 nm aplicando la metodología descrita en el punto anterior.

Para realizar la curva de calibración, se obtuvieron los valores de absorbancia a 280 nm de las soluciones patrón, se promediaron y se corrigieron respecto al promedio del blanco, para luego graficarlas en función de la concentración (μ g/ml). Con estos datos graficados, se realizó una regresión lineal de los datos de la cual se obtuvo la pendiente, la ordenada al origen, el coeficiente de correlación lineal y el coeficiente de determinación de la recta.

Con respecto a las muestras, se obtuvieron las absorbancias promedio, las cuales se corrigieron respecto al blanco y, con las absorbancias corregidas, se calcularon las concentraciones extrapoladas utilizando los valores de la pendiente y de la ordenada al origen de la recta obtenida en el gráfico de la curva de calibración. A continuación, se utilizaron los valores de las concentraciones extrapoladas, para obtener la cantidad de butorfanol a partir de la ecuación:

$$Q(\mu\text{g}) = (\text{concentración extrapolada}) \times (\text{volumen de la celda aceptora})$$

4.1.9. CÁLCULO DE LOS COEFICIENTES Y VELOCIDADES DE PERMEABILIDAD

Por cada una de las porciones de mucosa testada, se construyó una curva cantidad acumulativa de butorfanol sobre área de difusión ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) en función del tiempo (h). A partir de estas curvas se estimaron los parámetros tiempo lag (t_{lag}), flujo en estado estacionario (J_{ss}) y el coeficiente de permeabilidad (K_p). El procedimiento que se realizó para obtener estos parámetros se presenta a continuación.

Los valores de cantidad de fármaco obtenidos en la sección 4.1.8, fueron divididos por el área de difusión, a efectos de estimar la cantidad de butorfanol sobre área de difusión (Q/A) a cada tiempo muestral. Luego, con los valores de Q/A se realizó la suma acumulativa para cada tiempo. Con los valores de Q/A acumulativa, se construyeron los gráficos de cantidad acumulativa de butorfanol sobre área de difusión ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) en función del tiempo (h) para cada una de las celdas. Sobre estos gráficos, se hicieron regresiones lineales, las que se utilizaron para obtener los parámetros t_{lag} , J_{ss} y K_p .

4.1.9.1. Cálculo de parámetros

El tiempo lag (t_{lag}), se expresó en horas (h) y fue el cociente entre el valor de la ordenada al origen de la curva cantidad acumulativa de butorfanol sobre área de difusión ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) en función del tiempo (h) y su pendiente.

El flujo en estado estacionario (J_{ss} , ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \text{ h}$)) fue el valor de la pendiente de la porción lineal de la curva cantidad acumulativa de butorfanol sobre área de difusión ($\mu\text{g} / \text{cm}^2$) en función del tiempo (h).

El coeficiente de permeabilidad (K_p (cm/h)) fue calculado a partir de la siguiente ecuación: $K_p = \frac{J_{ss}}{C_d}$ dónde C_d es la concentración inicial de fármaco en la celda donora, asumiendo que se cumple la condición de sumidero.

En la tabla 3 se muestran, a modo de ejemplo, los cálculos realizados para una celda de Franz de una sola formulación. El procedimiento fue el mismo para el resto de las celdas y formulaciones.

Aquellos parámetros obtenidos desde una misma formulación y misma mucosa, se agruparon para obtener su promedio, el desvío estándar y el coeficiente de variación porcentual.

Tabla 3: Cálculos para la obtención de la curva cantidad acumulativa de butorfanol sobre área de difusión ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) en función del tiempo (h) para una porción de mucosa equina, de una formulación

Celda	Tiempo	Absorbancia	Absorbancia promedio	Absorbancia corregida	Concentración extrapolada	Q	Q/A	Σ Q/A
A	1	Abs ₁	Abs _{T1}	Abs _{CT1} = Abs _{T1} - Abs blanco	C _{EXTRAPOLADA T1} = (Abs _{CT1} + b) / a	Q _{T1} = C _{EXTRAPOLADA T1} X (volumen de la celda aceptora)	Q _{T1} /A = Q/A TIEMPO 1	Q/A TIEMPO 1
		Abs ₂						
	2	Abs ₃	Abs _{T2}	Abs _{CT2} = Abs _{T2} - Abs blanco	C _{EXTRAPOLADA T2} = (Abs _{CT2} + b) / a	Q _{T2} = C _{EXTRAPOLADA T2} X (volumen de la celda aceptora)	Q _{T2} /A = Q/A TIEMPO 2	Q/A TIEMPO 1 + Q/A TIEMPO 2
		Abs ₄						
	3	Abs ₅	Abs _{T3}	Abs _{CT3} = Abs _{T3} - Abs blanco	C _{EXTRAPOLADA T3} = (Abs _{CT3} + b) / a	Q _{T3} = C _{EXTRAPOLADA T3} X (volumen de la celda aceptora)	Q _{T3} /A = Q/A TIEMPO 3	Q/A TIEMPO 1 + Q/A TIEMPO 2 + Q/A TIEMPO 3
		Abs ₆						
	4	Abs ₇	Abs _{T4}	Abs _{CT4} = Abs _{T4} - Abs blanco	C _{EXTRAPOLADA T4} = (Abs _{CT4} + b) / a	Q _{T4} = C _{EXTRAPOLADA T4} X (volumen de la celda aceptora)	Q _{T4} /A = Q/A TIEMPO 4	Q/A TIEMPO 1 + Q/A TIEMPO 2 + Q/A TIEMPO 3 + Q/A TIEMPO 4
		Abs ₈						
	5	Abs ₉	Abs _{T5}	Abs _{CT5} = Abs _{T5} - Abs blanco	C _{EXTRAPOLADA T5} = (Abs _{CT5} + b) / a	Q _{T5} = C _{EXTRAPOLADA T5} X (volumen de la celda aceptora)	Q _{T5} /A = Q/A TIEMPO 5	Q/A TIEMPO 1 + Q/A TIEMPO 2 + Q/A TIEMPO 3 + Q/A TIEMPO 4 + Q/A TIEMPO 5
		Abs ₁₀						
	6	Abs ₁₁	Abs _{T6}	Abs _{CT6} = Abs _{T6} - Abs blanco	C _{EXTRAPOLADA T6} = (Abs _{CT6} + b) / a	Q _{T6} = C _{EXTRAPOLADA T6} X (volumen de la celda aceptora)	Q _{T6} /A = Q/A TIEMPO 6	Q/A TIEMPO 1 + Q/A TIEMPO 2 + Q/A TIEMPO 3 + Q/A TIEMPO 4 + Q/A TIEMPO 5 + Q/A TIEMPO 6
		Abs ₁₂						

$$t_{\text{lag}} = \frac{b'}{a'}$$

$$K_p = \frac{J_{ss}}{C_d}$$

$$J_{ss} = a'$$

A: Área de difusión; a: pendiente de la recta de la curva de calibración; b: ordenada al origen de la recta obtenida de la curva de calibración. a': pendiente de la recta del gráfico cantidad acumulativa de butorfanol sobre área de difusión en función del tiempo b': ordenada al origen de la recta obtenida del gráfico de cantidad acumulativa de butorfanol sobre área de difusión en función del tiempo

4.1.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS COEFICIENTES Y VELOCIDADES DE PERMEABILIDAD

Los parámetros J_{ss} , K_p y t_{lag} obtenidos fueron estadísticamente analizados utilizando el software Statgraphics Centurion XVI.II (Statpoint Technologies Inc).

Previamente, se verificó que los datos cumplieran la condición de independencia, normalidad y homogeneidad de varianza utilizando las pruebas de Shapiro-Wilk y Lavene. Luego, los valores de J_{ss} , K_p y t_{lag} de las formulaciones control, FI, FII y FIII de las regiones respiratoria y olfatoria equina fueron comparados realizando un análisis de varianza (ANOVA). También se compararon cada uno de los parámetros entre las regiones olfatoria y respiratoria utilizando la prueba t de Student.

4.2. SECCIÓN *IN VIVO*: Parte I: DESCRIPCIÓN DE LA DISPOSICIÓN PLAMÁTICA DE BUTORFANOL TRAS LA ADMINISTRACIÓN INTRANASAL E INTRAVENOSA DE LA FORMULACIÓN DESARROLLADA

4.2.1. LUGAR DE TRABAJO

En el laboratorio de la cátedra de Farmacología General y Clínica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata se elaboró la formulación IN utilizada en este ensayo y se realizó la cuantificación de butorfanol en las muestras obtenidas.

La toma de muestras tras la administración IN e IV de FIII, se realizó en el establecimiento “Don Joaquín”, perteneciente a la Universidad Nacional de La Plata que se encuentra ubicado en la ciudad de Magdalena, provincia Buenos Aires.

4.2.2. FORMULACIÓN

A partir de los resultados obtenidos en la sección I de este trabajo, se procedió a realizar la descripción de la disposición plasmática de butorfanol tras la administración IN utilizando FIII, cuyo mejorador de la penetración era tween 80.

Para llevar a cabo esta parte de la investigación, se requirió que la formulación tuviera una concentración de butorfanol mayor que la utilizada en la sección *in vitro*. Es por ello que la formulación FIII debió adaptarse hasta alcanzar su objetivo. Cada uno de los componentes de la

formulación se incrementó de manera proporcional en función de la concentración de butorfanol deseada. Se ensayaron formulaciones de concentraciones entre 4 % p/v y 5 % p/v, y finalmente se seleccionó el uso de una formulación al 4,5 % p/v, porque resultó ser la solución más estable.

La formulación de butorfanol IN utilizada en el ensayo fue realizada el día del estudio siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 4.1.2. Para su transporte al sitio del ensayo, el recipiente fue protegido de la luz natural con papel aluminio.

4.2.3. ESTUDIO DE LA DISPOSICIÓN PLASMÁTICA DE BUTORFANOL TRAS SU ADMINISTRACIÓN INTRANASAL E INTRAVENOSA EN EQUINOS

Para realizar este estudio se utilizaron cuatro equinos hembra de raza Silla Argentina, sanos con un peso de $540 \pm 8,16$ kg y una edad promedio de 4 años. Durante todo el ensayo, los animales fueron tratados humanitariamente y permanecieron en un predio abierto, techado con acceso libre a la iluminación natural.

El estudio se llevó a cabo siguiendo un diseño *cross-over* de dos vías. Este diseño permitió que cada animal experimental recibiera butorfanol por las vías IV (bolo) e IN.

Se dejó transcurrir un período de 2 semanas entre cada fase del *cross-over* (*wash-out*) a efectos de asegurar la eliminación de concentraciones efectivas de fármaco.

En la parte I del estudio, a tiempo 0, dos animales recibieron butorfanol a la dosis de 0,05 mg/kg por la vía IV en forma de bolo lento y 2 animales recibieron la misma dosis de butorfanol por vía IN.

En el periodo II, los tratamientos fueron administrados de manera tal que cada animal experimental recibió, en turno, cada uno de ellos, usando un diseño de Cuadrado Latino.

Los animales experimentales fueron sometidos a ayuno durante las 8 horas previas y 4 posteriores a la administración del fármaco.

Una hora antes de la administración de butorfanol por las vías ensayadas, los cuatro animales fueron cateterizados con un Abbocat 14G colocado en la vena yugular izquierda para toma de muestras (figura 9).

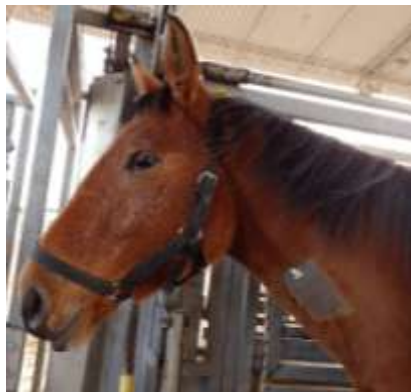


Figura 9: Equino con la vena yugular izquierda cateterizada para la toma de muestras sanguíneas

Para la administración IV se utilizó una solución acuosa de butorfanol al 1% (Butormin[®], Laboratorio Holliday-Scott, Argentina).

La formulación IN utilizada fue la FIII, con una concentración final de butorfanol de 4,5 % p/v.

Previamente a la administración IN se realizó la higiene completa de ambos ollares con algodón y agua destilada. La aplicación del fármaco fue en el ollar derecho y el dispositivo de administración utilizado fue el mismo que se había empleado en ensayos anteriores (Ferreira, 2020). El dispositivo estaba compuesto por un actuador nasal, una bomba spray monodosis calibrada en 200 μ l/disparo (Coster Packaging, Argentina) y un recipiente donante (figura 10 A y B). Cada animal recibió tres disparos, cantidad que había sido previamente calculada basándose en los pesos de los animales de experimentación.



Figura 10: A) 1: Actuador nasal; 2: Recipiente donante; 3 Bomba spray monodosis calibrada en 200 μ l/disparo, (Coster Packaging, Argentina) B) Dispositivo utilizado para la administración IN de butorfanol

Una vez finalizada la administración del butorfanol se extrajeron muestras sanguíneas (5,0 ml) con jeringa descartable a través del catéter a los siguientes tiempos: 0 – 5 – 15 – 10 – 15 – 30 – 45 – 90 - 180 y 300 minutos.

Las muestras obtenidas se colocaron en tubos cónicos plásticos con EDTA (Wiener lab) y se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos (DCS-16-RV, Presvac). El plasma fue separado con ayuda de una pipeta

Pasteur y envasado en tubos de plástico, limpios y rotulados que se almacenaron en freezer hasta el análisis de las concentraciones de butorfanol.

La manipulación de los animales de experimentación fue realizada por médicos veterinarios, siguiendo las recomendaciones brindadas por la Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL).

4.2.4. DOSAJE DE LAS MUESTRAS OBTENIDAS DEL ENSAYO DE DISPOSICIÓN PLASMÁTICA TRAS APLICACIÓN INTRANASAL E INTRAVENOSA DE BUTORFANOL

4.2.4.1. *Curva de calibración*

Se partió de una solución madre de butorfanol de concentración 1000 ng/ml. Esta solución se realizó pesando butorfanol y disolviéndolo en 100,0 ml de metanol grado HPLC (J.T. Baker, Avantor, Inc, Pensilvania, USA). A continuación se realizó una dilución 1:10 usando como solvente buffer acetato 0,1 M pH 4,4 y con esta última se realizaron patrones de concentraciones 0,30 – 0,65 – 1,25 – 2,5 – 5,0 y 10 ng/ml, utilizando plasma equino como diluyente.

El plasma utilizado se obtuvo extrayendo sangre a un equino sano mediante una jeringa descartable. La sangre se colocó en tubos cónicos plásticos con EDTA y se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos

(DCS-16-RV, Presvac). El plasma se separó con ayuda de una pipeta Pasteur y fue guardado en freezer hasta su uso.

Los patrones se sembraron en la placa de NeoGen (Butorphanol equine ELISA kit, NeoGen, Argentina) a un volumen de 20 μ l por pocillo por duplicado.

4.2.4.2. *Dosaje de las muestras*

Para realizar el dosaje de butorfanol en las muestras plasmáticas obtenidas en el ensayo *in vivo* se utilizó un kit específico para equinos (Butorphanol equine ELISA kit, NeoGen, Argentina). Este test se basa en la competencia entre el butorfanol presente en la muestra y el conjugado fármaco-enzima por un número limitado de sitios de unión a anticuerpos.

Las muestras de plasma obtenidas en el ensayo de disposición plasmática fueron descongeladas a temperatura ambiente y se les aplicó agitación/vortex durante 1 minuto.

Las muestras de los tiempos 5 a 45 minutos conseguidas luego de la aplicación IV de butorfanol fueron diluidas en una proporción 1:1 utilizando plasma equino. Esto se realizó porque los resultados esperados caían por fuera del rango de linealidad del método de cuantificación.

A continuación, las muestras se sembraron en la placa mediante un dispensador de líquidos con jeringa de 0,5 ml a un volumen de 20 μ l por pocillo. Los tiempos 5 y 10 minutos se sembraron por duplicado.

Luego, en cada pocillo se agregaron 180 μ l de solución diluida 1:180 del conjugado fármaco-enzima. La placa se cubrió y la mezcla se dejó incubar por 45 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente se hicieron tres lavados con solución buffer de lavado y se colocaron 150 μ l de solución k-blue® (solución de 2-pirrolidona) en cada pocillo. La placa se incubó nuevamente a temperatura ambiente, pero esta vez por 30 minutos. Se añadieron 50 μ l de solución HCl 1 N y a continuación se midió la absorbancia en un espectrofotómetro de lectura horizontal (Thermoscientific Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific) a 450 nm, longitud de onda sugerida por el fabricante.

4.2.5. ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO

Las curvas de disposición de butorfanol tras su administración IV e IN se analizaron por técnicas de análisis no compartimentales, que se basan en un procedimiento de estimación conocido como el método de los momentos (Gibaldi y Perrier, 1982).

La estimación de los parámetros farmacocinéticos se llevó a cabo utilizando el modelo de cálculo basado en la estimación del área bajo la curva (AUC), descrito por el perfil concentración – tiempo. En este caso, la estimación del AUC se realizó mediante la aplicación de la regla trapezoidal clásica.

La estimación de los parámetros y constantes farmacocinéticos se realizó de acuerdo a las ecuaciones clásicas (Gibaldi y Perrier, 1982).

Los valores de $C_{\text{máx}}$ y $T_{\text{máx}}$ se obtuvieron por observación directa de la curva concentración plasmática en función del tiempo

Los análisis estadísticos descriptivos consistieron en la estimación de las medidas de tendencia central (media) y de dispersión (desvío estándar). Los análisis estadísticos inferativos se realizaron aplicando el test de Mann Withney.

4.3. SECCIÓN *IN VIVO*. Parte II: EVALUACIÓN CLÍNICA DEL EFECTO ANALGÉSICO TRAS LA ADMINISTRACIÓN INTRANASAL DE LA FORMULACIÓN DESARROLLADA

4.3.1. LUGAR DE TRABAJO

La formulación IN utilizada en este ensayo se elaboró en el laboratorio de la cátedra de Farmacología General y Clínica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata.

El ensayo se llevó a cabo en el Servicio de Medicina y Cirugía de Grandes Animales en el Hospital Escuela de la Universidad Nacional de La Plata.

4.3.2. FORMULACIÓN

La evaluación cuantitativa de la analgesia en equinos se realizó utilizando FIII, cuyo mejorador de la penetración era tween 80, en una concentración de butorfanol de 4,5 % p/v.

La formulación de butorfanol IN utilizada fue realizada el día del estudio siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 4.1.2. La formulación III fue envasada en el dispositivo de aplicación, y para su transporte al sitio del ensayo el recipiente fue protegido de la luz natural con papel aluminio.

4.3.3. ESTUDIO DE LA EFICACIA ANALGÉSICA DE BUTORFANOL TRAS SU ADMINISTRACIÓN INTRANASAL E INTRAVENOSA EN EQUINOS

Para esta etapa del estudio se utilizaron tres equinos machos castrados con una edad $7,3 \pm 2,8$ años y un peso de $360,3 \pm 41,9$ kg.

El estudio se llevó a cabo siguiendo un diseño cruzado (*cross-over*) de tres vías. Este diseño permitió que cada animal experimental recibiera el vehículo de la formulación IN (control) y butorfanol por las vías IV (bolo) e IN.

Se dejó transcurrir un período de limpieza (*washout*) de 2 semanas entre cada fase del *cross-over* a efectos de asegurar la eliminación de las concentraciones efectivas de fármaco.

En la parte I del estudio, a tiempo 0, un animal recibió el vehículo de la formulación IN por la vía IN en volumen adecuado al peso (grupo A), uno recibió butorfanol a la dosis de 0,05 mg/kg por la vía IV en forma de bolo (grupo B) y el tercer animal recibió la misma dosis de butorfanol por vía IN, utilizando FIII (grupo C).

- **Grupo A (control)**. A tiempo cero los animales recibieron mediante el dispositivo de administración IN (descrito en la sección 4.2.3) el vehículo de la formulación. El número de disparos requerido para cada equino fue calculado en base a los disparos que hubieran requerido en caso de haber sido tratados con la solución acuosa de butorfanol al 4,5 % para vía IN.

- **Grupo B.** A tiempo cero los animales recibieron por la vía IV una solución acuosa de butorfanol al 1% (Butormin[®], Laboratorio Holliday-Scott, Argentina) a la dosis de 0,05 mg/kg. Para la administración IV se utilizó un catéter previamente colocado en la yugular izquierda.

- **Grupo C.** A tiempo cero los animales recibieron FIII de butorfanol al 4,5 % por la vía IN, a la dosis de 0,05 mg/kg. El número de disparos requerido para cada uno de los equinos en cuestión fue calculado en base a la dosis según el peso de cada animal.

Una vez finalizada la administración, la evaluación de la calidad analgésica del tratamiento se determinó, en todos los animales del estudio, mediante la medición del tiempo de latencia del reflejo corneal (TLRC) a los 0 -2 - 5 - 15 - 30 - 45 - 60 y 120 minutos.

4.3.4. MEDICIÓN DEL TIEMPO DE LATENCIA DEL REFLEJO CORNEAL

Durante las tomas de muestras, los animales fueron contenidos por un operario mediante sujeción simple (bozal y cabestro).

A efectos de disminuir la variabilidad se utilizó exclusivamente el ojo izquierdo de cada animal, estando siempre la estimulación del reflejo a cargo de un mismo operador.

El reflejo corneal se indujo a través de la aplicación de un estímulo mecánico, sobre la superficie de la córnea, según la técnica descrita por Gilger (2005), consistente en la aplicación de leve presión de contacto con un hisopo de algodón comercial descartable (figura 11).



Figura 11: Inducción del reflejo corneal mediante estímulo mecánico (hisopo) según Gilger, 2005

La secuencia completa, desde la aplicación del estímulo hasta el fin del reflejo (contacto completo entre el párpado superior e inferior), fue filmada con una videgrabadora JBC Everio 62MS150SU.

El tiempo de latencia del reflejo corneal (TLRC) fue cuantificado contando el número de fotogramas que componían la secuencia completa del reflejo a través del programa editor de videos VideoPad (NCH software).

Durante todo el estudio los animales fueron tratados humanitariamente y permanecieron dentro de las instalaciones de la Facultad de Ciencias Veterinarias, en un predio abierto y techado con acceso libre a iluminación natural. La manipulación de los animales fue realizada por médicos veterinarios, siguiendo las recomendaciones de CICUAL.

Luego del ensayo, a cada animal se le aplicó una gota de fluoresceína sobre el ojo testeado, seguido por observación directa para garantizar que sus córneas no habían sido dañadas durante el ensayo.

4.3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las áreas bajo la curva para el TLRC (AUC_{RC} y $AUC_{\%A}$) fueron calculadas aplicando la siguiente ecuación (Mattheuws y col., 1990).

$$AUC = 0.5 \sum_{i=0}^{n-1} (t_{i+1} - t_i) (y_i + y_{i+1})$$

Donde t es el tiempo de obtención de la muestra e “ y ” es la medición observada.

Los análisis estadísticos descriptivos consistieron en la estimación de las medidas de tendencia central (media) y de dispersión (desvío estándar) de los valores de TLRC observados y de los estandarizados de acuerdo a los valores basales de cada animal de experimentación.

Las diferencias entre tratamientos fueron evaluadas comparando las áreas bajo la curva de TLRC normalizado por basal vs tiempo aplicando el test ANOVA. Los datos fueron transformados, previamente utilizando la fórmula: $\arcseno\left(\frac{dato}{100}\right)$

Los análisis estadísticos descriptivos e inferenciales, fueron realizados aplicando el software Statgraphics Centurion XVI.II. El límite de significación estadística fue fijado en 5%.

5. RESULTADOS

5.1. SECCIÓN *IN VITRO*: ESTUDIO DE LA PENETRABILIDAD DE FORMULACIONES INTRANASALES DE BUTORFANOL EN EQUINOS

5.1.1. PUESTA A PUNTO DEL ENSAYO DE PENETRACIÓN *IN VITRO* A TRAVÉS DE MUCOSA NASAL EQUINA

5.1.1.1. *Ensayo de viabilidad de mucosa nasal equina*

Con el objetivo de determinar las condiciones más apropiadas que debía poseer la mucosa nasal equina para utilizarla en el ensayo de penetración *in vitro* de las formulaciones de butorfanol, se compararon las características histológicas de dos porciones de mucosa nasal equina frescas (MNEF) y cuatro porciones congeladas (MNEC). De estas últimas porciones, dos fueron posteriormente hidratadas en el medio Hanks (MNECH). El análisis histopatológico realizado por el Servicio de Patología Anatómica en la Facultad de Ciencias Veterinarias determinó que las muestras MNEF presentaron una buena conservación de la mucosa y submucosa (figura 12 A). Sin embargo, para las muestras MNEC (figura 12 B) se reportó una avanzada autólisis con separación de las fibras colágenas y, de manera similar, para las muestras MNECH (figura 12 C) se reportó moderada a avanzada autólisis.

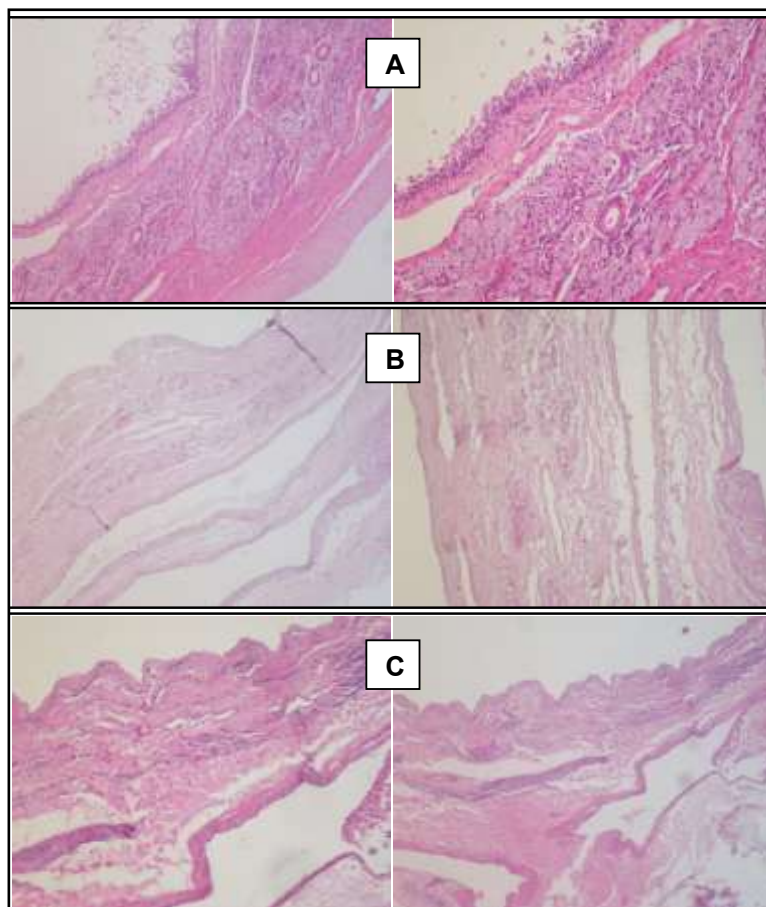


Figura 12: Estructura histológica de mucosas equinas con distintos tratamientos de conservación. A: MNEF (H&E. Obj. 20x (fotos izquierda), 40x (foto derecha)); B: MNEC (H&E. Obj. 20x); C: MNECH (H&E. Obj. 20x (foto izquierda), 10x (foto derecha))

Este resultado reflejó que las mucosas frescas tuvieron un mejor estado de conservación.

A partir de estas conclusiones, los ensayos de penetrabilidad *in vitro* de las formulaciones de butorfanol realizadas en este trabajo de tesis se llevaron a cabo usando mucosas nasales equinas provenientes de animales sanos dentro de la primera hora de sacrificado el animal.

Un estudio piloto sobre el efecto irritante de los vehículos de las formulaciones a ensayar de acuerdo al plan de doctorado presentado, demostró que la formulación referida como IV que contenía cloruro de

bencetonio (0,030 g/100 ml) como aumentador de la penetrabilidad inducía un potente efecto irritante (figura 13) que provocó graves lesiones de la mucosa. El diagnóstico histopatológico, reportó; *“la mucosa no presenta epitelio. En la lámina propia se identifica el tejido conectivo con las fibras de colágeno separadas, observándose entre ellas, espacios sin colorear (edema). En la lámina propia superficial se reconocen vasos linfáticos dilatados (infangiectasia)”*. Basado en el reporte se decidió retirar la formulación del estudio.

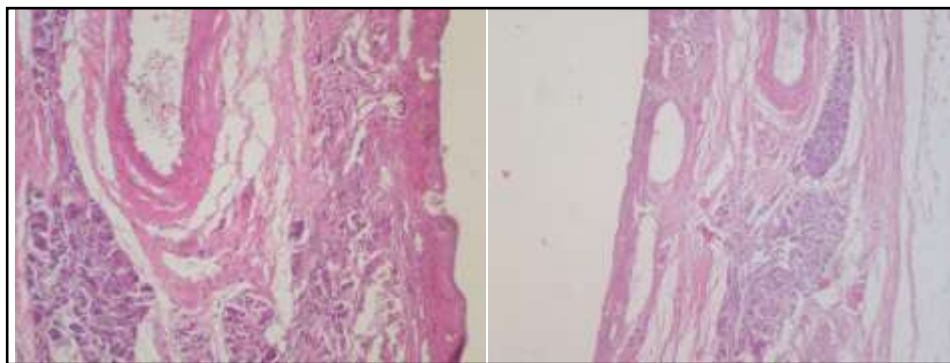


Figura 13. Estructura histológica de mucosa fresca equina tras su contacto por 2 horas con el vehículo de la formulación IV (mencionada en el plan de Tesis) que conteniendo cloruro de bencetonio a la concentración de 0,03%. H&E. Obj. 20x (foto izquierda) y 10x (foto derecha)

5.1.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

En la tabla 4 se muestran los valores de las ordenadas al origen, de las pendientes, los coeficientes de determinación y de regresión obtenidos de las rectas generadas a partir de las regresiones lineales de los gráficos absorbancias corregidas ($\lambda = 280 \text{ nm}$) en función de la concentración.

Tabla 4: Ordenadas al origen, pendientes, r y r^2 de las rectas obtenidas en los gráficos absorbancias corregidas en función de la concentración

Día	1						2		
	Ensayo 1			Ensayo 2			Ensayo 1		
Lectura	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Ordenada al origen	0,0055	0,0128	0,0128	0,0066	0,0068	0,0077	0,0056	0,0048	0,0032
Pendiente	0,0010	0,0010	0,0010	0,0012	0,0012	0,0012	0,0007	0,0007	0,0007
r^2	0,983	0,993	0,981	0,980	0,992	0,982	0,994	0,990	0,996
r	0,991	0,996	0,991	0,990	0,996	0,991	0,997	0,995	0,993

El coeficiente de regresión lineal promedio de las curvas generadas de las placas intradía e interdía fue de $0,993 \pm 0,004$ y los valores de las ordenadas al origen de las rectas fueron cercanos a cero.

Dado que el valor del coeficiente de regresión aceptado internacionalmente es 0,98 se verifica la linealidad en el rango de concentraciones de butorfanol entre 0,5 y 60 $\mu\text{g/ml}$.

Además, se determinó que el porcentaje de recuperación fue de $98,3 \pm 3,6 \%$, la repetitividad del 8,5 % y la reproducibilidad 11,0 %. Estos resultados estuvieron dentro de los límites aceptables. Los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) fueron 0,5 y 1 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente.

Como consecuencia de estos resultados, se pudo concluir que fue posible validar el método espectrofotométrico para la cuantificación de butorfanol en el rango de concentraciones utilizado.

Esta metodología no solo resultó ser más económica que otras técnicas analíticas como HPLC/MS, sino que también contó con la ventaja de medir diferentes concentraciones de fármaco en forma simultánea, con

menor manipulación del equipo y permitió la realización de numerosas réplicas.

5.1.3. ENSAYO IN VITRO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA VELOCIDAD DE PENETRACIÓN UTILIZANDO CELDAS DE DIFUSIÓN DE FRANZ

5.1.3.1. *Formulación control*

Se realizó el ensayo de penetración *in vitro* a través de mucosa nasal equina fresca utilizando celdas de difusión de Franz para la formulación control. La formulación control estaba compuesta por ácido cítrico, citrato de sodio, cloruro de sodio y butorfanol.

Los valores obtenidos de absorbancia corregida se graficaron en una curva de cantidad acumulativa de butorfanol sobre área de difusión ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) en función del tiempo (h) y se aplicó una regresión lineal. En la tabla 5, se muestran los valores de las pendientes, ordenadas al origen, coeficientes de determinación y de correlación para cada curva construida.

Tabla 5: Pendientes, ordenadas al origen, r^2 y r obtenidos de la regresión lineal de la curva cantidad acumulativa de butorfanol sobre área de difusión en función del tiempo utilizando la formulación control (n= 2 olfatorias; 2 respiratorias)

Naturaleza de la mucosa	Curva Q(t)/A			
	Pendiente	Ordenada al origen	r^2	r
Olfatoria	1496,4	752,54	0,9983	0,99915
Olfatoria	1691,4	-890,33	0,9987	0,99935
Respiratoria	362,26	-465,84	0,9606	0,9801
Respiratoria	297,51	-492,14	0,8941	0,94557

En la Tabla 6 se presentan los valores medios, desvío estándar y coeficiente de variación porcentual de los parámetros de permeabilidad, J_{ss} , K_p y t_{lag} para cada una de las porciones de mucosa empleadas.

Tabla 6: Promedios, desvíos estándar (DS) y coeficientes de variación porcentual (CV%) de J_{ss} , K_p y t_{lag} de las regiones olfatoria y respiratoria de la mucosa nasal equina utilizando la formulación control

Naturaleza de la mucosa	J_{ss} ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \text{ h}$)			K_p (cm/h)			t_{lag} (h)		
	Media	DS	CV%	Media	DS	CV%	Media	DS	CV%
Olfatoria	1593,9	137,89	8,6508	0,065351	0,0056534	8,6508	-0,011743	0,72782	-6197,8
Respiratoria	329,88	45,785	13,879	0,013525	0,0018772	13,879	-1,4701	0,26041	-17,714

J_{ss} = flujo en estado estacionario; K_p = coeficiente de permeabilidad; t_{lag} = tiempo lag

5.1.3.2. Formulación I

Se procedió a realizar el mismo procedimiento experimental, cálculos y análisis estadísticos utilizando FI. FI estaba compuesta por ácido cítrico, citrato de sodio, cloruro de sodio, CTAB y butorfanol.

Los valores de las pendientes, ordenadas al origen, coeficientes de determinación y de correlación obtenidos de las curvas de cantidad acumulativa de butorfanol sobre área de difusión ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) en función del tiempo (h) se muestran en la tabla 7:

Tabla 7: Pendientes, ordenadas al origen, r^2 y r obtenidos de la regresión lineal de la curva cantidad acumulativa de butorfanol sobre área de difusión en función del tiempo utilizando FI (n= 4 olfatorias; 2 respiratorias)

Naturaleza de la mucosa	Curva Q(t)/A			
	Pendiente	Ordenada al origen	r^2	r
Olfatoria	1048,6	-175,37	0,9949	0,99745
Olfatoria	2126,8	-1592,8	0,9955	0,99775
Olfatoria	2065,8	-710,95	0,9988	0,9994
Olfatoria	2426,1	-2579,4	0,9826	0,99126
Respiratoria	137,63	121,8	0,9837	0,99182
Respiratoria	275,27	-275,32	0,9611	0,98036

En la Tabla 8 se presentan los valores medios, desvíos estándar y coeficientes de variación porcentual de los parámetros de permeabilidad, J_{ss} , K_p y t_{lag} para cada una de las porciones de mucosa empleadas.

Tabla 8: Promedios, desvíos estándar (DS) y coeficientes de variación porcentual (CV%) de J_{ss} , K_p y t_{lag} de las regiones olfatoria y respiratoria de la mucosa nasal equina utilizando FI

Naturaleza de la mucosa	J_{ss} ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \text{ h}$)			K_p (cm/h)			t_{lag} (h)		
	Media	DS	CV%	Media	DS	CV%	Media	DS	CV%
Olfatoria	1916,8	599,85	31,294	0,078591	0,024594	31,294	-0,58087	0,40332	-69,433
Respiratoria	206,45	97,326	47,143	0,0084645	0,0039904	47,143	-0,057600	1,333	-2314,2

J_{ss} = flujo en estado estacionario; K_p = coeficiente de permeabilidad; t_{lag} = tiempo lag

5.1.3.3. Formulación II

Se siguió el procedimiento detallado en la sección 4.1.6 utilizando FII. Su composición fue similar al control, solo que además contenía el mejorador de penetración DTAB.

En la tabla 9 se muestran las pendientes, ordenadas al origen, coeficientes de determinación y de correlación obtenidos de las curvas de cantidad acumulativa de butorfanol sobre área de difusión ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) en función del tiempo (h).

Tabla 9: Pendientes, ordenadas al origen, r^2 y r obtenidos de la regresión lineal de las curvas cantidad acumulativa de butorfanol sobre área de difusión en función del tiempo utilizando FII (n= 3 respiratorias; 3 olfatorias)

Naturaleza de la mucosa	Curva Q(t)/A			
	Pendiente	Ordenada al origen	r^2	r
Olfatoria	2356,9	-1452,1	0,99999	0,998
Olfatoria	1646,5	-1069,9	0,99745	0,9949
Olfatoria	2017,4	-2293,3	0,9985	0,997
Respiratoria	1538,2	-1532,2	0,99388	0,9878
Respiratoria	864,46	-305,1	0,9994	0,999
Respiratoria	1013,1	-822,33	0,99257	0,9852

En la Tabla 10 se presentan los valores medios, desvíos estándar y coeficientes de variación porcentual de los parámetros de permeabilidad, J_{ss} , K_p y t_{lag} para cada una de las porciones de mucosa empleadas.

Tabla 10: Promedios, desvíos estándar (DS) y coeficientes de variación porcentual (CV%) de J_{ss} , K_p y t_{lag} de las regiones olfatoria y respiratoria de la mucosa nasal equina utilizando FII

Naturaleza de la mucosa	J_{ss} ($\mu\text{g} / \text{cm}^2 \text{ h}$)			K_p (cm/h)			t_{lag} (h)		
	Media	DS	CV%	Media	DS	CV%	Media	DS	CV%
Olfatoria	2006,9	355,32	17,704	0,082600	0,014622	17,704	-1,3472	0,40709	-30,2165
Respiratoria	1138,59	353,96	31,088	0,046855	0,014566	31,088	-1,6898	0,99693	-59,001

J_{ss} = flujo en estado estacionario; K_p = coeficiente de permeabilidad; t_{lag} = tiempo lag

5.1.3.4. Formulación III

FIII tenía la misma composición química que la formulación control, pero además contaba con el agregado de tween 80.

Los valores de las pendientes, r , r^2 y ordenadas al origen de las regresiones lineales de las curvas cantidad acumulativa de butorfanol sobre área de difusión ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) en función del tiempo (h) se muestran en tabla 11.

Tabla 11: Pendientes, ordenadas al origen, r^2 y r obtenidos de las regresiones lineales de las curvas cantidad acumulativa de butorfanol sobre área de difusión en función del tiempo utilizando FIII (n= 3 respiratoria; 2 olfatoria)

Naturaleza de la mucosa	Curva Q(t)/A			
	Pendiente	Ordenada al origen	r^2	r
Olfatoria	3567,5	-1976,1	0,99800	0,9990
Olfatoria	3870,4	-2905,5	0,99410	0,99705
Respiratoria	351,70	-284,19	0,99250	0,99624
Respiratoria	1683,8	-1707,6	0,96970	0,98473
Respiratoria	607,11	430,83	0,99120	0,99559

En la Tabla 12 se presentan los valores medios, desvíos estándar y coeficientes de variación porcentual de los parámetros de permeabilidad, J_{ss} , K_p y t_{lag} para cada una de las porciones de mucosa empleadas.

Tabla 12: Promedios, desvíos estándar (DS) y coeficientes de variación porcentual (CV%) de J_{ss} , K_p y t_{lag} de las regiones olfatoria y respiratoria de la mucosa nasal equina utilizando FIII

Naturaleza de la mucosa	J_{ss} ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \text{ h}$)			K_p (cm/h)			t_{lag} (h)		
	Media	DS	CV%	Media	DS	CV%	Media	DS	CV%
Olfatoria	3718,9	214,18	5,7592	0,15248	0,00878 16	5,7592	-0,65231	0,13914	-21,331
Respiratoria	880,87	706,99	80,26	0,03612	0,02899	80,26	-0,37085	0,94139	-253,85

J_{ss} = flujo en estado estacionario; K_p = coeficiente de permeabilidad; t_{lag} = tiempo lag

En la tabla 13 se presentan los parámetros de permeabilidad *in vitro* de butorfanol a través de la mucosa nasal equina (promedio \pm DS) para las cuatro formulaciones testeadas.

En el gráfico 1 se muestran las curvas cantidad acumulativa de butorfanol permeado a través de las regiones olfatorias y respiratorias de las mucosas equinas en función del tiempo para las cuatro formulaciones testeadas.

Tabla 13: Parámetros de permeabilidad *in vitro* de butorfanol a través de la mucosa nasal equina (promedio \pm DS) utilizando celdas de difusión de Franz para las cuatro formulaciones testeadas

Parámetro	Naturaleza de la mucosa	Formulación			
		Control	FI	FII	FIII
J_{ss} ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \text{ h}$)	Olfatoria	1593,9 \pm 137,89	1916,825 \pm 599,85	2006,9 \pm 355,32	3718,9 \pm 214,18
	Respiratoria	329,88 \pm 45,785	206,45 \pm 97,326	1138,6 \pm 353,96	880,87 \pm 706,99
K_p (cm/h)	Olfatoria	0,06535 \pm 0,005653	0,07859 \pm 0,02459	0,08259 \pm 0,014622	0,15248 \pm 0,0087816
	Respiratoria	0,01352 \pm 0,001877	0,008465 \pm 0,003990	0,04685 \pm 0,014567	0,03611 \pm 0,02899
t_{lag} (h)	Olfatoria	0,01174 \pm 0,7278	-0,5809 \pm 0,4033	-1,3472 \pm 0,4079	-0,65231 \pm 0,13914
	Respiratoria	-1,4701 \pm 0,26041	-0,05760 \pm 1,3330	-1,6897 \pm 0,9970	-0,3708 \pm 0,9414

J_{ss} = flujo en estado estacionario; K_p = coeficiente de permeabilidad; t_{lag} = tiempo lag

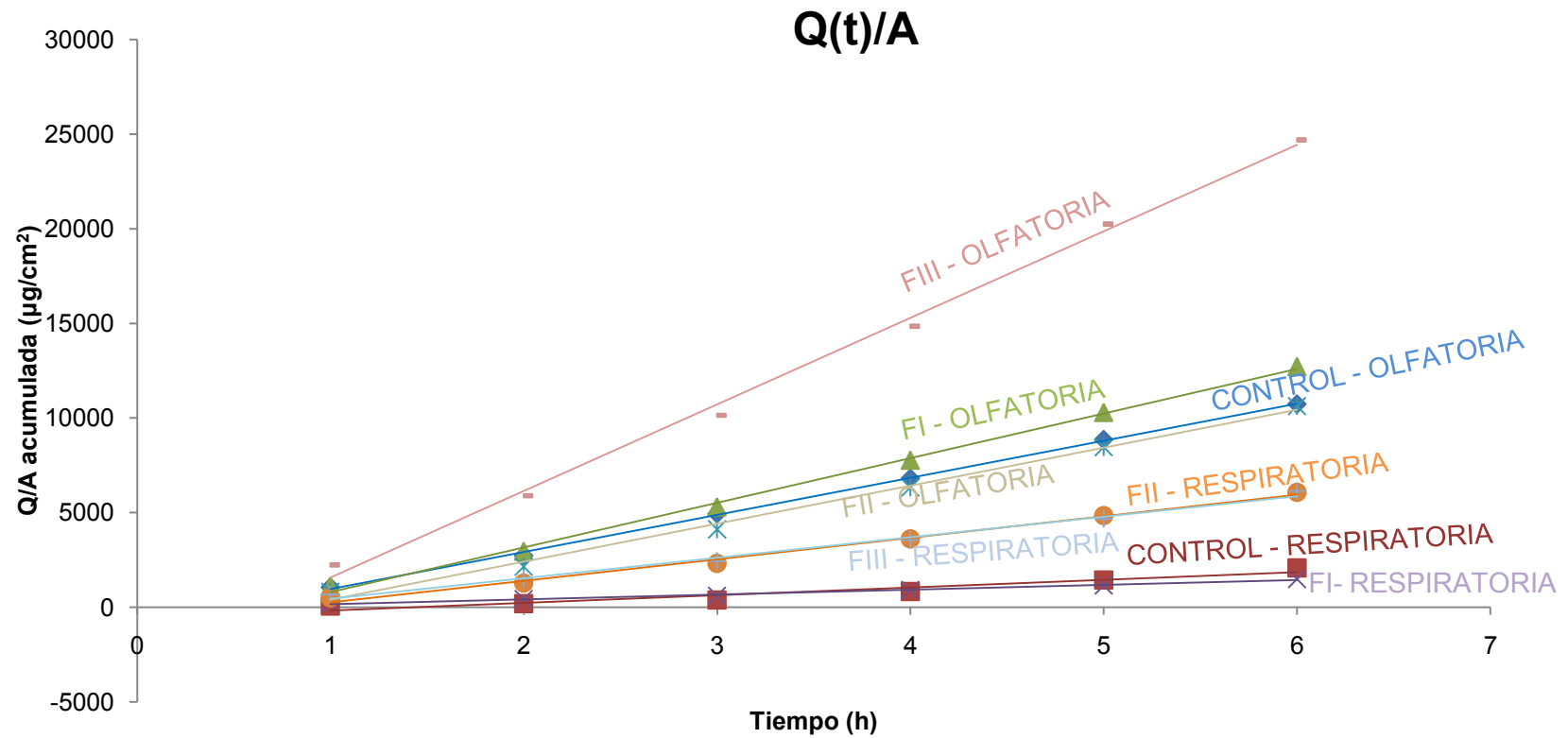


Gráfico 1: Curvas cantidad acumulada de butorfanol administrado a la dosis de $24,4 \text{ mg/cm}^2$ en función del tiempo permeada a través de mucosa nasal respiratoria y olfatoria equina para las cuatro formulaciones testeadas

Se analizaron estadísticamente los valores J_{ss} , K_p y t_{lag} obtenidos en este estudio. Se aceptaron las condiciones de normalidad de los parámetros J_{ss} , K_p y t_{lag} de las regiones olfatoria y respiratoria para todas las formulaciones utilizando el estadístico W de Shapiro-Wilk. Se aceptaron las condiciones de homogeneidad de varianza en todos los casos utilizando el test de Levene. Luego se compararon los valores de J_{ss} , K_p y t_{lag} de las regiones olfatorias y respiratorias de las formulaciones control, FI, FII y FIII realizando pruebas ANOVA.

Cuando se realizó el test ANOVA entre los valores de J_{ss} de butorfanol a través de la mucosa respiratoria equina usando las formulaciones control, FI, FII y FIII utilizando el límite de significación establecido de 5%, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, cuando se realizó el test ANOVA para los valores de J_{ss} de las regiones olfatorias, se detectaron diferencias altamente significativas ($p= 0,007$) entre las formulaciones para este parámetro. La aplicación de la prueba de rangos múltiples permitió determinar que el valor de J_{ss} de FIII de la región olfatoria fue significativamente diferente a los valores de las formulaciones control, FI y FII ($p= 0,03$).

No se detectaron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,1786$) entre los valores de K_p de butorfanol a través de la mucosa respiratoria equina utilizando las formulaciones testeadas. De manera similar a lo reportado para J_{ss} , el test ANOVA detectó diferencias altamente significativas ($p= 0,007$) para la mucosa olfatoria. Aplicando una

prueba de rangos múltiples se determinó que los valores de K_p de las regiones olfatorias de la formulación FIII, fueron significativamente diferentes a las formulaciones control, FI y FII ($p= 0,03$).

Para el t_{lag} no se observaron diferencias significativas entre las mucosas respiratorias y olfatorias para ninguna de las formulaciones testeadas.

La comparación entre las áreas respiratorias y olfatorias de cada uno de los parámetros para cada formulación mediante t-student, reportó diferencias estadísticamente significativas entre los valores de J_{ss} de las regiones olfatorias y respiratorias para las formulaciones control, FI, FII y FIII. También se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores K_p de las regiones olfatorias y respiratorias de las formulaciones control, FI, FII, y FIII. Sin embargo, cuando se compararon los valores t_{lag} de las regiones olfatoria y respiratoria no se observaron diferencias estadísticamente significativas para ninguna de las formulaciones estudiadas.

La formulación FIII, que cuenta con el agregado de tween 80, mostró una penetración *in vitro* por la mucosa olfatoria equina con valores de parámetros de J_{ss} y K_p estadísticamente diferentes a las formulaciones control, FI y FII.

Los resultados de este estudio indican que el tween 80 es el excipiente con mayor efectividad para incrementar la penetrabilidad *in vitro* del butorfanol a través de la región olfatoria de la mucosa nasal equina.

En comparación con el resto de las formulaciones ensayadas, FIII resultó ser la formulación que produjo un mayor pasaje del fármaco a través de la mucosa, razón por la cual se decidió continuar las etapas posteriores de este trabajo utilizando esta formulación.

5.2. SECCIÓN *IN VIVO*. PARTE I: ESTUDIO DE LA DISPOSICIÓN PLASMÁTICA DE BUTORFANOL TRAS LA ADMINISTRACIÓN INTRANASAL DE LA FORMULACIÓN DESARROLLADA

5.2.1. ESTUDIO DE LA DISPOSICIÓN PLASMÁTICA DEL BUTORFANOL TRAS SU ADMINISTRACIÓN INTRANASAL E INTRAVENOSA EN EQUINOS

Las curvas de disposición plasmática de butorfanol tras su aplicación IV e IN se presentan en el gráfico 2. Las concentraciones individuales, promedios y desvíos estándar de los animales experimentales a los distintos tiempos del muestreo luego de la aplicación IV e IN, se presentan en las tablas 14 y 15 respectivamente. En las tablas 16 y 17, se muestran los parámetros cinéticos obtenidos luego de la aplicación de butorfanol por las vías IV e IN.

Tras la administración IV, la concentración promedio observada al primer tiempo muestral fue de $18,39 \pm 1,99$ ng/ml. A los 10 minutos post-administración, la concentración promedio ($19,99 \pm 0,59$ ng/ml) fue levemente mayor, aunque el alto valor de desvío estándar en la muestra obtenida a los 5 minutos post-administración puede reflejar que este aumento haya sido una consecuencia de la variabilidad entre los animales experimentales. Las concentraciones plasmáticas se mantuvieron en todos los animales experimentales por encima del límite de cuantificación (0,27 ng/ml) hasta la hora 5 post-administración.

Tras la administración IN, las concentraciones fueron menores a las observadas tras la administración IV. El pico promedio de concentración fue de $9,24 \pm 1,70$ ng/ml y se presentó a los 15 minutos luego de la administración. La variabilidad inter-sujetos, especialmente en los últimos tiempos muestrales, fue importante.

De igual manera a lo observado tras la administración IV, las concentraciones plasmáticas de butorfanol se mantuvieron por encima del límite de detección en todos los animales hasta la hora 5 post-administración.

Tras su administración IV, el butorfanol se distribuyó ampliamente, con un volumen de distribución (V_{ss}) de $4,08 \pm 0,88$ l/kg y fue eliminado relativamente rápido, con un aclaramiento corporal (CIB) de $0,725 \pm 0,69$ l/h/kg y una vida media ($t_{1/2}$) de $4,46 \pm 3,78$ h. La eliminación presentó una amplia variación inter-sujeto, observándose dos sujetos en los cuales la eliminación fue más rápida comparada con los dos restantes.

La dosis real de butorfanol administrada por vía IN fue de $0,044 \pm 0,001$ mg/ml.

La absorción de butorfanol por vía IN fue relativamente rápida, con un tiempo máximo (T_{max}) de $18,75 \pm 7,5$ minutos y una biodisponibilidad (F) alta, de $49,84 \pm 27,49$ %. Cabe aclarar que el equino 2, mostró una biodisponibilidad significativamente más baja que el resto de los animales experimentales. De hecho, la exclusión de este sujeto eleva el valor de la media para este parámetro a $59,84 \pm 23,10$. La concentración máxima observada (C_{max}) fue de $10,29 \pm 0,65$ µg/ml.

El volumen de distribución fue de $0,524 \pm 0,41$ l/kg, la importante variabilidad inter-sujeto fue reflejo del alto valor observado en el equino 2. Una vez corregidos por la biodisponibilidad, los valores de este parámetro no fueron estadísticamente diferentes de los estimados tras la administración IV.

Con referencia al aclaramiento corporal, su valor de $0,231 \pm 0,22$ l/kg/h reflejó la rápida eliminación de la molécula con una vida media de eliminación de $3,04 \pm 3,37$ h.

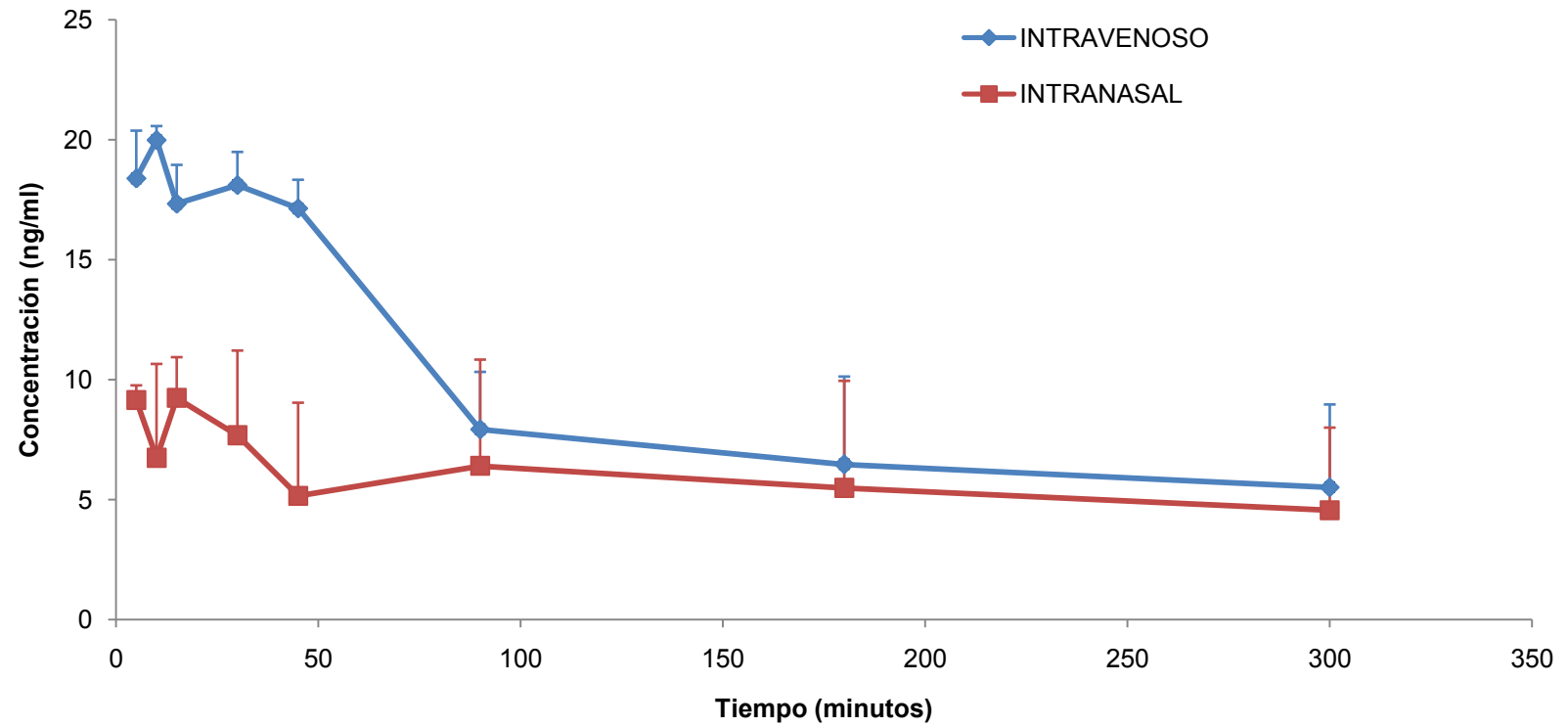


Gráfico 2: Concentración plasmática (media \pm DS) en función del tiempo de butorfanol tras su administración IV e IN a equinos a la dosis de 0,05 mg/kg (n=4)

Tabla 14: Concentraciones plasmáticas (ng/ml) de butorfanol, promedios y desvíos estándar para cada tiempo de muestreo luego de la administración IV de butorfanol a la dosis de 0,05 mg/kg (n=4)

Tiempo (min)	1	2	3	4	Media	DS
5	20,06	18,89	19,11	15,50	18,39	1,99
10	20,00	19,78	19,39	20,78	19,99	0,59
15	18,67	17,56	15,00	18,11	17,33	1,62
30	19,22	16,11	18,33	18,78	18,11	1,38
45	18,44	15,67	16,78	17,67	17,14	1,19
90	10,39	4,67	8,06	8,61	7,93	2,39
180	10,00	1,61	5,89	8,39	6,47	3,66
300	9,61	1,56	4,17	6,72	5,51	3,45

Tabla 15: Concentraciones plasmáticas (ng/ml) de butorfanol, promedios y desvíos estándar para cada tiempo de muestreo luego de la administración IN de butorfanol a la dosis de 0,05 mg/kg (n=4)

Tiempo (min)	1	2	3	4	Media	DS
5	9,44		8,44	9,56	9,15	0,61
10	8,94	9,06		2,22	6,74	3,91
15	10,69	9,72	6,78	9,75	9,24	1,70
30	10,39	4,00	11,00	5,33	7,68	3,53
45	10,56	1,50	5,06	3,50	5,15	3,88
90	9,89	0,23	6,17	9,33	6,40	4,43
180	10,11	0,33	3,33	8,17	5,49	4,46
300	7,72	0,23	3,39	6,89	4,56	3,44

Tabla 16: Parámetros cinéticos de butorfanol tras su administración IV en equinos a la dosis de 0,05 mg/kg aplicando un modelo no compartimental (n=4)

Parámetro	Unidad	1	2	3	4	Media	DS
Kel	1/h	0,22	0,593	0,188	0,073	0,219	0,26
$t_{1/2}$	horas	3,150	1,170	3,640	9,900	4,465	3,78
Tmax	min	5,000	10,000	10,000	10,000	8,750	2,50
Cmax	ng/ml	20,056	19,778	19,389	20,778	20,000	0,59
C0	ng/ml	20,111	18,889	19,111	15,500	18,403	2,01
AUC _{0-t}	ng/ml*min	3589,190	1632,323	2544,410	3050,130	2704,013	832,13
AUC _{0-∞}	ng/ml*min	29673,683	1789,878	3877,586	8581,895	10980,760	12781,59
Vss	l/kg	4,573	2,829	4,126	4,794	4,080	0,88
CIB	l/h/kg	0,101	1,676	0,774	0,350	0,725	0,69

Tabla 17: Parámetros cinéticos de butorfanol tras su administración IN en equinos a la dosis 0,05 mg/kg aplicando un modelo no compartimental (n=4)

Parámetro	Unidad	1	2	3	4	Media	DS
Dosis real	mg/kg	0,044	0,043	0,045	0,044	0,044	0,001
Kel	1/h	0,60	0,668	0,208	0,087	0,391	0,28
t1/2 elim	horas	11,550	1,034	3,300	7,700	3,046	3,37
Tmax	min	15,000	15,000	30,000	15,000	18,750	7,50
Cmax	ng/ml	10,690	9,720	11,000	9,750	10,290	0,65
AUC 0-t	ng min/ml	2863,889	334,464	1434,306	2242,222	1718,720	1092,78
AUC 0-inf	ng min/ml	10584,904	355,111	2410,438	7010,994	5090,362	4600,12
Vss/F	l/kg	0,990	0,072	0,310	0,724	0,524	0,41
CIB/F	l/h/kg	0,033	0,530	0,250	0,110	0,231	0,22
F	%	35,670	19,830	62,160	81,690	49,838	27,49

5.3. SECCIÓN *IN VIVO*. Parte II: EVALUACIÓN CLÍNICA DEL EFECTO ANALGÉSICO TRAS LA ADMINISTRACIÓN INTRANASAL DE LA FORMULACIÓN DESARROLLADA

5.3.1. ESTUDIO DE LA EFICACIA ANALGÉSICA DE BUTORFANOL TRAS SU ADMINISTRACIÓN INTRANASAL E INTRAVENOSA EN EQUINOS

Ninguno de los equinos utilizados en el ensayo mostró signos de daño ocular luego de la repetición sucesiva del reflejo corneal mediante hisopo.

Los resultados obtenidos de los tiempos de latencia del reflejo corneal (TLRC), medias, desvíos estándar y coeficientes de variación porcentual, así como el AUC para todo el período de muestreo tras la administración del vehículo de la formulación IN (grupo control) se muestran en la tabla 18. Estos mismos datos, pero de butorfanol aplicado por vía IV e IN (FIII) a una dosis real de $0,045 \pm 0,006$ mg/kg se muestran en las tablas 19 y 20 respectivamente.

Los porcentajes de incremento del TLRC desde basal para el grupo control se muestran en tabla 21, para aquellos que se le aplicó butorfanol por vía IV e IN en las tablas 22 y 23, respectivamente.

En el grupo control los valores de TLRC estuvieron en el rango entre 182,33 a 185,00. La variabilidad entre los animales experimentales fue baja (menor al 15%) y el área bajo la curva TLRC vs tiempo fue de $21863,67 \pm 2695,54$.

Para los animales del grupo B, los valores de TLRC estuvieron en el rango 198,67 a 300,33. La variabilidad entre los animales experimentales fue menor al 20% y el área bajo la curva TLRC vs tiempo fue de $30459,8 \pm 2812,73$.

En el grupo C de animales, los valores de TLRC estuvieron en el rango 130 a 279,00. La variabilidad entre los animales experimentales fue alta en algunos puntos y se perdieron datos en tiempos específicos debido a problemas metodológicos durante la medición que hicieron los resultados de la medición no confiables. El área bajo la curva TLRC vs tiempo fue de $19232,33 \pm 8405,17$.

La administración de butorfanol modificó significativamente el tiempo de latencia del reflejo corneal independientemente de la vía de administración utilizada. Luego de la administración IV, el TLRC se incrementó desde el tiempo cero ($198,67 \pm 37,17$) hasta su máximo con un valor $300,33 \pm 21,50$ a los 30 min. Por otro lado, la aplicación de butorfanol por vía IN tuvo un TLRC inicial de $162,00 \pm 60,40$ y su máximo fue a los 45 minutos con un valor de $221,33 \pm 17,95$. En este último caso, se ve un incremento del tiempo de latencia a los 5 minutos (279,00), sin embargo, este valor solo representa a un sujeto experimental.

El perfil temporal del incremento del TLRC entre los grupos tratados con butorfanol no fue similar. Tras la administración del fármaco por vía IV se observa un inicio más rápido del efecto. Tras la administración IV, el efecto comienza en los primeros minutos, mientras que tras la IN hay una caída del tiempo de latencia hasta los 15 min,

donde se incrementó hasta su máximo, a los 40 min. Es importante remarcar la falla en la medición de algunos de los sujetos durante estos tiempos. La eliminación de los tiempos de muestreo problemáticos modificaría el perfil, sin embargo, se optó por presentar los datos tal y como fueron obtenidos.

Las diferencias entre tratamientos fueron evaluadas comparando las áreas bajo la curva de TLRC normalizado por basal vs tiempo aplicando el test ANOVA. Los datos fueron transformados, previamente utilizando la fórmula: $\arcseno\left(\frac{dato}{100}\right)$

Se aceptaron las condiciones de normalidad utilizando el estadístico W de Shapiro-Wilk y las condiciones de homogeneidad de varianza usando el test de Levene.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas para las áreas bajo la curva de los tres grupos (p-valor = 0,0029), con un 95 % de confianza. A continuación, se realizó una prueba de rangos múltiples donde se logró determinar que el grupo control fue significativamente diferente de los grupos B y C (p= 0,04).

Tabla 18: Medias, desvíos estándar y coeficientes de variación porcentual de los tiempos de latencia del reflejo corneal en equinos tras la administración IN del vehículo (n= 3)

Tiempo (min)	Equino A	Equino B	Equino C	Media	DS	CV %
0	157	201	190	182,67	22,90	12,54
2	155	199	201	185,00	26,00	14,05
5	156	200	198	184,67	24,85	13,45
15	157	198	196	183,67	23,12	12,59
30	156	201	197	184,67	24,91	13,49
45	155	202	190	182,33	24,42	13,39
60	159	198	191	182,67	20,79	11,38
120	160	203	192	185,00	22,34	12,07
AUC (0-120)	18791,5	23832,5	22967	21863,67	2695,54	12,33

Tabla 19: Medias, desvíos estándar y coeficientes de variación porcentual de los tiempos de latencia del reflejo corneal en equinos tras la administración IV de butorfanol a la dosis de 0,05 mg/kg (n= 3)

Tiempo (min)	Equino A	Equino B	Equino C	Media	DS	CV %
0	156	216	224	198,67	37,17	18,71
2	180	240	236	218,67	33,55	15,34
5	200	270	248	239,33	35,80	14,96
15	288,7	286	262	278,90	14,70	5,27
30	322	279	300	300,33	21,50	7,16
45	255,75	281	330	288,75	37,81	13,09
60	231	264	298	264,33	33,50	12,67
120	161	217	234	204,00	38,20	18,72
AUC (0-120)	27517,5	30740	33122	30459,8	2812,73	30459,8

Tabla 20: Medias, desvíos estándar y coeficientes de variación porcentual de los tiempos de latencia del reflejo corneal en equinos tras la administración IN de butorfanol a la dosis de 0,05 mg/kg (n= 3)

Tiempo (min)	Equino A	Equino B	Equino C	Media	DS	CV %
0	154	226	106	162,00	60,40	37,28
2	175,00	272,00	159,00	202,00	61,15	30,27
5	Dato inválido	279,00	Dato inválido	279,00	NC	NC
15	Dato inválido	Dato inválido	130,00	130,00	NC	NC
30	164,00	229,00	Dato inválido	205,67	36,17	17,59
45	228,00	235,00	201,00	221,33	17,95	8,11
60	282,00	Dato inválido	135,00	208,50	103,94	49,85
120	Dato inválido	228,00	109,00	168,50	84,15	49,94
AUC (0-120)	11686	28291	17720	19232,33	8405,17	43,70

Tabla 21: Medias, desvíos estándar y coeficientes de variación porcentual de los porcentajes de aumento desde basal del tiempo de latencia del reflejo corneal en equinos tras la administración IN de vehículo (n= 3)

Tiempo (min)	Equino A	Equino B	Equino C	Media	DS	CV %
2	0,00	0,00	5,79	1,93	3,34	173,21
5	0,00	0,00	4,21	1,40	2,43	173,21
15	0,00	0,00	3,16	1,05	1,82	173,21
30	0,00	0,00	3,68	1,23	2,13	173,21
45	0,00	0,50	0,00	0,17	0,29	173,21
60	1,27	0,00	0,53	0,60	0,64	106,68
120	1,91	1,00	1,05	1,32	0,51	38,87
AUC (0-120)	104,925	37,5	187,915	110,11	75,34	68,42

Tabla 22 Medias, desvíos estándar y coeficientes de variación porcentual de los porcentajes de aumento desde basal del tiempo de latencia del reflejo corneal en equinos tras la administración IV de butorfanol a la dosis de 0,05 mg/kg (n= 3)

Tiempo (min)	Equino A	Equino B	Equino C	Media	DS	CV%
2	15,38	11,11	5,36	10,62	5,03	47,39
5	28,21	25,00	10,71	21,31	9,31	43,71
15	85,06	32,41	16,96	44,81	35,70	79,68
30	106,41	29,17	33,93	56,50	43,29	76,61
45	63,94	29,86	47,32	47,04	17,04	36,23
60	48,08	22,22	33,04	34,44	12,98	37,70
120	3,21	0,46	4,46	2,71	2,05	75,47
AUC (0-120)	5739,615	2327,9	2886,565	3651,36	1829,93	50,12

Tabla 23: Medias, desvíos estándar y coeficientes de variación porcentual de los porcentajes de aumento desde basal del tiempo de latencia del reflejo corneal en equinos tras la administración IN de butorfanol a la dosis de 0,05 mg/kg (n= 3)

Tiempo (min)	Equino A	Equino B	Equino C	Media	DS	CV %
2	13,64	20,35	50,00	28,00	19,35	69,11
5	Dato inválido	23,45	Dato inválido	23,45	NC	NC
15	Dato inválido	Dato inválido	22,64	22,64	NC	NC
30	6,49	1,33	111,32	39,71	62,07	156,29
45	48,05	3,98	89,62	47,22	42,83	90,70
60	83,12	Dato inválido	27,36	55,24	39,43	71,38
120	Dato inválido	0,88	2,83	1,86	1,38	74,05
AUC (0-120)	1688,285	617,875	4816,960	2374,37	2182,00	91,90

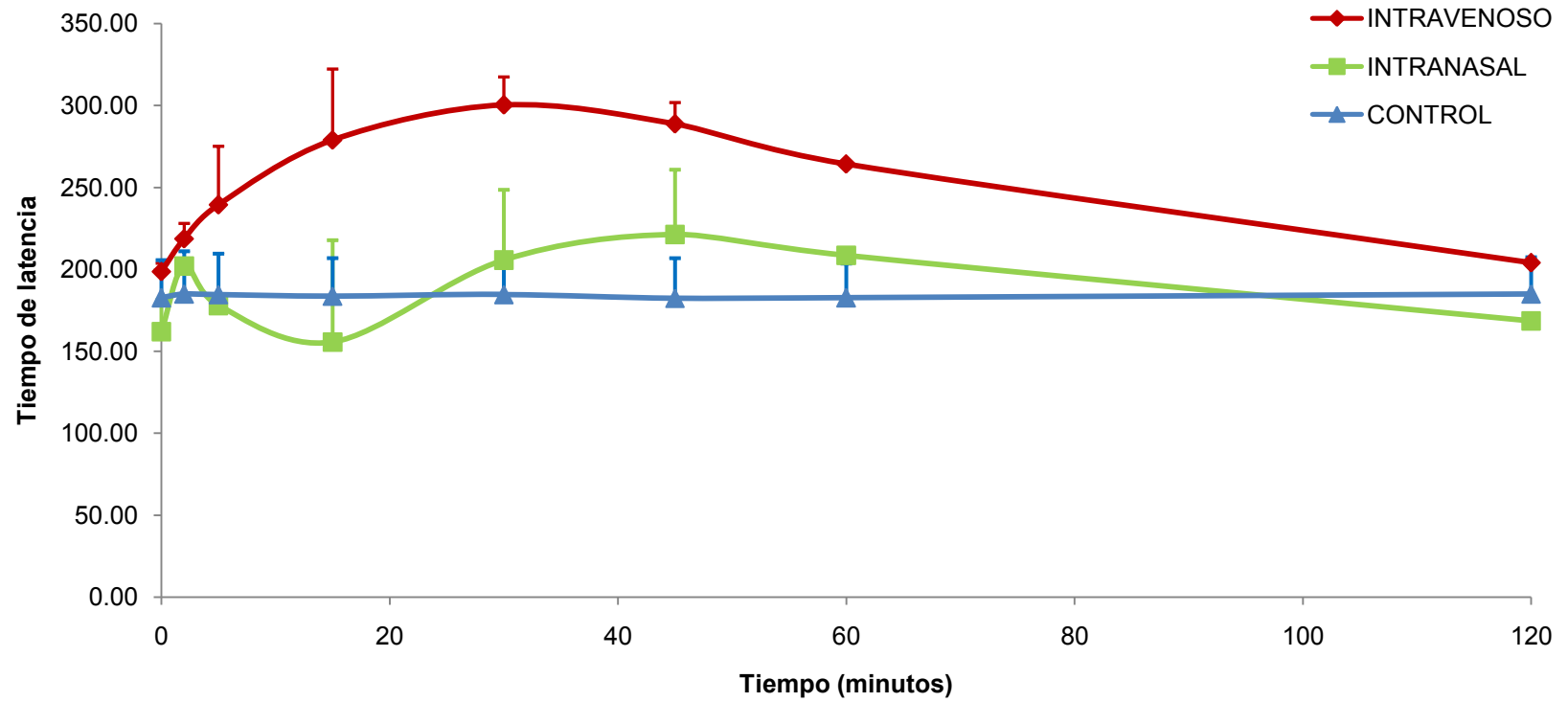


Gráfico 3: Tiempo de latencia del reflejo corneal tras la administración de vehículo, butorfanol IV y butorfanol IN a la dosis de 0,05 mg/kg (n=3)

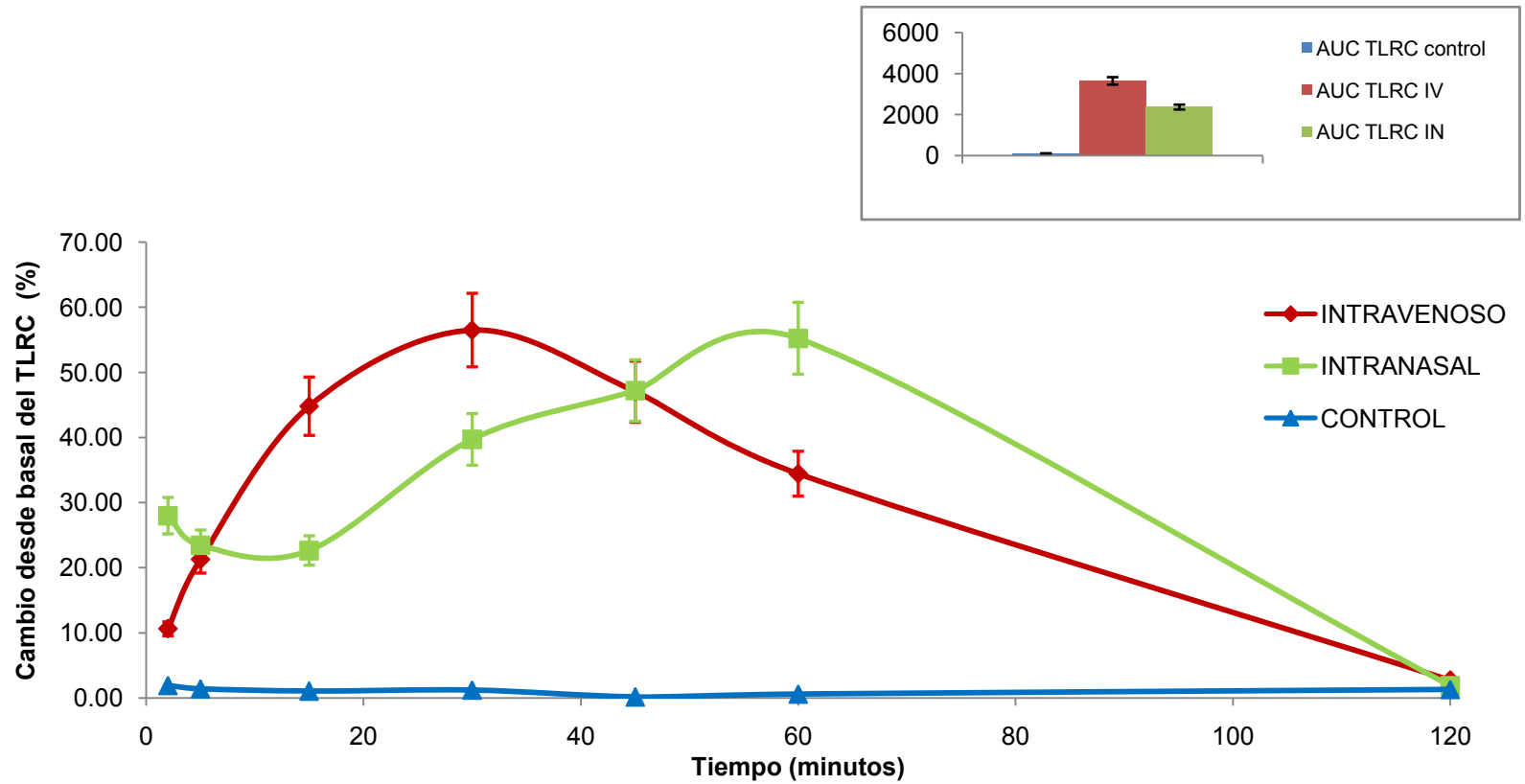


Gráfico 4: Tiempos de latencia del reflejo corneal normalizado por basal tras la administración de vehículo, butorfanol IV y butorfanol IN a la dosis de 0,05 mg/kg (n=3). Inset: áreas bajo la curva % de cambio desde basal vs tiempo

6. DISCUSIÓN

La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP) define al dolor como una sensación y/o experiencia emocional desagradable asociada a una lesión tisular real o potencial (Raja y col., 2020). A pesar que los animales, a diferencia de los seres humanos, no poseen una capacidad lingüística que les permita poder expresar la ubicación y el nivel del dolor, hoy en día se acepta que los mecanismos fisiológicos de la transmisión del dolor entre humanos y animales son similares (Nejamkin, 2014).

En equinos, el dolor puede reconocerse a través de comportamientos evidentes en el animal como rodar, patear, mirar hacia los costados, la presencia de renquera o de blefaroespasmo, como así también, la aparición de signos más sutiles que incluyen cambios en la expresión facial, en la posición de la cabeza o en su ubicación en el box y su respuesta a la palpación o la interacción humana (Sanchez y Robertson, 2014).

En la actualidad existe un gran arsenal de recursos farmacológicos que brindan una adecuada protección contra la sensación de dolor (Nejamkin, 2014). Particularmente en equinos, probablemente el opioide que se utiliza con mayor frecuencia para su tratamiento es el butorfanol (Sanchez y Robertson, 2014).

El butorfanol es un opioide sintético, agonista parcial de los receptores μ y κ del sistema analgésico endógeno, que se encuentra en forma de sal de tartrato. Es un fármaco usado para analgesia

postoperatoria, dolor crónico y como agente antitusivo, que tiene vida media y analgesia cortas (entre 1-2 horas). El butorfanol administrado por vía IM para el tratamiento del dolor postoperatorio es 7 veces más potente que la morfina, 40 veces más potente que la meperidina y 20 veces más potente que la pentazocina. Entre los efectos secundarios que produce se incluyen salivación y/o vómitos, sedación/hiperexcitación y ataxia (Fang y col., 2016; Pallasch y Gill, 1985; Papich, 2015).

Comúnmente en equinos se administra por vía IV e IM y en el mercado argentino se encuentra únicamente en presentaciones para administración IV.

En medicina veterinaria, la aplicación IV de butorfanol en equinos se asocia a una práctica compleja. Para su realización, el operador no sólo debe capturar al animal, encerrarlo en un potro y sujetarlo del bozal con aplicación de mordaza, sino que además debe enfrentar a un equino doliente con un estrés adicional generado por un elemento punzante como una aguja. El gran tamaño y el comportamiento agresivo que algunos equinos pueden desarrollar cuando sufren dolor, vuelven esta situación compleja y peligrosa para el operador y el paciente.

En este trabajo de tesis, se propuso desarrollar una formulación de butorfanol de aplicación IN de máxima biodisponibilidad. La importancia de alcanzar este objetivo radica en que la llegada al mercado de este producto lograría beneficios desde tres posiciones distintas. Desde el punto de vista del operario, la vía IN es una vía no invasiva, práctica y de baja complejidad. Desde el punto de vista terapéutico, la vía conduce a

una absorción rápida, se evade el metabolismo hepático e intestinal y puede utilizarse tanto para una administración sistémica como así también como una vía directa al SNC. Desde el punto de vista del bienestar animal, es una vía incruenta, indolora, sin agujas, lo que disminuye el estrés asociado a la vía de administración IV.

Por otro lado, es posible utilizarla en pacientes con problemas gástricos y vómitos, además, las preparaciones intranasales no requieren condiciones de esterilidad estrictas, por lo que las formulaciones serían más económicas.

El hecho que la vía IN permita un transporte directo de fármaco desde la cavidad nasal al SNC, se vincula a otras ventajas como la reducción de la exposición sistémica del fármaco y la aplicación de fármaco a dosis menores que las requeridas por otras vías como la oral.

Los mecanismos y vías de transporte de fármacos desde la cavidad nasal al SNC implican la vía intracelular, (a través de la vía del nervio trigémino y del nervio olfatorio) y la vía extracelular (vía circulación sistémica o vía linfática – LCR).

La vía IN es una vía de administración novedosa y de gran potencial. Hasta el momento en humanos, se ha patentado su aplicación en más de 60 medicamentos. En medicina veterinaria su uso es infrecuente (Ferreira y col., 2019).

Para llevar a cabo este trabajo, el proyecto se dividió en dos partes: una sección *in vitro* y otra *in vivo*. En la sección *in vitro* se hicieron estudios de penetrabilidad de tres formulaciones distintas y un control,

mientras que en la sección *in vivo* primero se realizó un estudio de disposición plasmática de aquella formulación que mostró mejor perfil *in vitro* y a continuación se evaluó su efecto analgésico luego de la administración IN.

El esquema de trabajo propuesto permitió una optimización de los recursos económicos y animales disponibles. En la primera sección, se realizaron ensayos donde se controlaron estrictamente el entorno físico y químico, lo que generó que el costo global se redujera y el número de animales utilizados fuera el mínimo. Sin embargo, fue necesario apoyar estos resultados con estudios *in vivo* puesto que una de las debilidades evidentes de los ensayos *in vitro* es que no logran replicar el comportamiento *in vivo* en su totalidad (Graudejus y col., 2019).

Para los estudios de penetrabilidad se utilizaron celdas de difusión de Franz. Esta es una metodología ampliamente utilizada para evaluar la penetración *in vitro* de fármacos que cuenta con ventajas como una reducida manipulación de tejidos, recolección continua de muestras y el uso de baja cantidad de fármaco (Salamanca y col., 2018). El uso de celdas de difusión *in vitro* ha evolucionado hasta convertirse en una importante metodología de investigación, proporcionando información clave para métodos *in vitro* y *ex vivo* fiables, reproducibles y estandarizados (Pulsoni y col., 2022).

En los ensayos *in vitro* realizados se decidió utilizar mucosa de origen animal. Por un lado, su uso evadió los aspectos éticos de utilizar un gran número de animales de experimentación, ya que fue posible

obtener suficiente cantidad de mucosa para completar el estudio utilizando un solo animal, lo que además, redujo la variabilidad de los resultados experimentales. Por otro lado, su obtención fue asequible dado que el laboratorio tiene acceso a cadáveres equinos donados para experimentación y a mataderos/frigoríficos. Esto implicó que ningún animal fuera sacrificado exclusivamente para realizar el experimento; además, la calidad de estas mucosas estuvo asegurada ya que la facultad de Ciencias Veterinarias (UNLP) tiene su propio servicio de necropsia y en las plantas faenadoras no se sacrifican animales enfermos¹ (Agu y Ugwoke, 2008).

Potencialmente, podría plantearse el uso de mucosas nasales provenientes de una especie diferente a la estudiada para luego realizar una extrapolación al equino. Sin embargo, el desarrollo de este trabajo utilizando mucosas nasales derivadas de otra especie animal no sería la estrategia más conveniente. Por un lado, la absorción de xenobióticos depende de las condiciones fisiológicas del sitio de aplicación, lo cual, a su vez, depende de la especie tratada. Por otro lado, hay factores anatómicos como la curvatura de las fosas nasales, la longitud y volumen de la cavidad nasal, y la estructura de los cornetes que pueden causar diferencias en la captación y absorción IN entre especies (Keller y col., 2022).

Por otra parte, para su desarrollo, podría haberse optado por utilizar membranas artificiales ya que son fáciles de obtener, menos

¹ *Resolución N° 536/2002 del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria B.O. 4/7/2002*

costosas y estructuralmente más simples. Sin embargo, hasta donde sabemos, al momento no existen en el mercado membranas artificiales que sean idénticas a las mucosas nasales equinas. Asimismo, se ha reportado que las membranas artificiales no se asemejan completamente a la ruta pasiva de permeación de moléculas (Pulsoni y col., 2022).

Otra opción podría haber sido utilizar cultivos celulares. No obstante, reproducir la mucosa nasal exige el desarrollo de sistemas de co-cultivos complejos y es un gran desafío lograr la correcta conformación tridimensional que le confiera las características funcionales únicas a este epitelio. Durante años se ha propuesto el uso de células primarias y líneas celulares como RPMI 2650 derivadas de cáncer de tabique humano, BT derivadas de cornete bovino y NAS 2BL de carcinoma escamoso epitelial nasal de rata, sin embargo, estos sistemas son demasiado simplificados (Sosnik, 2016).

En las últimas dos décadas, los comités de ética nacionales e internacionales han estipulado que los experimentos con animales deben evitarse siempre que sea científicamente factible, de acuerdo con el enfoque de las 3 R (reducir, reemplazar, refinar) (Rusel y Burch, 1959). Si bien en los últimos años se han buscado opciones alternativas a los tejidos animales, estos siguen siendo una herramienta insustituible. Como se indicó anteriormente, la reproducción de toda la mucosa nasal es un desafío que hasta el momento no pudo lograrse mediante modelos *in vitro* (Pulsoni y col., 2022, Sosnik, 2016).

Las mucosas nasales utilizadas durante los experimentos se extrajeron dentro de la primera hora de muerte del animal. En esta etapa del trabajo fue fundamental garantizar la conservación de la integridad de las mismas, por ello fue necesario realizar previamente un ensayo de viabilidad de la mucosa bajo condiciones de congelamiento con y sin hidratación con solución de preservación. El análisis histológico determinó que era más conveniente el uso de mucosa nasal equina fresca. Este resultado se sustentó con bibliografía; Clementino y col., (2021), Tas y col., (2009) y Fernández-Campos y col., (2019) utilizaron mucosas nasales frescas de conejo, bovino y cerdo, respectivamente, para sus ensayos *in vitro* usando celdas de difusión de Franz debido a las diferencias en la capacidad de penetrabilidad de xenobióticos entre mucosas frescas y congeladas (Clementino y col., 2021; Fernández-Campos y col., 2019; Tas y col., 2009)

Esto no fue observado en ensayos que utilizaron la misma metodología, pero otros tejidos, como el reportado por Turner y col., (2019) donde se utilizó mucosa de faringe humana congelada y posteriormente descongelada (Turner y col., 2019), no observándose diferencias. De igual manera, Caon y Simões (2011) compararon los parámetros de permeabilidad de dos fármacos a través de mucosas bucales y esofágicas porcinas frescas y congeladas utilizando celdas de difusión de Franz. Estos investigadores concluyeron que las propiedades de barrera de estas mucosas no se vieron afectadas por el proceso de congelación, dado que los parámetros obtenidos para ambos fármacos

fueron similares en las mucosas frescas y congeladas. Sin embargo, se mostró un aumento de la retención de uno de los fármacos (carbamazepina) en las mucosas congeladas. Es decir, que las mucosas bucales y esofágicas porcinas congeladas podrían utilizarse como sustituto de las frescas, aunque este empleo debería hacerse con cuidado y con pruebas piloto ya que, los resultados pueden diferir según el fármaco utilizado (Caon y Simões, 2011).

En esta tesis se desarrolló y validó un método espectrofotométrico. Este punto fue necesario para garantizar un método que produjera resultados exactos, precisos, confiables y reproducibles con muestras pequeñas.

Para ello se hizo un análisis de la variabilidad interdía e intradía de una curva de calibración utilizando soluciones de concentraciones conocidas de butorfanol y se midió por triplicado su absorbancia a una longitud de onda de 280 nm.

Para seleccionar la longitud de onda de trabajo, sobre una placa cargada con la curva patrón, se realizó un espectro de absorción en un amplio rango de longitudes de onda y se vio un pico máximo cerca de la región 280 nm. Se corroboró por bibliografía que esta longitud de onda es la más apropiada para la detección del fármaco (Fang y col., 2018; Pei y col., 2016).

La curva de calibración permitió hallar una función matemática que relacionara a una variable dependiente (la absorbancia a 280 nm) y una variable independiente (concentración conocida de butorfanol). Esto

posibilitó conocer el valor de una de las variables, midiendo la otra. En este caso, la función matemática utilizada fue lineal. La medida de r^2 de las curvas generadas de las placas intradía e interdía fue de $0,993 \pm 0,004$, lo cual, junto con los valores de las ordenadas al origen cercanos a cero, nos confirmó que el ajuste lineal de la curva de calibración fue, de acuerdo a los estándares internacionales, aceptable (Chandran y Singh, 2007; Velloso y col., 2018).

Además, pudieron determinarse los coeficientes de correlación (r). El valor de r se encuentra siempre en el intervalo $[-1,1]$. Cuando el valor es más cercano a 1 se indica una fuerte relación positiva entre las variables estudiadas, es decir, cuando una variable aumenta, la otra también lo hace. Mientras que un valor cercano a -1 también muestra una gran correlación entre las variables, pero de manera inversa, cuando una crece, la otra decrece. Contrariamente, un valor cercano a 0 indica falta de correlación entre las variables (Boddy y Smith, 2009). En este caso, r fue cercano a 1, por lo cual la relación entre las absorbancias a 280 nm y las concentraciones de las soluciones de butorfanol fue directamente proporcional.

La metodología resultó ser repetible y reproducible. La repetitividad (variación intraensayo) fue del 8,5 % y la reproducibilidad (variación interensayo) del 11,0 %.

El límite de detección (LD) determina la concentración más pequeña que da una respuesta medible y en este caso fue de 0,5 $\mu\text{g/ml}$. El límite de cuantificación (LC) es la concentración más pequeña del

analito que da una respuesta cuantificable con exactitud y precisión y en este ensayo tuvo un valor de 1 µg/ml.

A continuación, se realizó el estudio de penetración *in vitro* para determinar la penetración del fármaco utilizando celdas de Franz, en la cual se testearon tres formulaciones distintas y una formulación control.

El análisis histopatológico de la porción de mucosa nasal equina que estuvo en contacto con la formulación que contenía cloruro de bencetonio (citada en el plan de tesis) provocó lesiones graves sobre la mucosa. El cloruro de bencetonio pertenece al grupo de compuestos de amonio cuaternario que se usan comúnmente como desinfectantes, antimicrobianos o surfactantes catiónicos tanto en productos industriales como domésticos (Gheorghe y col., 2020). En la actualidad, los datos de toxicidad y seguridad del cloruro de bencetonio están extremadamente limitados y parecen encontrarse desactualizados (Gheorghe y col., 2020). Sin embargo, se ha registrado que el cloruro de benzalconio, un compuesto de la misma familia muy utilizado como aditivo antimicrobiano (Marple y col., 2004), posee propiedades corrosivas e irritantes (Sreevidya y col., 2018) y se ha descrito su toxicidad en humanos y animales como cobayos (Joki y col., 1996) y ratas (Berg y col., 1997; Choi y col., 2020) en sitios específicos como la córnea y el epitelio nasal (Sreevidya y col., 2018). Gheorghe y col., (2020) demostraron que el cloruro de bencetonio genera toxicidad aguda en *Cyprinus carpio* (carpa común) después de 96 h de exposición, como respuesta a estrés oxidativo a nivel hepático (Gheorghe y col., 2020).

A pesar de que en cada ensayo se esperaba utilizar tres porciones de mucosas respiratorias y tres olfatorias, durante el transcurso de los experimentos, existieron inconvenientes prácticos que derivaron a que no se respetara la proporción de muestras 3:3 en todos los casos.

Para la formulación control, el animal recibido fue pequeño lo que llevó a que únicamente fuera posible extraer cantidad de mucosa integra suficiente para dos porciones respiratorias y dos olfatorias.

Respecto a la FI, fueron utilizadas dos porciones de mucosa respiratorias y cuatro olfatorias. Esto ocurrió por un error sistemático del operador quien confundió una de las mucosas respiratorias con olfatoria.

Por último, para la formulación FIII, uno de los datos obtenidos de la mucosa olfatoria mostró un valor atípico (*outlier*), por lo cual fue desestimado en los cálculos y en el análisis estadístico posterior.

A partir de las curvas cantidad acumulativa de butorfanol sobre área de difusión en función del tiempo se calcularon los parámetros J_{ss} , K_p y t_{lag} para cada porción de mucosa y luego se llevó a cabo un análisis estadístico utilizando el software Statgraphics Centurion XVI.II.

Se compararon los valores de cada parámetro de una misma formulación de las regiones olfatoria y respiratoria equinas utilizando la prueba t de Student. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de J_{ss} de las regiones olfatorias y respiratorias para las formulaciones control, FI, FII y FIII. Lo mismo ocurrió con el parámetro K_p .

La mayoría de las sustancias atraviesan las membranas biológicas a través del proceso de difusión, un fenómeno descrito por la ley de Fick (Haq y col., 2020) en la cual se asume que la velocidad de transferencia por unidad de área (flujo) de una membrana es directamente proporcional a su espesor (Talevi y Bellera, 2016). A raíz de esto, fue esperable que el butorfanol atravesara la mucosa nasal olfatoria reflejando valores de parámetros de penetración significativamente diferentes a los de la mucosa nasal respiratoria, puesto que la primera es más fina que la segunda.

También se realizó una prueba ANOVA para comparar los valores de J_{ss} , K_p y t_{lag} de las formulaciones control, FI, FII y FIII de las regiones respiratoria y olfatoria equina.

Para la región respiratoria se determinó que no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de las formulaciones control, FI, FII y FIII para ninguno de los parámetros calculados (J_{ss} , K_p y t_{lag}). Mientras que, para la región olfatoria, se encontraron diferencias estadísticamente significativas de los valores de J_{ss} y K_p de FIII respecto a las formulaciones control, FI y FII.

Como las formulaciones control, FI, FII y FIII tuvieron una composición química similar, excepto que FI contaba con el agregado de CTAB, FII contenía DTAB y FIII tenía tween 80, se asumió que las diferencias significativas observadas en los parámetros fue una consecuencia de la presencia de tween 80 en FIII. Este resultado está respaldado por el estudio publicado por Gao y col., (2019) quienes

realizaron un ensayo *in vivo* en el cual administraron 2,3,5,6-tetrametilpirazina ($\log P$ 2) por vía IN en ratas. En este trabajo, usaron varias formulaciones con diferentes surfactantes a concentraciones distintas y demostraron que la concentración en el cerebro del fármaco estudiado aumentó significativamente utilizando tween 80 como excipiente (Gao y col., 2019).

Específicamente para el butorfanol, el valor de J_{ss} mostró una diferencia estadísticamente significativa cuando se incluyó el surfactante en la formulación. El butorfanol es un fármaco lipofílico cuyo $\log P$ (octanol-agua) es de 3,68 (Grassin-Delyle y col., 2012; Papich, 2015).

Generalmente, las formulaciones para administración IN necesitan la presencia de uno o más excipientes con actividad solubilizante para aumentar la velocidad de disolución y con ello, la posibilidad de absorción, lo que en conjunto se convierte en una mejora de su biodisponibilidad (Vetter y col., 2012; Velloso y Landoni, 2022). El desarrollo de formulaciones en presencia de surfactantes que tengan el objetivo de disolver, emulsionar, actuar como dispersantes de suspensiones o agentes humectantes pueden generar cambios en la permeabilidad de la membrana biológica que atraviesan o incluso afectar su integridad (Tadros, 2014) lo cual explicaría los valores de J_{ss} obtenidos en este ensayo.

Tween 80 ($C_{58}H_{124}O_{26}$) es un tensioactivo no iónico hidrofílico ampliamente utilizado en productos medicinales y alimentarios (Prabhakar y col., 2013). Hasta ahora, se desconoce su mecanismo exacto de acción,

sin embargo, se acepta que está relacionado con su estructura química. Tween 80 está compuesto por una cadena de polietileno con características hidrofílicas e hidrofóbicas, lo que le otorga la capacidad de desorganizar y disolver los lípidos intracelulares. En consecuencia, su presencia podría aumentar la fluidez de las membranas celulares de la mucosa nasal (Gao y col., 2019).

Además, se ha reportado que tween 80 puede intercalarse entre los lípidos y las proteínas en las membranas celulares, alterando y aumentando la permeabilidad de los fármacos (Gao y col., 2019); también se lo ha vinculado con la pérdida de uniones estrechas en los tejidos (Kaur y Mehta, 2017).

Los resultados obtenidos en nuestros ensayos sugieren que tween 80 es un excipiente prometedor para el desarrollo de formulaciones de butorfanol de administración IN en equinos porque aumentaría su biodisponibilidad. Por otro lado, debe considerarse que la elección del surfactante utilizado como excipiente, no solo debe mejorar la penetración del fármaco, sino que además debe poseer una baja toxicidad a largo plazo (Gao y col., 2019; Som y col., 2012, Velloso y Landoni, 2022). Respecto a esto, Som y colaboradores (2012) reportan que la concentración micelar crítica (CMC) de los tensioactivos no iónicos suele ser menor que la CMC del tensioactivo con carga. Esto tendría como consecuencia el hecho de que los tensioactivos no iónicos, son menos irritantes y mejor tolerados que los tensioactivos aniónicos y catiónicos (Som y col., 2012).

La falta de diferencias estadísticamente significativas entre los parámetros J_{ss} , K_p y el t_{lag} entre las formulaciones control, FI y FII podría estar reflejando que la presencia de CTAB y de DTAB en las formulaciones no mejoran la penetración del butorfanol a través de la mucosa equina.

CTAB ($C_{19}H_{42}BrN$) es un surfactante catiónico cuyo mecanismo de acción está ligado a su capacidad de formar micelas con los lípidos de la membrana celular, rompiendo la célula (Cárdenas, 2016). Como la eficacia de la mayoría de los mejoradores de penetración depende de su concentración (Haq y col., 2020), inicialmente se propone que la concentración utilizada de CTAB en este estudio estaba por debajo de la concentración efectiva para mejorar la penetración del butorfanol a través de la mucosa nasal equina.

Chakraborty y colaboradores (2009) estudiaron el efecto del carvediol, un fármaco hidrofílico utilizado en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca, en presencia de diferentes surfactantes en un rango amplio de valores de concentraciones y pHs. Demostraron que la solubilidad del fármaco se incrementó con el aumento de la concentración de CTAB en todos los rangos de pH utilizados, siendo máximo a pH 3 (Chakraborty y col., 2009).

Desafortunadamente en nuestro estudio, el pH de las formulaciones se fijó en 4,5, a efectos de evitar la irritación de la mucosa (Ferreira y col., 2019), lo que podría haber afectado la efectividad del CTAB en la formulación.

Por otro lado, DTAB, cuya fórmula química es $C_{15}H_{34}BrN$, tiene una estructura química muy similar a CTAB. Estos tensioactivos tienen un mismo grupo hidrofílico, pero un número diferente de átomos de carbono en la cadena alquílica (Velloso y Landoni, 2023). Como las interacciones entre la región no polar de la molécula de surfactante y el agua son responsables del efecto hidrofóbico que estimula la asociación de las moléculas para formar micelas, se podría esperar que CTAB sea un mejorador de penetración más efectivo que DTAB, ya que tiene una cadena de carbono más larga (y como consecuencia un efecto hidrofóbico mayor). Sin embargo, esto no pudo demostrarse para la mucosa equina ya que los resultados de DTAB no muestran diferencias estadísticamente significativas con CTAB.

Por último, cuando se realizó el ANOVA, se determinó que no existían diferencias estadísticamente significativas entre los t_{lag} de las formulaciones testeadas. Cuando se realizó la prueba t de student, tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre estos parámetros de las regiones olfatorias y respiratorias de ninguna de las formulaciones. Puesto que la fase de latencia es el período durante el cual no se produce una absorción aparente de fármaco y el t_{lag} corresponde a esta fase, este resultado sugiere que la presencia de los surfactantes no modifica (incrementando o disminuyendo) los tiempos de retraso de penetración de fármaco para las formulaciones testeadas, tanto en la región respiratoria como olfatoria (Franz, 1983; Nerella y col., 1993).

Asimismo, este resultado podría reflejar que no hubo réplicas suficientes para evidenciar un cambio en el t_{lag} de las formulaciones. Igualmente, por tratarse de una metodología *in vitro*, hay que considerar que existe una ausencia de neuronas, conexiones neuronales, enzimas, moco y vasos sanguíneos que *in vivo* influyen en el transporte de fármaco desde la cavidad nasal al SNC, especialmente al recurrir a las vías intracelulares, por lo cual este resultado puede no ser tan fiel.

Puesto que FIII mostró un perfil de penetración *in vitro* mejor que las formulaciones control, FI y FII se decidió utilizarla para realizar los estudios *in vivo*.

En la parte *in vivo* de este trabajo, primero se realizó la descripción de la cinética plasmática de butorfanol tras su administración IV e IN, cuantificando el fármaco con el kit ELISA de Neogen. Este kit ha sido validado en equinos (Hunter y col., 2015; Natalini, 2006) y su uso ha sido reportado por numerosos autores, tanto en equinos como en otras especies (Carroll y col., 2001; Gerken y Sams, 1993; Vaughan, 2006).

Para realizar este ensayo se siguió el protocolo experimental realizado por Ferreira (2020). Se administró butorfanol a una dosis de 0,05 mg/kg por las vías IV e IN, siguiendo un diseño de Cuadrado Latino. En el trabajo de Ferreira (2020), la formulación aplicada por vía IN tenía una composición química igual que la formulación control de este trabajo y el dispositivo de aplicación fue el mismo (Ferreira, 2020).

Ferreira (2020), realizó un estudio de la evaluación y tolerancia IN en el cual se determinó que la aplicación de la solución fue bien tolerada

en volúmenes pequeños y hasta 3 disparos; en el presente estudio debido al gran tamaño de los equinos utilizados, la composición de FIII fue ligeramente modificada con el objetivo de incrementar la concentración de fármaco, y administrar la dosis total en un máximo de tres disparos.

Para la administración se respetaron los recaudos considerados durante el trabajo de Ferreira (2020), entre los que se destacan una temperatura de la formulación entre los 18 y 33 °C para no inducir lesiones térmicas, un pH de la solución de 4,5 para no provocar ninguna lesión química y la aplicación de la formulación en el ollar del lado contrario de la toma de muestras sanguíneas, de modo de asegurarnos que la biodisponibilidad observada no estuvo afectada por el sitio de toma de muestras (Ferreira, 2020).

Nuestros ensayos mostraron que, tras su administración IV, el butorfanol se distribuyó ampliamente, con un volumen de distribución de $4,08 \pm 0,88$ l/kg, valor esperable dada la alta liposolubilidad del fármaco (Grassin-Delyle y col., 2012). Se observó que uno de los animales mostró un valor atípico y su exclusión incrementaría el promedio y reduciría el desvío estándar, quedando como $4,50 \pm 0,34$ l/kg. Estos valores fueron muy cercanos al volumen de distribución reportado por Ferreira, (2020) de $3,20 \pm 1,77$ l/kg a pesar de que la cuantificación del fármaco se llevó a través de otra metodología, HPLC/MS (Ferreira, 2020).

Estos resultados fueron ligeramente superiores a los reportados por otros autores como Knych y col., (2013), Sellon y col., (2009) y Chiavaccini y col., (2015) que obtuvieron, respectivamente, valores de 1,4

$\pm 0,3$ l/kg (a una dosis de butorfanol de $0,1$ mg/kg, y el cual se calculó considerando el butorfanol libre y conjugado), $1,113 \pm 0,925$ l/kg (donde se aplicó una dosis de butorfanol de $0,08$ mg/kg considerando únicamente el butorfanol libre) y $0,41 \pm 0,165$ l/kg (a una dosis de $0,1$ mg/kg). Esta diferencia posiblemente pudo deberse al hecho de que el volumen real en el cual se distribuyen los fármacos se ve influenciado por factores tales como la proporción de agua por kilogramo de peso (que varía con la raza y edad), el gasto cardíaco y las condiciones fisiológicas de los animales (Aleixandre y Puerro, 2009), características que no conocemos con precisión en los trabajos de estos autores.

La eliminación fue relativamente rápida, con un aclaramiento corporal de $0,725 \pm 0,69$ l/h/kg y una vida media de $4,46 \pm 3,78$ h. La eliminación presentó una amplia variación inter-sujeto, observándose dos sujetos en los cuales la eliminación fue más rápida comparada con los dos restantes. Los presentes resultados son diferentes a los obtenidos por Ferreira (2020), donde el valor del aclaramiento corporal fue de $3,19 \pm 1,48$ l/h/kg y la vida media $0,68 \pm 0,17$ h. Sin embargo, fueron similares a los reportados por otros autores como Sellon y col., (2009) Knych y col., (2013) y Chiavaccini y col., (2015) cuyos valores de aclaramiento corporal y vida media fueron $0,274 \pm 0,10$ l/kg/h y $7,7 \pm 5,05$ h; $0,8 \pm 0,58$ l/kg/h y $5,9 \pm 1,5$ h; $0,65 \pm 0,20$ l/kg /h y $2,3 \pm 1,74$ h, respectivamente.

La absorción de butorfanol tras su administración IN fue relativamente rápida, con un tiempo máximo (T_{max}) de $18,75 \pm 7,5$ minutos, una concentración máxima observada (C_{max}) de $10,29 \pm 0,65$

ng/ml y una biodisponibilidad alta, de $49,84 \pm 27,49$ %. El equino 2, mostró una biodisponibilidad significativamente más baja que el resto de los animales experimentales y su exclusión incrementa el valor de la media de este parámetro a $59,84 \pm 23,10$ %. Una variabilidad similar entre equinos, con la aparición de sujetos de perfil *outlier*, fue reportada por Ferreira (2020).

Estos resultados fueron diferentes a los obtenidos por Ferreira (2020) quien reporta un T_{max} de $1,487 \pm 0,765$ h (89,99 minutos) y una C_{max} de $2,490 \pm 1,778$ ng/ml. La diferencia en T_{max} , probablemente, refleje la acción del tween 80 en la velocidad de absorción de butorfanol. La biodisponibilidad fue similar a la reportada por Ferreira (2020) ($54,45 \pm 20,09\%$), y mayor a la reportada luego de la administración por vía IM ($37,3 \pm 6,1\%$) (Sellon y col., 2009), aunque menor que por vía subcutánea ($87 \pm 29\%$) (Chiavaccini y col., 2015).

Durante los estudios de biodisponibilidad/bioequivalencia, el perfil de disposición plasmática y el área bajo la curva de concentración plasmática vs tiempo son utilizados para evaluar la velocidad (C_{max} y T_{max}) y extensión (AUC) de la absorción (Talevi y Bellera, 2016). En particular, en este trabajo de tesis se reporta una velocidad de absorción de fármaco más rápida que la reportada por Ferreira (2020), así como, una mayor extensión, puesto que el $AUC_{0-\infty}$ en este trabajo es de $84,84 \pm 76,67$ ng•h/ml mientras que en el trabajo de Ferreira es de $14,44 \pm 17,06$ ng•h/ml (Ferreira, 2020).

La segunda parte de la sección *in vivo* del trabajo consistió en la evaluación clínica del efecto analgésico de FIII. Para ello a los equinos se les administró el vehículo de FIII por vía IN, butorfanol por vía IV y FIII por vía IN siguiendo un diseño de Cuadrado Latino. A continuación se realizó la medida del tiempo de latencia del reflejo corneal (TLRC) siguiendo el procedimiento realizado por Ferreira (2020), quien estandarizó y validó el método en la especie equina.

El reflejo corneal (RC) es un reflejo nociceptivo de los circuitos trigémino-faciales y representa el mecanismo de protección de la córnea ante una injuria (Ferreira, 2020).

El reflejo corneal es causado por un bucle entre las ramas sensoriales del trigémino y la inervación del nervio motor facial (VII) de los músculos orbicularis oculi (Cruccu y col., 1991). El reflejo se activa cuando un estímulo sensorial entra en contacto con terminaciones nerviosas libres o mecanorreceptores dentro del epitelio de la córnea. La información sensorial se transmite y genera sinapsis en el tronco encefálico. El nervio contactado luego se proyecta al núcleo facial y este hace sinapsis con el nervio facial. El nervio facial sale del núcleo facial, se envuelve alrededor del núcleo motor ocular externo emerge del cráneo por el agujero estilomastoideo y viaja medialmente sobre la superficie de la cara para activar el músculo orbicularis oculi, que al contraerse provoca un movimiento de parpadeo (Peterson y Hamel, 2022).

El tiempo de latencia del reflejo corneal (TLRC) es una metodología reproducible y estímulo-dependiente que permite evaluar de manera

objetiva, no invasiva e incruenta el procesamiento nociceptivo a nivel central (Ferreira, 2020). Es una metodología que ha sido utilizada para la evaluación de fármacos analgésicos, como fentanilo, y tranquilizantes, como diazepam, en humanos (Cruccu y col., 1991) y para drogas antiinflamatorias como piroxicam (Ferracutti y col., 1994). También se ha reportado su aplicación en otras especies, como perros, para la evaluación del efecto de citicolina sobre la anestesia inducida por tiopental sódico (Ahmadi y col., 2014).

En la sección II de la parte *in vivo* desarrollada en este trabajo de tesis, se observó que la aplicación de butorfanol por vías IN e IV modificó significativamente el TLRC. Este resultado refleja que el butorfanol alcanza el sitio de acción e interactúa con los receptores opioides.

La aplicación del fármaco por vía IV mostró un inicio más rápido del efecto analgésico que por vía IN. En la vía IV, el efecto comenzó en los primeros minutos, mientras que en la IN hubo un aumento leve ($\approx 30\%$) del TLRC hasta los 15-30 min, a partir de cuándo se incrementó hasta su máximo, a los 40 min.

Resultados similares han sido reportados para STADOL NS®, el único spray nasal de butorfanol a nivel mundial de uso en humanos. Estudios comparativos entre la administración de la formulación IN con las formulaciones IV del mismo laboratorio no reportan diferencias significativas en el tiempo de inicio de acción (FDA, 2022).

Este resultado, se contrapone con el obtenido por Ferreira (2020), quien observó un inicio más rápido del efecto del fármaco luego de su aplicación por vía IN comparada con la IV (Ferreira 2020).

La causa del inicio más lento del efecto analgésico tras la administración IN de FIII podría ser identificada o al menos hipotetizada analizando conjuntamente todas conclusiones obtenidas en este trabajo de tesis.

Por un lado, se determinó que el pasaje *in vitro* del butorfanol en FIII fue mayor en la región olfatoria, que en la respiratoria. Recordemos que la vía olfatoria es la vía directa al SNC mediante el transporte extracelular o intracelular a través del nervio olfatorio (García-Corvillo, 2016). Considerando que tras la administración IV la llegada del butorfanol al SNC (sitio de acción) es exclusivamente través de la circulación sistémica, las dos vías de administración se diferencian claramente cuando se considera la vía principal de acceso al sitio de acción del fármaco administrado. Teniendo en cuenta esto, el hecho de que la administración IN haya comenzado su efecto analgésico más tarde pudo deberse a que el pasaje *in vivo* ocurrió preferentemente a través de la mucosa olfatoria por transporte intracelular. Recordemos que este tipo de transporte involucra la entrada de moléculas a las neuronas por difusión pasiva, endocitosis mediada por receptor y/o endocitosis adsorbente, seguida por transporte axonal lento (Banks y col., 2009; Hashizume y col., 2008; Nonaka y col., 2008; Ross y col., 2004; Thorne y col., 2004).

Para aceptar o rechazar esta hipótesis, es necesario recolectar más cantidad de datos realizando nuevos ensayos experimentales.

Aun cuando la performance de la formulación desarrollada fue satisfactoria, es importante remarcar que para que llegue al mercado será necesario realizar estudios toxicológicos (agudos, subagudos, crónicos) y evaluaciones clínicas en animales normales y poblaciones enfermas.

Un último dato a considerar es que, hasta el momento no hay estudios realizados en equinos que garanticen que las razas de estos animales puedan ser un factor que influya sobre la penetración del fármaco por vía IN. Keeler y col., (2016) realizaron un estudio de simulación computacional en el cual se estudió la deposición de partículas de spray dentro de la cavidad nasal de humanos de cuatro grupos étnicos diferentes. Los resultados mostraron que los caucásicos y latinoamericanos tenían una cavidad nasal menos permeable, y que también los caucásicos y afroamericanos tenían mayor variabilidad entre sujetos, seguramente debido a una mayor diferencia en la morfología de los vestíbulos nasales. El hecho que en esta tesis no se haya considerado esta posibilidad implica que estos resultados podrían diferir levemente en caso que se apuntara a una raza equina particular (Keeler y col., 2016).

Se espera que los resultados y conclusiones que se desprenden de esta tesis brinden la contribución necesaria para avanzar en el desarrollo de un producto homólogo al STADOL NS®, de origen nacional y para uso en equinos, aportando positivamente al bienestar animal.

CONCLUSIONES

A pesar de que en medicina humana la vía IN es reconocida como una excelente vía de administración sistémica y cerebral de fármacos, en medicina veterinaria, su uso es infrecuente. Este es un hecho desafortunado dado que por sus ventajas (indolora, incruenta, no invasiva, y proveer un acceso directo al SNC) esta vía sería de amplia utilidad para la administración de fármacos en animales domésticos en especial para fármacos con sitio de acción en el SNC.

Este trabajo, se dividió en dos secciones. En la sección *in vitro*, primero fue necesario determinar las condiciones más apropiadas que debía poseer la mucosa nasal equina para utilizarla en los ensayos de penetración. A continuación, debido a la inexistencia de un método eficaz y económico para medir concentraciones de butorfanol en muestras de volumen pequeño fue necesario desarrollar y validar uno innovador. Por último, se realizó un ensayo *in vitro* para la determinación de la velocidad de penetración utilizando celdas de difusión de Franz. De esta primera parte, se extrajeron las siguientes conclusiones:

- A partir del análisis histopatológico realizado por el Servicio de Patología Anatómica en la Facultad de Ciencias Veterinarias sobre las muestras de mucosas nasales frescas y congeladas, hidratadas o no en medio preservante, se concluyó que las mucosas frescas tuvieron un mejor estado de conservación.

- Fue posible validar el método espectrofotométrico para la cuantificación de butorfanol en el rango de concentración entre 0,5 y 60 µg/ml.
- Existió una diferencia estadísticamente significativa de la penetración *in vitro* de las formulaciones control, FI, FII y FIII entre las mucosas provenientes de las regiones olfatorias y respiratorias.
- El tween 80 fue el excipiente con mayor efectividad para incrementar la penetrabilidad *in vitro* del butorfanol a través de la región olfatoria de la mucosa nasal equina.

En la sección *in vivo*, se realizó un estudio de disposición plasmática de butorfanol tras su administración IN e IV en equinos, y posteriormente se realizó un estudio de la eficacia analgésica de butorfanol. De estos resultados, se desprendieron las siguientes conclusiones:

- La administración IN de butorfanol reflejó concentraciones plasmáticas del fármaco menores a las observadas luego de su administración por vía IV.

- El butorfanol se distribuyó ampliamente y fue eliminado relativamente rápido, tanto en la vía IN como por vía IV.
- La administración de butorfanol por vía IN reflejó una absorción rápida y tuvo una biodisponibilidad alta ($49,84 \pm 27,49$ %; excluyendo al sujeto *outlier* este valor aumenta a $59,84 \pm 23,10$ %).
- La administración de butorfanol modificó significativamente el tiempo de latencia del reflejo corneal independientemente de la vía de administración utilizada. Es decir, el butorfanol ejerció efecto analgésico administrado tanto por la vía IV, como por la IN.
- El efecto analgésico de los animales tratados con butorfanol por vía IV e IN no fueron similares. La administración del fármaco por vía IV indujo un inicio más rápido que la IN.
- No se identificaron diferencias significativas en el grado de analgesia tras la administración de butorfanol por vía IV e IN.

8. **BIBLIOGRAFÍA**

1. Agu R, Ugwoke M. In Situ and Ex Vivo Nasal Models for Preclinical Drug Development Studies. En: Ehrhardt C, Kim KJ. Drug Absorption Studies. Biotechnology: Pharmaceutical Aspects. 1era edición. Boston, Massachusetts, Springer, 2008, p. 112-134.
2. Ahmadi A, Mohitmafi S, Abarkar M. Effects of Citicoline Sodium on corneal reflex, anesthesia and analgesia duration after thiopental sodium injection in dogs-A preliminary report. Journal of Clinical Research in Paramedical Sciences. 2014; 5 (3): p. 28-32.
3. Aleixandre A, Puerro M. Absorción y distribución de los fármacos. En: Fernández PL, Moreno González JC, Leza Cerro I, Hernández L, Moro Sánchez MA, Portolés Pérez A. Velázquez. Farmacología Básica y Clínica. 19na edición. Editorial Médica Panamericana, Madrid, España, 2009, p. 13-35.
4. Alsarra IA, Hamed AY, Alanazi FK. Acyclovir Liposomes for Intranasal Systemic Delivery: Development and Pharmacokinetics Evaluation. Drug Delivery. 2008; 15 (1): p.313-321.
5. Ashford, M. Introducción a la biofarmacia. En: Aulton ME, Farmacia: la ciencia del diseño de las formas farmacéuticas. 2da edición. Editorial Elsevier. Madrid, España, 2004, p-215-218.

6. Bailey AM, Baum RA, Horn K, Lewis T, Morizio K, Schultz A, Weant K, Justice SN. Review of intranasally administered medications for use in the emergency department. *The Journal of Emergency Medicine*. 2017; 53(1): p. 38-48.
7. Banks WA, Morley JE, Niehoff ML, Mattern C. Delivery of testosterone to the brain by intranasal administration: Comparison to intravenous testosterone. *Journal of Drug Targeting*. 2009; 17(2): p. 91-97.
8. Bansal V, Sharma P, Sharma N, Pal O, Malviya R. Applications of Chitosan and Chitosan Derivatives in Drug Delivery. *Advances in Biological Research*. 2011; 5(1): p.28-37.
9. Beaudoin M, Carey MC, Small DM. Effects of taurodihydrofusidate, a bile salt analogue, on bile formation and biliary lipid secretion in the rhesus monkey. *The Journal of Clinical Investigation*. 1975; 56(1): p.1431-1441.
10. Behl CR, Pimplaskar HK, Sileno AP, Xia WJ, Gries WJ, de Meireles JC. Optimization of systemic nasal drug delivery with pharmaceutical excipients. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1998; 29 (1-2): p. 117-33.

11. Berg OH, Lie K, Steinsvag SK. The effects of topical nasal steroids on rat respiratory mucosa in vivo, with special reference to benzalkonium chloride. *Allergy*. 1997; 52(6): p. 627-632.
12. Bernstein C, Holubec H, Bhattacharyya AK, Nguyen H, Payne CM, Zaitlin B. Carcinogenicity of deoxycholate, a secondary bile acid. *Archives of Toxicology*. 2011; 85(8): p. 863-871. doi: 10.1007/s00204-011-0648-7
13. Bhise SB, Yadav AV, Avachat AM, Malayandi R. Bioavailability of intranasal drug delivery system. *Asian Journal of Pharmaceutics*. 2014; 2 (4): p. 201-216.
14. Boddy R, Smith G. Regression and correlation. En: Boddy R, Smith G. *Statistical Methods in Practice: For scientists and technologists*. 1ra edición. Chichester, U.K, Wiley, 2009, pp. 95-96.
15. Bonferoni M C, Rossi S, Sandri G, Ferrari, F., Gavini E, Rassa G, Giunchedi P. Nanoemulsions for “nose-to-brain” drug delivery. *Pharmaceutics*. 2019; 11(2): p. 84-101.

16. Brewster ME, Loftsson T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2007; 59(7): p. 645-666.
17. Caon T, Simões CM. Effect of freezing and type of mucosa on ex vivo drug permeability parameters. *AAPS PharmSciTech*. 2011; 12(2): p. 587-592. doi: 10.1208/s12249-011-9621-2.
18. Cárdenas LN. Diseño de soluciones químicas para la extracción de ácido desoxirribonucleico en productos biotecnológicos. *UGCiencia*. 2016; 22(1): p. 37-44. <https://doi.org/10.18634/ugcj.22v.1i.553>
19. Cárdenas Tirado O. Fármacos y técnicas alternativas para la anestesia y analgesia espinal dirigida a la cirugía del tercio posterior de equinos. Tesis doctoral. Departamento de medicina, cirugía y anatomía veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de León. 2010.
20. Carroll GL, Boothe DM, Hartsfield SM, Waller MK, Geller SC. Pharmacokinetics and selected behavioral responses to butorphanol and its metabolites in goats following intravenous and intramuscular administration. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*. 2001; 28(4): p. 188-195.

21. Chandran S, Singh RS. Comparison of various international guidelines for analytical method validation. *Pharmazie*. 2007; 62(1): p.4-14.
22. Chakraborty S, Shukla D, Jain A, Mishra B, Singh S. Assessment of solubilization characteristics of different surfactants for carvedilol phosphate as a function of pH. *Journal of colloid and interface science*. 2009; 335 (2): p. 242-249. 10.1016/j.jcis.2009.03.047
23. Cheung RCF, Ng TB, Wong JH, Chan WY. Chitosan: An Update on Potential Biomedical and Pharmaceutical Applications. *Marine Drugs*. 2015; 13 (8): p. 5156-5186. <https://doi.org/10.3390/md13085156>
24. Chhajed S, Sangale S, Barhate SD. Advantageous Nasal Drug Delivery System: A Review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2011; 691 (2): p. 1322-1330.
25. Chiavaccini L, Claude AK, Lee H, Ross MK, Meyer RE, Langston VC. Pharmacokinetics and pharmacodynamics comparison between subcutaneous and intravenous butorphanol

- administration in horses. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 2015; 38(1): p. 365-374.
26. Choi HY, Lee YH, Lim CH, Kim YS, Lee IS, Jo JM, Lee HY, Cha HG, Woo HJ, Seo DS. Assessment of respiratory and systemic toxicity of Benzalkonium chloride following a 14-day inhalation study in rats. *Particle and Fibre Toxicology*. 2020; 17(1): p. 5-24.
27. Chow HS, Chen Z, Matsuura GT. Direct transport of cocaine from the nasal cavity to the brain following intranasal cocaine administration in rats. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1999; 88: p 754-758.
28. Clementino AR, Pellegrini G, Banella S, Colombo G, Cantù L, Sonvico F, Del Favero E. Structure and Fate of Nanoparticles Designed for the Nasal Delivery of Poorly Soluble Drugs. *Molecular Pharmaceutics*. 2021; 18(8): p: 3132-3146. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.1c00366.
29. Clerico DM, To WC, Lanza DC. Anatomy of the human nasal passages. En: Doty RL, editor. *Handbook of olfaction and gustation*. 2da edición. Nueva York, Estados Unidos, Editorial Marcel Dekker inc, 2003, pp. 1-16.

30. Connors KA. The Stability of Cyclodextrin Complexes in Solution. *Chemical Reviews*. 1997; 97(5): p.1325-1358.
31. Cornaz Gudet AL, Buri P. Nasal Mucosa as an Absorption Barrier. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*.1994; 40 (5): p. 261-270.
32. Crowe TP, Greenlee MHW, Kanthasamy AG, Hsu WH. Mechanism of intranasal drug delivery directly to the brain. *Life Sciences*. 2018; 195 (15): p. 44-52. doi: 10.1016/j.lfs.2017.12.025.
33. Crowe TP, Hsu WH. Evaluation of Recent Intranasal Drug Delivery Systems to the Central Nervous System. *Pharmaceutics*. 2022; 12; 14(3): p. 629 -655. doi: 10.3390/pharmaceutics14030629.
34. Cruccu G, Ferracuti S, Leardi M G, Fabbri A, Manfredi M. Nociceptive quality of the orbicularis oculi reflexes as evaluated by distinct opiate-and benzodiazepine-induced changes in man. *Brain research*. 1991; 556(2): p. 209-217.
35. Davis SS, Illum L. Absorption Enhancers for Nasal DrugDelivery. *Clin Pharmacokinet*. 2003; 42 (13): p. 1107–1128. <https://doi.org/10.2165/00003088-200342130-00003>.

36. Davis J, Messenger KM, LaFevers DH, Barlow MB, Posner LP. Pharmacokinetics of intravenous and intramuscular buprenorphine in the horse. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 2011; 35(1): p. 52-58.
37. Dellmann HD. Sistema respiratorio. En: Dellman HD, Brown EM. *Histología Veterinaria*. 1era edición. Zagargoza, España, Editorial ACRIBIA, 1976, p.201-222.
38. de Souza Silva MA, Mattern C, Topic B, Buddenberg TE, Huston JP. Dopaminergic and serotonergic activity in neostriatum and nucleus accumbens enhanced by intranasal administration of testosterone. *European Neuropsychopharmacology*. 2009; 19(1): p.53-63. doi: 10.1016/j.euroneuro.2008.08.003.
39. Dey S, Mahanti B, Mazumder B, Malgope A, Dasgupta S. Nasal drug delivery: An approach of drug delivery through nasal route *Pelagia Research Library Der Pharmacia Sinica*. 2011; 2 (3): p. 94-106.
40. Dhuria SV, Hanson LR, Frey WH. Intranasal delivery to the central nervous system: Mechanisms and experimental considerations. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010; 99(4): p. 1654-1673. doi:10.1002/jps.21924

41. Dias BP, Araújo MAD, Deschk M, Trein TA, Pinheiro NC, Perri SHV, Rodrigues CA, Santos PSPD. Effects of a continuous rate infusion of butorphanol in isoflurane-anesthetized horses on cardiorespiratory parameters, recovery quality, gastrointestinal motility and serum cortisol concentrations. *Acta cirurgica brasileira*. 2014; 29(12): p. 801-806.
42. Djupesland PG, Messina JC, Mahmoud RA. The nasal approach to delivering treatment for brain diseases: an anatomic, physiologic, and delivery technology overview. *Therapeutic delivery*. 2014; 5(6): p. 709-733.
43. Dodane V, Vilivalam VD. Pharmaceutical applications of chitosan. *Pharmaceutical Science & Technology Today*. 1998; 1(1): p.246-253.
44. Dondeti P. Development of a New Non-surgical Perfusion Technique to Evaluate Nasal Drug Delivery. Tesis de maestria. University of Rhode Island. 1991.
45. Drejer K, Vaag A, Bech K, Hansen P, Sørensen AR, Mygind N. Intranasal Administration of Insulin With Phospholipid as Absorption Enhancer: Pharmacokinetics in Normal Subjects.

Diabetic Medicine. 1992; 9(4): p. 335-340.

<https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.1992.tb01792.x>

46. Drescher S, van Hoogevest P. The Phospholipid Research Center: Current Research in Phospholipids and Their Use in Drug Delivery. *Pharmaceutics*. 2020; 12(12): p.1235-1271.
47. Dufes C, Olivier JC, Gaillard F, Gaillard A, Couet W, Muller JM. Brain delivery of vasoactive intestinal peptide (VIP) following nasal administration to rats. *International Journal of Pharmaceutics*. 2003; 14; 255(1-2): p.87-97.
48. Einer-Jensen N, Hunter R. Counter-current transfer in reproductive biology. *Reproduction*. 2005; 129(1): p.9-18.
49. Ennis RD, Borden L, Lee WA. The effect of permeation enhancers on the surface morphology of the rat nasal mucosa: a scanning electron microscopy study. *Pharmaceutical Research*. 1990; 7: p. 468 - 475.
50. Erdő F, Bors LA, Farkas D, Bajza A, Gizurarson S. Evaluation of intranasal delivery route of drug administration for brain targeting. *Brain research bulletin*. 2018; 143: p. 155-170.

51. Fang B, Wang L, Chen F, Li P, Shi X. A simple HPLC method for the determination of butorphanol tartrate and ondansetron hydrochloride in patient-controlled analgesia solution. *Acta Chromatographica*. 2018; 30(1): p. 43-46.
52. Fang B, Wang L, Gu J, Chen F, Shi XY. Physicochemical stability of ternary admixtures of butorphanol, ketamine, and droperidol in polyolefin bags for patient-controlled analgesia use. *Drug design, development and therapy*. 2016; 10: p.3873-3878. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S123411>
53. Faustino C, Serafim C, Rijo P, Reis CP. Bile acids and bile acid derivatives: use in drug delivery systems and as therapeutic agents. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2016; 13(2): p.1133-1148. <https://doi.org/10.1080/17425247.2016.1178233>.
54. FDA (2022) NDA 19-890/S-017 STADOL® (butorphanol tartrate) Injection, USP STADOL NS® (butorphanol tartrate) Nasal Spray. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2002/19890s17lbl.pdf
55. Fernández-Campos F, Clares B, Rodríguez-Lagunas MJ, Jauregui O, Casals I, Calpena AC. Ex-Vivo and In-Vivo Assessment of *Cyclamen europaeum* Extract After Nasal Administration.

- Pharmaceutics. 2019; 11(9): p. 426- 438. doi: 10.3390/pharmaceutics11090426.
56. Ferracuti S, Leardi MG, Cruccu G, Fabbri A, Itil TM. Analgesic-antiinflammatory drugs inhibit orbicularis oculi reflexes in humans via a central mode of action. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 1994; 18(1): p.101-113. doi: 10.1016/0278-5846(94)90027-2.
57. Ferreira V. Evaluación farmacococinética y farmacodinámica de la vía intranasal para la administración de butorfanol en equinos. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. 2020.
58. Ferreira V, Velloso MI, Vita M, Landoni MF. Vía intranasal: una alternativa para la administración de fármacos de acción central en equinos. *Analecta Veterinaria*. 2019; 39(1): p 10-20.
59. Franz TJ. On the bioavailability of topical formulations of clindamycin hydrochloride. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1983; 9(1): p. 66-73. doi: 10.1016/s0190-9622(83)70108-8. PMID: 6886106.

60. Frey W H.III. Neurologic agents for nasal administration to the brain [Internet]. 1991. Available from: <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO1991007947&tab=PCTBIBLIO>
61. Gänger S, Schindowski K. Tailoring formulations for intranasal nose-to-brain delivery: A review on architecture, physico-chemical characteristics and mucociliary clearance of the nasal olfactory mucosa. *Pharmaceutics*. 2018; 10(3): p. 116-144.
62. Gao M, Mei D, Huo Y, Mao S. Effect of polysorbate 80 on the intranasal absorption and brain distribution of tetramethylpyrazine phosphate in rats. *Drug delivery and translational research*. 2019; 9(1): p. 311-318. <https://doi.org/10.1007/s13346-018-0580-y>
63. García-Corvillo MP. Nanopartículas poliméricas de administración intranasal para la liberación de activos en el sistema nervioso central. *Ars Pharmaceutica*. 2016; 57(1): p. 27-35.
64. Geneser F, Bruel A, Christensen EI, Trantum-Jensen J, Qvortrup K. Sistema respiratorio. En: Geneser F, Bruel A, Christensen EI, Trantum-Jensen J, Qvortrup K *Histología*. 4ta edición. Madrid, España, Editorial Médica Panamericana, 2015, p. 517-534.

65. Gerken D, Sams R. Factors affecting drug withhold time estimates in horses. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. 1993; 9(3): p.461-479.
66. Ghadiri M, Young PM, Traini D. Strategies to Enhance Drug Absorption via Nasal and Pulmonary Routes. *Pharmaceutics*. 2019; 11 (1): p.113-133.
67. Gheorghe S, Mitroi DN, Stan MS, Staicu CA, Marius Cicirma, Lucaciu IE, Nita-Lazar M, Dinischiotu A. Evaluation of Sub-Lethal Toxicity of Benzethonium Chloride in *Cyprinus carpio* Liver. *Applied Sciences*. 2020; 10 (23): p. 8485-8470.
68. Gibaldi M, Perrier D. *Pharmacokinetics*. 2da edición. Nueva York, EEUU, Marcel Dekker Inc., 1982.
69. Gilger BC. *Equine Ophthalmology*. 1ra edición. St. Louis, Missouri, EEUU, Elsevier, 2005.
70. Gizurason S. Anatomical and histological factors affecting intranasal drug and vaccine delivery. *Current Drug Delivery*. 2012; 9(1): p. 566-582.

71. Gizurarson S, Marriott C, Martin GP, Bechgaard E. The influence of insulin and some excipients used in nasal insulin preparations on mucocilliary clearance. *International Journal of Pharmaceutics*. 1990; 65 (3): p.243-247.
72. Grassin-Delyle S, Buenestado A, Naline E, Faisy C, Blouquit-Laye S, Couderc LJ, Guen ML, Fischler M, Devillier P. Intranasal drug delivery: an efficient and non-invasive route for systemic administration: focus on opioids. *Pharmacology & therapeutics*. 2012; 134(3): p. 366-379.
73. Graudejus O, Ponce Wong RD, Varghese N, Wagner S, Morrison B. Bridging the gap between in vivo and in vitro research: Reproducing in vitro the mechanical and electrical environment of cells in vivo. 11th International Meeting on Substrate Integrated Microelectrode Arrays, MEA Meeting 2018, 2019, Resumen 2. Reutlingen, Alemania. doi: 10.3389/conf.fncel.2018.38.00069
74. Gray H. *Gray's anatomy*. 15ta edición (Classic Collectors edition). Nueva York, Estados Unidos, Editorial Bounty Books, 1978.
75. Groothuis DR, Vavra MW, Schlageter KE, Kang EW, Itskovich AC, Hertzler S, Allen CV, Lipton HL. Efflux of drugs and

solutes from brain: The interactive roles of diffusional transcapillary transport, bulk flow and capillary transporters. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2007; 27 (1): p. 43-56.

76. Guzman Moreno J. Sistema de liberación modificada de administración nasal de acción sistémica. Trabajo de fin de grado. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense. 2018.
77. Hadaczek P, Yamashita Y, Mirek H, Tamas L, Bohn MC, Noble C, Park JW, ankiewicz K. The “perivascular pump” driven by arterial pulsation is a powerful mechanism for the distribution of therapeutic molecules within the brain. *Molecular Therapy*. 2006; 14 (1): p. 69-78.
78. Haq A, Chandler M, Michniak-Kohn B. Solubility-physicochemicalthermodynamic theory of penetration enhancer mechanism of action. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020; 575: p. 1-13. doi: 10.1016/j.ijpharm.2019.118920
79. Hare WCD. Sistema respiratorio de los equinos. En: Sisson S, Grossman JD. *Anatomía de los animales domésticos*. Robert Getty. Tomo I. 5ta edición. Barcelona, España, Salvat Editores S.A., 1982, p. 557-572.

80. Hashizume R, Ozawa T, Gryaznov SM, Bollen AW, Lamborn KR, Frey WH II, Deen DF. New therapeutic approach for brain tumors: Intranasal delivery of telomerase inhibitor GRN163. *Neuro-Oncology*. 2008; 10(2): p.112-120.
81. Hermens WA, Hooymans PM, Verhoef JC, Merkus FW. Effects of absorption enhancers on human nasal tissue ciliary movement in vitro. *Pharm Res*. 1990; 7 (2): p. 144-146.
82. Hunter BG, Parker JE, Wehrman. Morphine synovial fluid concentrations after Intravenous regional limb perfusion in standing horses. *Veterinary Surgery*. 2015; 44 (6): p. 679-686.
83. Ichimura T, Fraser PA, Cserr HF. Distribution of extracellular tracers in perivascular spaces of the rat brain. *Brain Research*. 1991; 545 (1-2): p. 103-113. doi: 10.1016/0006-8993(91)91275-6
84. Illum L. Nasal drug delivery: new developments and strategies. *Drug Discovery Today*. 2002; 7(23): p. 1184-1189.
85. Ishii F, Nii T. Properties of various phospholipid mixtures as emulsifiers or dispersing agents in nanoparticle drug carrier preparations. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2005; 41(4): p. 257-262.

86. Joki S, Saano V, Nuutinen J, Virta P, Karttunen P, Silvasti M. Effects of some preservative agents on rat and guinea pig tracheal and human nasal ciliary beat frequency. *American Journal of Rhinology*. 1996; 10 (3): p. 181-186.
87. Khan AR, Liu M, Khan MW, Zhai G. Progress in brain targeting drug delivery system by nasal route. *Journal of Controlled Release*. 2017; 268: p. 364 - 389. 10.1016/j.jconrel.2017.09.001
88. Kaur G, Mehta SK. Developments of Polysorbate (Tween) based microemulsions: Preclinical drug delivery, toxicity and antimicrobial applications. *International journal of pharmaceutics*. 2017; 529(1-2): p. 134 -160. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.06.059>
89. Keeler JA, Patki A, Woodard CR, Frank-Ito DO. A Computational Study of Nasal Spray Deposition Pattern in Four Ethnic Groups. *Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery*. 2016; 29(2): p.153-66. doi: 10.1089/jamp.2014.1205.
90. Keen B, Cawley A, Fouracre C, Pyke J, Fu S. Towards an untargeted mass spectrometric approach for improved screening in

- equine antidoping. *Drug Testing and Analysis*. 2021; 13(5): p. 1001-1007. doi: 10.1002/dta.3021.
91. Keller LA, Merkel O, Popp A. Intranasal drug delivery: opportunities and toxicologic challenges during drug development. *Drug Delivery and Translational Research*. 2022; 12(4): p. 735-757.
92. Kim D-D. In Vitro Cellular Models for Nasal Drug Absorption Studies. En: Ehrhardt C, Kim KJ. *Drug Absorption Studies: In Situ, In Vitro and In Silico Models*. 1era edición. California, Estados Unidos, 2008, p. 216-234.
93. Knych HK, Casbeer HC, McKemie DS, Arthur RM. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of butorphanol following intravenous administration to the horse. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 2013; 36(1): p.21-30.
94. Koizumi J-I, Kojima T, Ogasawara N, Kamekura R, Kurose M, Go M, Harimaya A, Murata M, Osanai M, Chiba H. Protein Kinase C Enhances Tight Junction Barrier Function of Human Nasal Epithelial Cells in Primary Culture by Transcriptional Regulation. *Molecular Pharmacology*. 2008; 74 (2): p. 432-442. doi: 10.1124/mol.107.043711.

95. Krishan M, Gudelsky GA, Desai PB, Genter MB. Manipulation of olfactory tight junctions using papaverine to enhance intranasal delivery of gemcitabine to the brain. *Drug Deliv.* 2014; 21 (1): p. 8-16. doi: 10.3109/10717544.2013.840017.
96. Kulkarni VS, Shaw C. *Essential Chemistry for Formulators of Semisolid and Liquid Dosages.* 1era edición. London, United Kingdom, Academic Press, 2015.
97. Lalić-Popović M, Vasović V, Milijašević B, Goločorbin-Kon S, Al-Salami H, Mikov M. Deoxycholic Acid as a Modifier of the Permeation of Gliclazide through the Blood Brain Barrier of a Rat. *Journal of diabetes research.* 2013; 1(1): p.1-9.
98. Landau AJ, Eberhardt RT, Frishman WH. Intranasal delivery of cardiovascular agents: an innovative approach to cardiovascular pharmacotherapy. *Am Heart J.* 1994; 127(6): p.1594-1599.
99. Lee WA, Lu HF-L, Maffuid PW, Botet MT, Baldwin PA, Benkert TA, et al. The synthesis, characterization and biological testing of a novel class of mucosal permeation enhancers. *Journal of Controlled Release.* 1992; 22(3): p. 223–237. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(92\)90097-B](https://doi.org/10.1016/0168-3659(92)90097-B)

100. Leyva E, Moctezuma E, Leyva R, Oros S. Estudio de los complejos de inclusión de ácido nalidíxico y ácido oxolínico con ciclodextrinas. *Revista de la Sociedad Química de México*. 2004; 48 (3): p. 189-195.
101. Li J, Wang X, Zhang T, Wang C, Huang Z, Luo X. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015; 10(2): p. 81-98. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2014.09.004>
102. Lochhead JJ, Davis TP. Perivascular and Perineural Pathways Involved in Brain Delivery and Distribution of Drugs after Intranasal Administration. *Pharmaceutics*. 2019; 11(11): p. 598-608. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11110598>
103. Lochhead JJ, Thorne RG. Intranasal delivery of biologics to the central nervous system. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012; 64 (7): p. 614-628. doi: 10.1016/j.addr.2011.11.002
104. Lochhead JJ, Thorne RG. Intranasal drug delivery to the brain. En: Hammarlund-Udenaes M, Lange ECM, Thorne RG & Editors. *Drug Delivery to the Brain: Physiological Concepts, Methodologies and Approaches*. 1° edición. Nueva York, Estados Unidos, Editorial Aapspress, Springer, 2014, p. 401- 432.

105. Longenecker JP, Moses AC, Flier JS, Silver RD, Carey MC, Dubovi EJ. Effects of Sodium Taurodihydrofusidate on Nasal Absorption of Insulin in Sheep. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1987; 76 (5): p. 351-355.
106. Mattheuws JN, Altman DG, Campbell MJ, Royston P. Analysis of serial measurements in medical research. *British Medical Journal*. 1990; 300 (6719): p. 230-235.
107. Marple B, Roland P, Benninger M. Safety review of benzalkonium chloride used as a preservative in intranasal solutions: an overview of conflicting data and opinions. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. 2004; 130(1): p. 131-141.
108. Martín- Jiménez T. Farmacocinética I: absorción y distribución. En: Botana LM, Landoni F, Martín Jimenéz, Farmacología y terapéutica veterinaria. 1era edición. Madrid, España, Editorial McGRAW/HILL/Interamericana de España, S.A.U., 2002, p.33-43.
109. Marttin E, Verhoef JC, Merkus F W H M. Efficacy, Safety and Mechanism of Cyclodextrins as Absorption Enhancers in Nasal

- Delivery of Peptide and Protein Drugs. *Journal of Drug Targeting*. 1998; 6(1): p. 17-36. DOI: 10.3109/10611869808997878
110. Merkus FWHM, Verhoef JC, Marttin E, Romeijn SG, van der Kuy PHM, Hermens WAJJ. Cyclodextrins in nasal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1999; 36 (1): p.41-57.
111. Misra A, Jogan V, Jinturkar K, Vyas T. Recent patents review on intranasal administration for CNS drug delivery; Recent patents on drug delivery & formulation. 2008; 2(1): p. 25-40.
112. Mittal D, Ali A, Md S, Baboota S, Sahni JK, Ali J. Insights into direct nose to brain delivery: current status and future perspective. *Drug delivery*. 2014; 21(2): p. 75-86.
113. Moghimipour E, Ameri A, Handali S. Absorption-Enhancing Effects of Bile Salts. *Molecules*. 2015; 20(8): p. 14451-14473. <https://doi.org/10.3390/molecules200814451>.
114. Monti-Bloch M, Jennings-White C, Berliner DL. The human vomeronasal system: a review. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1998; 855(1): p. 373-389.

115. Moses AC, Gordon GS, Carey MC, Flier JS. Insulin administered intranasally as an insulin-bile salt aerosol. Effectiveness and reproducibility in normal and diabetic subjects. *Diabetes*. 1983; 32(11): p. 1040-1047. doi: 10.2337/diab.32.11.1040.
116. Na L, Mao S, Wang J, Sun W. Comparison of different absorption enhancers on the intranasal absorption of isosorbide dinitrate in rats. *International Journal of Pharmaceutics*. 2010; 397(1): p. 59-66.
117. Natalini CC. Plasma and cerebrospinal fluid alfentanil, butorphanol, and morphine concentrations following caudal epidural administration in horses. *Ciência Rural*. 2006; 36 (5): p. 1436-1443.
118. Nejamkin, P. Abril 2014, fecha de publicación: 29 de abril de 2014. El dolor en los animales. Suplemento Especial 2014: la verdad sobre perros y gatos, avances en la atención de la salud de los animales de compañía. UNICEN Divulga. [Online] <https://www.unicen.edu.ar/content/el-dolor-en-los-animales>
119. Nerella NG, Block LH, Noonan P. The impact of Lag Time on the estimation of pharmacokinetic parameters. I. One-compartment open model. *Pharmaceutical Research*. 1993; 10(7): p. 1-6.

120. Nonaka N, Farr SA, Kageyama H, Shioda S, Banks WA. Delivery of galanin-like peptide to the brain: Targeting with intranasal delivery and cyclodextrins. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2008; 325(2): p. 513-519. doi: 10.1124/jpet.107.132381
121. Ohtake K, Maeno T, Ueda H, Ogihara M, Natsume H, Morimoto Y. Poly-L-arginine enhances paracellular permeability via serine/threonine phosphorylation of ZO-1 and tyrosine dephosphorylation of occludin in rabbit nasal epithelium. *Pharmaceutical Research*. 2003; 20(11) : p. 1838-1845. doi: 10.1023/B:PHAM.0000003383.86238.d1.
122. Pallasch TJ, Gill CJ. Butorphanol and nalbuphine: a pharmacologic comparison. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology*. 1985; 59(1): p.15-20.
123. Papich MG. *Saunders Handbook of Veterinary Drugs Small and Large Animal*. 3era edición. Missouri, Estados Unidos, Editorial Elsevier, 2015, p. 89-91.
124. Pavlović N, Goločorbin-Kon S, Đanić M, Stanimirov B, Al-Salami H, Stankov K, et al. Bile Acids and their Derivatives as

Potential Modifiers of Drug Release and Pharmacokinetic Profiles.

Frontiers in Pharmacology. 2018; 9 (1): p.1289 - 1312.

125. Pei L, Wang LY, Lu JG, Wang C, Li XR. Simultaneous determination of butorphanol tartrate, dextroisomer and benzethonium chloride in butorphanol tartrate injection on cyclodextrin chiral column by HPLC. Chinese Pharmaceutical Journal. 2016; 51(1): p. 1695-1698.
126. Peterson DC, Hamel RN (eds). 2022. Corneal Reflex. StatPearls [Online]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534247/> Acceso el día 1 de noviembre de 2022.
127. Pires A, Fortuna A, Alves G, Falcão A. Intranasal drug delivery: how, why and what for? Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2009; 12(3): p. 288-311.
128. Plumb DC. Manual de farmacología veterinaria. 5ta edición. Buenos Aires, Argentina, Editorial intermédica, 2006, p. 109-111.
129. Prabhakar K, Afzal SM, Surender G, Kishan V. Tween 80 containing lipid nanoemulsions for delivery of indinavir to brain.

Acta Pharmaceutica Sinica B. 2013; 3(5): p. 345-353.

<https://doi.org/10.1016/j.apsb.2013.08.001>

130. Pulsoni I, Lubda M, Aiello M, Fedi A, Marzagalli M, von Hagen J, Scaglione S. Comparison Between Franz Diffusion Cell and a novel Micro-physiological System for In Vitro Penetration Assay Using Different Skin Models. *SLAS Technology*. 2022; 27(3): p. 161-171. doi: 10.1016/j.slast.2021.12.006.
131. Quadir M, Zia H, Needham TE. Toxicological Implications of Nasal Formulations. *Drug Delivery*. 1999; 6(4): p. 227-242. DOI: 10.1080/107175499266823
132. Raja S, Carr D, Cohen M, Finnerup N, Flor H, Gibson S, Keefe F, Mogil JS, Ringkamp M, Sluka KA, Song XJ, Stevens B, Sullivan MD, Tutelman PR, Ushida T, Vader K. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain*. 2020; 161(9): p. 1976-1982. doi: 10.1097/j.pain.0000000000001939.
133. Rennels ML, Gregory TF, Blaumanis OR, Fujimoto K, Grady PA. Evidence for a 'paravascular' fluid circulation in the mammalian central nervous system, provided by the rapid distribution of tracer

protein throughout the brain from the subarachnoid space. *Brain Research*. 1995; 326 (1): p. 47-63.

134. Ross MH, Pawlina W. Sistema respiratorio. En: Ross MH, Pawlina W. *Histología: Texto y Atlas. Con Correlación con Biología Celular y Molecular*. 7ma edición. Barcelona, España, Editorial Wolters Kluwer, 2013, p. 717-752.
135. Ross TM, Martinez PM, Renner JC, Thorne RG, Hanson LR, Frey WH II. Intranasal administration of interferon beta bypasses the bloodbrain barrier to target the central nervous system and cervical lymph nodes: A non-invasive treatment strategy for multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*. 2004; 151(1-2): p. 66-77. doi: 10.1016/j.jneuroim.2004.02.011
136. Rusel WMS, Burch RL. *The principles of Humane Experimental Technique*. Methuen, London, UK, 1959.
137. Salamanca CH, Barrera-Ocampo A, Lasso JC, Camacho N, Yarce CJ. Franz Diffusion Cell Approach for Pre-Formulation Characterisation of Ketoprofen Semi-Solid Dosage Forms. *Pharmaceutics*. 2018; 5; 10(3):p.148-158. doi: 10.3390/pharmaceutics10030148.

138. Sam E, Jeanjean AP, Maloteaux JM, Verbeke N. Apomorphine pharmacokinetics in Parkinsonism after intranasal and subcutaneous application. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 1995; 20 (1): p. 27-33.
139. Sanchez LC, Robertson SA. Pain control in horses: what do we really know?. *Equine Veterinary Journal*. 2014; 46(4): p. 517-523. doi: 10.1111/evj.12265.
140. Schaefer ML, Böttger B, Silver WL, Finger TE. Trigeminal collaterals in the nasal epithelium and olfactory bulb: A potential route for direct modulation of olfactory information by trigeminal stimuli. *The Journal of Comparative Neurology*. 2002; 444(3): p.221-226. doi:10.1002/cne.10143
141. Schipper NGM, Vårum KM, Stenberg P, Ocklind G, Lennernäs H, Artursson P. Chitosans as absorption enhancers of poorly absorbable drugs: 3: Influence of mucus on absorption enhancement. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1999; 14 (7): p. 335-343.
142. Schley D, Carare-Nnadi R, Please CP, Perry VH, Weller RO. Mechanisms to explain the reverse perivascular transport of solutes

- out of the brain. *Journal of Theoretical Biology*. 2006; 238 (4): p. 962-974.
143. Schreier S, Malheiros SVP, de Paula E. Surface active drugs: self-association and interaction with membranes and surfactants. Physicochemical and biological aspects. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. 2000; 1508 (1-2): p. 210-234.
144. Sekhon BS. Surfactants: Pharmaceutical and Medicinal Aspects. *Journal of Pharmaceutical Technology, Research and Management*. 2013; 1(1): p. 43-68.
145. Sellon DC, Monroe VL, Roberts MC, Papich MG. Pharmacokinetics and adverse effects of butorphanol administered by single intravenous injection or continuous intravenous infusion in horses. *American Journal of Veterinary Research*. 2001; 62(2): p. 183-189.
146. Sellon DC, Papich MG, Palmer L, Remund B. Pharmacokinetics of butorphanol in horses after intramuscular injection. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 2009; 32(1), p. 62-65.

147. Selvaraj K, Gowthamarajan K, Karri VVSR. Nose to brain transport pathways an overview: potential of nanostructured lipid carriers in nose to brain targeting. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2018; 46(8): p.2088-2095.
148. Shariatinia Z. Pharmaceutical applications of chitosan. *Advances in Colloid and Interface Science.* 2019; 263: p. 131-194.
149. Singh AK, Singh A, Madhv NS. Nasal cavity, a promising transmucosal platform for drug delivery and research approaches from nasal to brain targeting. *Journal of drug delivery and therapeutics.* 2012; 2(3): p. 22-33.
150. Soane RJ, Frier M, Perkins AC, Jones NS, Davis SS, Illum L. Evaluation of the clearance characteristics of bioadhesive systems in humans. *International Journal of Pharmaceutics.* 1999; 178 (1): p. 55-65.
151. Som I, Bhatia K, Yasir M. Status of surfactants as penetration enhancers in transdermal drug delivery. *Journal of pharmacy & bioallied sciences.* 2012; 4(1): p. 2-9.
<https://doi.org/10.4103/0975-7406.92724>

152. Sosnik A. Tissue-based in vitro and ex vivo models for nasal permeability studies. En: Sarmiento B. Concepts and Models for Drug Permeability Studies: Cell and Tissue Based in Vitro Culture Models. 1era edición, Cambridge, UK. Woodhead Publishing, 2016, p 237-254.
153. Sreevidya VS, Lenz KA, Svoboda KR, Ma H. Benzalkonium chloride, benzethonium chloride, and chloroxylenol- Three replacement antimicrobials are more toxic than triclosan and triclocarban in two model organisms. Environmental pollution. 2018; 235: p. 814-824. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.108>
154. Stütze M, Flamm J, Carle S, Schindowski K. Nose-to-Brain delivery of insulin for Alzheimer's disease. ADMET & DMPK. 2015; 3(1): p. 190-202.
155. Stojančević M, Pavlović N, Goločorbin-Kon S, Mikov M. Application of bile acids in drug formulation and delivery. Frontiers in Life Science. 2013; 7(1): p. 112-122. <https://doi.org/10.1080/21553769.2013.879925>
156. Suhail M, Janakiraman AK, Khan A, Naeem A, Badshah SF. Surfactants and their role in Pharmaceutical Product Development:

- An Overview. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutics*. 2019; 6(1): p. 72-82.
157. Tadros T. Colloid and interface aspects of pharmaceutical science. En: H. Ohshima H, Makino K. *Colloid and Interface Science in Pharmaceutical Research and Development*. 1era edición. Oxford, UK, Elsevier, 2014, p. 29-54.
158. Talegaonkar S, Mishra PR. Intranasal delivery: An approach to bypass the blood brain barrier. *Indian Journal of Pharmacology*. 2004; 36(3): p.140-147.
159. Talevi A, Bellera CL. Absorción de fármacos. En: Talevi A, Quiroga P, Ruiz ME *Procesos biofarmacéuticos*. 1era edición. La Plata, Argentina, Editorial de la Universidad de La Plata, 2016, p. 25-38.
160. Tas C, Ozkan CK, Savaser A, Ozkan Y, Tasdemir U, Altunay H. Nasal administration of metoclopramide from different dosage forms: in vitro, ex vivo, and in vivo evaluation. *Drug Delivery*. 2009; 16(3): p. 167-175. doi: 10.1080/10717540902764172.

161. Tayebati SK, Nwankwo IE, Amenta F. Intranasal drug delivery to the central nervous system: present status and future outlook. *Current Pharmaceutical Design*. 2013; 19(3): p. 510-526.
162. Thorne RG, Pronk GJ, Padmanabhan V, Frey II W H. Delivery of insulin-like growth factor-I to the rat brain and spinal cord along olfactory and trigeminal pathways following intranasal administration. *Neuroscience*. 2004; 127(2): p. 481-496.
163. Tortora GJ, Derrickson B. El aparato respiratorio. En: Tortora GJ, Derrickson B. *Principios de Anatomía y Fisiología*. 13a edición, Madrid, España, Editorial médica panamericana, 2006, p. 918-963.
164. Turner R, Wevrett SR, Edmunds S, Brown M, Atkinson R, Shea T. Validation of an analytical method to quantify the permeation and penetration of flurbiprofen into human pharynx tissue. *Biomedical Chromatography*. 2019; 33(8): p. 1-4 doi: 10.1002/bmc.4499.
165. Vaughan DF. Pharmacokinetics of albuterol and butorphanol administered intravenously and via a buccal patch. Tesis de maestría. Texas A&M University. 2006.
<https://hdl.handle.net/1969.1/391>

166. Velloso MI, Landoni MF. Penetration Enhancers for the Development of Intranasal Formulations for Use in Equines International Journal of Equine Science. 2022; 1(1): p.16-32.
167. Velloso MI, Landoni MF. The use of dodecyltrimethylammonium bromide as penetration enhancer in the development of intranasal formulation in equines. Current topics in Biochemical Research 2023, (en prensa)
168. Velloso MI, Andreetta A, Landoni MF. Puesta a punto un método espectrofotométrico UV/Vis en microplaca para la cuantificación de butorfanol en exposición oral. VIII Jornadas de Jóvenes Investigadores, 2018, volumen 20, p. 225, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.
169. Veronesi MC, Alhamami M, Miedema SB, Yun Y, Ruiz-Cardozo M, Vannier MW. Imaging of intranasal drug delivery to the brain. American Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging. 2020; 10(1): p.1-31.
170. Vetter A, Augustijns P, Bernkop-Schnürch A. Solubilizing agents in nasal formulations and their effect on ciliary beat

- frequency. *Toxicology in Vitro*. 2012; 26(1): p. 150-156.
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.10.011>
171. Vogelsang J, Hayes SR. Butorphanol tartrate (stadol): a review. *Journal of Post Anesthesia Nursing*. 1991; 6(2): p.129-135.
172. Westin U, Piras E, Jansson B, Bergstrom U, Dahlin M, Brittebo E, Bjork E. Transfer of morphine along the olfactory pathway to the central nervous system after nasal administration to rodents. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2005; 24(1): p. 565-573.
173. Williams OW, Sharafkhaneh A, Kim V, Dickey BF, Evans CM. Airway Mucus. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2006; 34 (5): p. 527-536.
174. Xu J, Tao J, Wang J. Design and Application in Delivery System of Intranasal Antidepressants. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2020; 8: p. 1-13. doi: 10.3389/fbioe.2020.626882.
175. Yarbrough, J, Greenacre C, Cox S. Determination of butorphanol using high performance liquid chromatography in small

volume plasma samples. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2014; 37(9): p. 1270-1277.