UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

"DESARROLLO DE UNA FORMULACION TOPICA DE DICLOFENAC PARA USO EN EQUINOS"

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

Ferrante Marcos

DIRECTOR: LANDONI, María Fabiana.

CO-DIRECTOR: ANDREETA, Alfredo

LUGAR DE TRABAJO: Cátedra de Farmacología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Laboratorio de la Cátedra de Farmacotécnia I de la Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata.

MIEMBROS DEL JURADO

Dr. Carlos Bregni

Dr. Pablo Lufrano

Dr. Federico Boffi

2011

A mi Hermana, Rita

A mis Padres, Mabel y Luis

A mi tío Ricardo

AGRADECIMIENTOS

Quiero en principio dar las gracias a Fabiana por haberme dado la posibilidad de realizar esta tesis, por su apoyo y dedicación, por la formación científica recibida, sin su guía y su ayuda, tanto personal como científica, no hubiera sido posible su realización.

A Alfredo por haberme iniciado en el campo de la farmacotecnia, por todo el tiempo dedicado, por sus consejos y su apoyo.

A Nico por compartir sus conocimientos y sus experiencias, por ayudarme a poder ver un rumbo mas claro y por estar siempre presente, éste trabajo también es tuyo.

A Laura por su confianza, por las horas de charlas compartidas y por su especial ayuda en todo momento.

A Tomas, Martín y Alejo por su amistad y su incondicional colaboración.

A Angel por sus tan queridos caballos, por el tiempo dedicado y por el ejemplo de dedicación a los animales.

A Lili, Moni, Leo, Julia, Luis Mario, Diego B, Diego S, Noe, Cristina, Marcelo, Juan y Franco por su apoyo constante y por acompañarme en todos estos años.

A Monica, Vanina, Pedro, Pablo, Nicolas, Javier, Alejandro por todos los momentos compartidos durante estos años.

A Vicky y Chiclana por su colaboración en el laboratorio de farmacotecnia.

Al Laboratorio de control de calidad de la facultad de farmacia por cedernos los equipos para la realización de los ensayos

A Sociedad Rural de Gral Paz por facilitarnos las instalaciones para la realización de los ensayos.

A todos los que directa o indirectamente contribuyeron en la realización de este trabajo.

Muchas gracias a todos.

CITAS BIBLIOGRAFICAS CORRESPONDIENTES A LAS PUBLICACIONES PARCIALES DEL TRABAJO DE TESIS

PUBLICACIONES EN REVISTAS

- Ferrante, M.; Villarino, N,; Andreeta, A.; Landoni, M.F. "Impacto de la remoción del estrato córneo sobre la penetración de diclofenac a través de piel equina", Latin American Journal of Pharmacy Lat. Am. J. Pharm. 2008; 27 (2): 185-190.

- Ferrante, M.; Andreeta, A.; Landoni, M.F. "Effect of different penetration enhancers on diclofenac permeation across horse skin. The Veterinary Journal. 2010; 186 (3): 312-5.

PUBLICACIONES EN CONFERENCIAS Y JORNADAS

- Ferrante, M.; Peralta, V.; Vispo, T.; Andreetta, S.; Rivadulla, P.; Landoni, M.F. "Comparación de la penetración de diclofenac sodico y diclofenac dietilamina a través de piel equina". XVII Jornadas Argentinas y XII Jornadas Latinoamericanas de Farmaco-Toxicologia Veterinaria, 2007. Gral Pico. La Pampa, Argentina.

- Ferrante, M.; Peralta, V.;Olivera, M.; Andreetta, S.; Rivadulla, P.; Landoni, M.F. "Evaluación del efecto del ácido oleico y su asociación con propilenglicol sobre la penetración de diclofenac dietilamina a través de piel equina." XVII Jornadas Argentinas y XII Jornadas Latinoamericanas de Farmaco-Toxicologia Veterinaria, 2007. Gral Pico. La Pampa, Argentina.

- Ferrante, M.; Peralta, V.;Vargas, A.; Andreetta, S.; Rivadulla, P.; Landoni, M.F. "Evaluación del efecto de urea y su asociación con propilenglicol sobre la

penetración de diclofenac dietilamina a través de piel equina". XVII Jornadas Argentinas y XII Jornadas Latinoamericanas de Farmaco-Toxicologia Veterinaria, 2007. Gral Pico. La Pampa, Argentina.

- Ferrante, M.; Peralta, V.; Vargas, A.; Andreetta, A.; Landoni, M.F. "Estudio comparativo de la penetración in vitro de diclofenac a través de piel equina tras la aplicación de una formulación de desarrollo propio y tres formulaciones comerciales." XIX Conferencias de Veterinaria Equina organizada por la AAVE, 2007. Buenos Aires, Argentina.

- Ferrante, M.; Peralta, V.; Olivera, M.; Andreetta, A.; Landoni, M.F. "Estudio comparativo del efecto antiedematoso de diclofenac tras la aplicación de una formulación de desarrollo propio y tres formulaciones comerciales en equinos." XIX Conferencias de Veterinaria Equina organizada por la AAVE, 2007.Buenos Aires, Argentina.

- Ferrante, M.; Peralta, V.; Vispo, T.; Andreetta, A.; Landoni, M.F. "Evaluacion de la penetracion de diclofenac a través de piel equina." XVIII Jornadas Argentinas y XIII Jornadas Latinoamericanas de Farmaco-Toxicologia Veterinaria. Fac. de Cs Veterinarias, UBA. 2008. Buenos Aires, Argentina.

- Ferrante, M.; Olivera, M.; Vargas, A; Peralta, V.; Andreetta, A.; Landoni, M.F. "Evaluacion del efecto antiedematoso de diclofenac tópico en equinos." XVIII Jornadas Argentinas y XIII Jornadas Latinoamericanas de Farmaco-Toxicologia Veterinaria. Fac. de Cs Veterinarias, UBA, 2008. Buenos Aires, Argentina.

- Ferrante, M.; Simpson, M.I.; Babusci, M; Andreeta, A.: Landoni, M.F. Evaluación del efecto del acido oleico al 15 Y 20 % como aumentador de la penetración de diclofenac en piel de equinos. XIX Jornadas Argentinas y XIV Jornadas Latinoamericanas de Fármaco-Toxicología Veterinaria, 2009. Universidad Católica de Córdoba. Córdoba, Argentina.

- Ferrante, M.; Simpson, M.I.; Babusci, M; Andreeta, A.: Landoni, M.F. Evaluación del efecto del limonene al 5 y 10 % como aumentador de la penetración de diclofenac en piel de equinos. XIX Jornadas Argentinas y XIV Jornadas Latinoamericanas de Farmaco-Toxicología Veterinaria. 3 de Septiembre de 2009. Universidad Católica de Córdoba. Córdoba, Argentina.

- Ferrante, M.; Simpson, M.I.; Babusci, M; Andreeta, A.: Landoni, M.F. Evaluación del efecto de la urea al 10 % como aumentador de la penetración de diclofenac en piel de equinos. XIX Jornadas Argentinas y XIV Jornadas Latinoamericanas de Fármaco-Toxicología Veterinaria. 3 de Septiembre de 2009. Universidad Católica de Córdoba. Córdoba, Argentina.

INDICE

RESUMEN (Castellano)……1

RESUMEN (Ingles)……..3

1.* – INTRODUCCION*.....5

1.1. - ADMINISTRACION TÓPICA DE FÁRMACOS 6

1.1.1.- ESTRUCTURA HISTOLÖGICA DE LA PIEL 6

1.1.1.1- DERMIS …….....7

1.1.1.2.- EPIDERMIS ……..7

1.1.1.3.- ORGANIZACIÓN DEL ESTRATO CÓRNEO……...9

1.1.2 – VÍAS DE PENETRACIÓN DE FÁRMACOS ..... …11

1.1.3 – FACTORES QUE LIMITAN LA PENETRACIÓN……12

1.1.3.1 – FACTORES DEPENDIENTES DEL PACIENTE ……...……...13

1.1.3.2 – FACTORES DEPENDIENTES DEL FÁRMACO …….15

1.1.3.3 – FACTORES DEPENDIENTES DE LAS FORMULACIÓN ……..16

1.2.- FORMULACIONES TOPICAS 18

1.3.- MEJORADORES DE LA PENETRABILIDAD 19

1.3.1. – ACIDO OLEICO.....24

1.3.2.- UREA.....25

1.3.3.- D-LIMONENO.....26

1.3.4.- PROPILENGLICOL 26

1.4.- METODOS IN VITRO PARA EL ESTUDIO DE FORMULACIONES TOPICAS.....27

1.4.1.- MÉTODOS IN VITRO PARA EL ESTUDIO DE LA LIBERACIÓN DEL PRINCIPO ACTIVO 27

1.4.1.1- MÉTODO DE PALETA SOBRE DISCO ……..27

1.4.2.- MODELOS IN VITRO PARA EL ESTUDIO DE LA PENETRACIÓN TRANSCUTÁNEA DE DROGAS. 27

1.4.2.1- CELDAS DE DIFUSIÓN DE TIPO FRANZ ……..27

1.4.2.2- ESTIMACIÓN DEL GRADO DE PENETRABILIDAD ……28

1.5. – ESTUDIOS IN VIVO.....30

1.5.1.- RESPUESTA INFLAMATORIA ..... ……30

1.5.1.1.- MEDIADORES DE LA INFLAMACIÓN ……..31

1.5.2.- ARTRITIS AGUDA (SINOVITIS) 35

1.5.2.1.- ETIOPATOGENIA ……35

1.5.3.- ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDES.....37

1.5.3.1.- ESTRUCTURA QUÍMICA ……..37

1.5.3.2.- FARMACOCINÉTICA ……...38

1.5.3.3.- FARMACODINAMIA ……39

1.5.3.4.- TOXICIDAD ……40

1.5.3.5.- DICLOFENAC ……...41

1.5.4.- MODELOS IN VIVO PARA EL ESTUDIO DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO DE FORMULACIONES TOPICAS DE AINEs.....42

1.5.4.1.- ESTUDIOS EN ANIMALES……...42

1.5.4.1.1.- MODELO DE EDEMA INTRADÉRMICO INDUCIDO POR CARRAGENINA……..42

1.5.4.1.2.- MODELO DE SINOVITIS INDUCIDA POR LPS ……43

1.6.- OBJETIVOS 44

1.6.1.- OBJETIVO GENERAL.....44

1.6.2.- OBJETIVOS PARTICULARES.....45

2.- MATERIALES Y MÉTODOS 47

2.1.- PARTE 1. ESTUDIOS IN VITRO.....47

2.1.1- ELABORACIÓN DE LAS 8 FORMULACIONES.....47

2.1.1.1.- LUGAR DE TRABAJO……...47

2.1.1.2.- DESCRIPCIÓN DE LAS FORMULACIONES ……...47

2.1.1.3. – METODO PARA LA PREPARACIÓN DE LAS FORMULACIONES ……49

2.1.2.- ESTUDIO DE LA LIBERACION DEL PRINCIPIO ACTIVO DESDE LAS 8 FORMULACIONES DE DICLOFENAC DIETILAMINA 50

2.1.2.1.- LUGAR DE TRABAJO……...50

2.1.2.2.- DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE DICLOFENAC EN LAS DISTINTAS FORMULACIONES……50

2.1.2.3.- ESTUDIOS DE LIBERACIÓN……...52

2.1.2.4.- ANÁLISIS DE LOS DATOS OBTENIDOS……..53

2.1.3.- ESTUDIO DE LA PENETRACION DEL PRINCIPIO ACTIVO DESDE LAS 8 FORMULACIONES DE DICLOFENAC DIETILAMINA..... 55

2.1.3.1.- LUGAR DE TRABAJO……55

2.1.3.2.- PIEL……..55

2.1.3.3.- CELDAS DE TIPO FRANZ……55

2.1.3.4.- PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO……...…56

2.1.3.4.1.- PREPARACIÓN DE LA PIEL……56

2.1.3.4.2.- PREPARACIÓN DE LAS CELDAS DE DIFUSIÓN ……..57

2.1.3.4.3.- APLICACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS……57

2.1.3.4.4.- TOMA DE MUESTRAS Y ALMACENAMIENTO……57

2.1.3.5.- DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE DICLOFENAC DIETILAMINA.……58

2.1.3.6.- ANALISIS DE DATOS……..58

2.1.3.6.1.- CALCULO DEL FLUJO DE PENETRACIÓN……..……59

2.1.3.6.2.- CALCULO DE TIEMPO LAG…….59

2.1.3.6.3.- CALCULO DEL COEFICIENTE DE PENETRABILIDAD (Kp) ……60

2.1.3.6.4.- CALCULO DE LA TASA DE AUMENTO DE LA PENETRACIÓN (ER) ……..60

2.1.3.6.5.- CALCULO DEL PORCENTAGE DE AUMENTO DE LA PENETRACIÓN (ER%)…….60

2.1.3.7.- ANALISIS ESTADISTICO…….60

2.2.- PARTE 2. ESTUDIOS IN VIVO 61

2.2.1.- ESTUDIO DEL EFECTO ANTIEDEMATOSO DE LAS 8 FORMULACIONES DE DICLOFENAC DIETILAMINA 61

2.2.1.1.- LUGAR DE TRABAJO……...…61

2.2.1.2.- ANIMALES……...61

2.2.1.3.- DISEÑO EXPERIMENTAL……61

2.2.1.4.- MODELO EXPERIMENTAL……..62

2.2.1.5.- PARÁMETROS DE EFICACIA ANTIEDEMATOSA……..63

2.2.1.6.- ANALISIS ESTADISTICO…….64

2.2.2.- ESTUDIO DEL EFECTO CLINICO ANTINFLAMATORIO DE LA FORMULACION DE DICLOFENAC DIETILAMINA CON MEJOR PERFIL *IN VIVO* e *IN VITRO* 65

2.2.2.1.- LUGAR DE TRABAJO……...……65

2.2.2.2.- ANIMALES……...65

2.2.2.3.- CRITERIOS DE INCLUSIÓN DE LOS ANIMALES……...…66

2.2.2.4.- DISEÑO EXPERIMENTAL……66

2.2.2.5.- MODELO EXPERIMENTAL……..67

2.2.2.6.- APLICACIÓN DE TRATAMIENTOS……64

2.2.2.7.- EVALUACION CLINICA DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO……...69

2.2.2.7.1.- LARGO DE PASO……69

2.2.2.7.2.- ÁNGULO EN ESTACIÓN Y FLEXIÓN MÁXIMA……69

2.2.2.7.3.- CIRCUNFERENCIA CARPIANA……...70

2.2.2.7.4.- TEMPERATURA CORPORAL……..70

2.2.2.8.- ANÁLISIS ESTADISTICO…….70

3.- RESULTADOS 71

3.1.-PARTE 1. ESTUDIOS IN VITRO 71

3.1.1.- ESTUDIO DE LA LIBERACION DEL PRINCIPIO ACTIVO DESDE LAS 8 FORMULACIONES DE DICLOFENAC DIETILAMINA..... 71

3.1.2.- ESTUDIO DE LA PENETRACION DEL PRINCIPIO ACTIVO DESDE LAS 8 FORMULACIONES DE DICLOFENAC DIETILAMINA..... 74

3.2.- PARTE 2. ESTUDIOS IN VIVO 78

3.2.1.- ESTUDIO DEL EFECTO ANTIEDEMATOSO DE LAS 8 FORMULACIONES DE DICLOFENAC DIETILAMINA 78

3.2.2.- ESTUDIO DEL EFECTO CLINICO ANTINFLAMATORIO DE LA FORMULACION DE DICLOFENAC DIETILAMINA CON MEJOR PERFIL IN VIVO e IN VITRO (Formulación 2 [15% ácido oleico como mejorador de la penetración]). 88

3.2.2.1.- LARGO DEL PASO ……...88

3.2.2.2.-ÁNGULO EN ESTACIÓN ……..89

3.2.2.3.- ÁNGULO EN FLEXIÓN ……...…90

3.2.2.4.- CIRCUNFERENCIA CARPIANA ……91

3.2.2.5.- TEMPERATURA CORPORAL ……..91

4. DISCUSIÓN 108

5 .- CONCLUSIONES 126

6.- BIBLIOGRAFIA 127

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1.: Estructura histológica de la piel……...7

Figura 1.2.: Organización de la epidermis……..…….10

Figura 1.3.: Vías de penetración transdermal de fármacos…….…… 12

Figura 1.4.: Mecanismos de acción de los mejoradores de la penetración dentro del dominio lipídico intercelular …….. 22

Figura 2.1.2.: Esquema del aparato del modelo de paleta sobre el disco…….…… 53

Figura 2.1.3.: Esquema celda de tipo Franz. ……..…… 56

Figura 3.1.1: Cantidad de diclofenac liberado en función de la raíz cuadrada del tiempo…… 72

Figura 3.1.2: Cantidad acumulada de diclofenac en la cámara aceptora tras la aplicación de 1mg/cm^2 sobre piel equina……76

Figura 3.3: ABC 0-8h del volumen de lesión del edema intradérmico inducido por carragenina……...83

Figura 3.2.2.1.: Porcentaje de cambio desde basal en función del tiempo del largo del paso en equinos artríticos luego de la administración epicutánea de placebo y 1 mg/cm2/6h de diclofenac. Cuadro interior: áreas bajo la curva (ABC) % cambio desde basal vs. tiempo para el largo del paso normalizado en los dos grupos experimentales……..... 93

Figura 3.2.2.2.: Porcentaje de cambio desde basal en función del tiempo del ángulo en estación en equinos artríticos luego de la administración epicutánea de placebo y 1 mg/cm2/6h de diclofenac . Cuadro interior: áreas bajo la curva (AUC) cambio

desde basal vs. tiempo para el ángulo en estación normalizado en los dos grupos experimentales……..... 94

Figura 3.2.2.3.: Porcentaje de cambio desde basal en función del tiempo del ángulo en flexión en equinos artríticos luego de la administración epicutánea de placebo y 1 mg/cm2/6h de diclofenac. Cuadro interior: áreas bajo la curva (AUC) cambio desde basal vs. tiempo para el ángulo en flexión normalizado en los dos grupos experimentales…….. …… 95

Figura 3.2.2.4.: Porcentaje de cambio desde basal en función del tiempo de la circunferencia carpiana en equinos artríticos luego de la administración epicutánea de placebo y 1 mg/cm2/6h de diclofenac. Cuadro interior: áreas bajo la curva (AUC) cambio desde basal vs. tiempo para la circunferencia carpiana normalizado en los dos grupos experimentales…… 96

Figura 3.2.2.5.: Porcentaje de cambio desde basal en función del tiempo de la temperatura corporal en equinos artríticos luego de la administración epicutánea de placebo y 1 mg/cm2/6h de diclofenac. Cuadro interior: áreas bajo la curva (AUC) porcentaje de cambio desde basal vs. tiempo para la temperatura corporal en los dos grupos experimentales…… 97

INDICE DE TABLAS

Tabla 3.1.1: Porcentaje de diclofenac dietilamina liberado a cada tiempo muestral correspondiente a cada ensayo de liberación in vitro……... 73

Tabla 3.1.2: Flujo de penetración in vitro y tiempo lag a través de piel equina tras la aplicación de 1mg/cm^2 de diclofenac dietilamina…….. 77

Tabla 3.2.1.1.: Variación del volumen de lesión edematosa en los sitios controles…… 82

Tabla 3.2.1.2.: Porcentaje de inhibición del volumen de lesión tras la administración tópica de la formulación 1 de diclofenac…….. 83

Tabla 3.2.1.3.: Porcentaje de inhibición del volumen de lesión tras la administración tópica de la formulación 2 de diclofenac…….. 84

Tabla 3.2.1.4.: Porcentaje de inhibición del volumen de lesión tras la administración tópica de la formulación 3 de diclofenac..……..... 84

Tabla 3.2.1.5.: Porcentaje de inhibición del volumen de lesión tras la administración tópica de la formulación 4 de diclofenac..……..... 85

Tabla 3.2.1.6.: Porcentaje de inhibición del volumen de lesión tras la administración tópica de la formulación 5 de diclofenac…….. 85

Tabla 3.2.1.7.: Porcentaje de inhibición del volumen de lesión tras la administración tópica de la formulación 6 de diclofenac…….. 86

Tabla 3.2.1.8.: Porcentaje de inhibición del volumen de lesión tras la administración tópica de la formulación 7 de diclofenac..……..... 86

Tabla 3.2.1.9.: Porcentaje de inhibición del volumen de lesión tras la administración tópica de la formulación 8 de diclofenac.....…….. 87

Tabla 3.2.1.10.: Porcentaje de inhibición del volumen de lesión tras la administración tópica de la formulación 9 de diclofenac…….. 87

Tabla 3.2.2.1.A: Porcentaje de cambio desde basal del largo de paso en equinos con artritis endotóxica tras la administración tópica de 20g totales de la formulación placebo cada 6 h……. 98

Tabla 3.2.2.1.B: Porcentaje de cambio desde basal del largo de paso en equinos con artritis endotóxica tras la administración tópica de 20g totales de la formulación 2 diclofenac (1mg/cm^2) cada 6 h. …… 99

Tabla 3.2.2.2.A: Porcentaje de cambio desde basal del ángulo en estación en equinos con artritis endotóxica tras la administración tópica de 20g totales de la formulación placebo cada 6 h…… 100

Tabla 3.2.2.2.B: Porcentaje de cambio desde basal angulo en estación en equinos con artritis endotóxica tras la administración tópica de 20g totales de la formulación 2 diclofenac (1mg/cm^2) cada 6 h…….. 101

Tabla 3.2.2.3.A: Porcentaje de cambio desde basal del ángulo en flexión en equinos con artritis endotóxica tras la administración tópica de 20g totales de la formulación placebo cada 6 h…… 102

Tabla 3.2.2.3.B: Porcentaje de cambio desde basal del ángulo en flexión en equinos con artritis endotóxica tras la administración tópica de 20g totales de la formulación 2 diclofenac (1mg/cm2) cada 6 h…… 103

Tabla 3.2.2.4.A: Porcentaje de cambio desde basal de la circunferencia carpiana en equinos con artritis endotóxica tras la administración tópica de 20g totales de la formulación placebo cada 6 h…… 104

Tabla 3.2.2.4.B: Porcentaje de cambio desde basal de la circunferencia carpiana en equinos con artritis endotóxica tras la administración tópica de 20g totales de la formulación 2 diclofenac (1mg/cm^2) cada 6 h…..……..... 105

Tabla 3.2.2.5.A: Porcentaje de cambio desde basal de la temperatura corporal en equinos con artritis endotóxica tras la administración tópica de 20g totales de la formulación placebo cada 6 h. ...……..... 106

Tabla 3.2.2.5.B: Porcentaje de cambio desde basal de la temperatura corporal en equinos con artritis endotóxica tras la administración tópica de 20g totales de la formulación 2 diclofenac (1mg/cm^2) cada 6 h…….. ……. 107

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Abreviaturas

5-HT: 5-Hidroxitriptamina

AA: Ácido araquidónico

AINEs: Antiinflamatorios no esteroides

ABC: Área bajo la curva

BPGE2: biciclo Prostaglandina E2

BRM: Agentes Modificadores de la Respuesta Biológica

Cmax: Concentración Máxima

COX: Enzima ciclooxigenasa

COX-1: Enzima ciclooxigenasa isoforma 1

COX-2: Enzima ciclooxigenasa isoforma 2

COX-3: Enzima ciclooxigenasa isoforma 3

COXIBS: Inhibidores selectivos de enzima ciclooxigenasa isoforma-2

csp: Cantidad suficiente para

ER %: porcentaje de aumento de penetración

DFD: Diclofenac dietilamina

DMMB: 1,9 dimetil-metilen-blue

DMSO: Di-metil-sulfóxido

g: gramo

HPLC: Cromatografía líquida de alta performance

IFN□: Interferón gama

IL-: Interleucina

IL-1: Interleucina-1

Jmax: Flujo máximo

Js: Flujo de penetración en estado estacionario

Kp: Coeficiente de penetrabilidad

LOX-5: Enzima 5- Lipoxigenasa

LPS: Lipopolisacárido

LS: Líquido sinovial

MMPs: enzimas Metaloproteinasas de Matriz

ml: Mililitro

ON: Óxido Nítrico

PAF: Factor de agregación plaquetario

PAMP: Patrón molecular asociado a patógeno

PECAM: Molécula de adhesión de las célula plaquetaria

PGE2: Prostaglandina E2

PGG2: Prostaglandina G2

PGH2: Prostaglandina H2

PGI2: Prostaglandina I2

PL: Placebo

PLA2: Enzima fosfolipasa A2

TGFß: Factor de crecimiento ß.

TNF α: Factor de necrosis tumoral α

USP: United States Pharmacopeia

VCAM-1: Molécula de adhesión de las células vasculares -1

WOMAC: Western Ontario and Mc Master Universities Osteoarthritis Index

Símbolos

®: Registrado

DESARROLLO DE UNA FORMULACION TOPICA DE DICLOFENAC PARA USO EN EQUINOS.

PALABRAS CLAVE: Administración transdermal, Diclofenac, Aumentadores de la penetración, Equino.

RESUMEN

Diclofenac es un antiinflamatorio no esteroide ampliamente utilizado en humanos y animales. Estudios anteriores han demostrado que este compuesto tiene una baja difusión percutánea en equinos. Se estudiaron cuatro aumentadores de la penetración (urea al 10%, ácido oleico al 15% y 20% y D-limoneno al 5% y 10%) y el efecto sinérgico de la asociación de urea al 10% y ácido oleico al 15 y 20 % con 20% propilenglicol sobre la difusión percutánea de diclofenac dietilamina a través de piel equina. Para la evaluación comparativa de las formulaciones desarrolladas, se estudió (a) la liberación del principio activo desde la formulación con el aparato 5 de la USP (paleta sobre disco), (b) la penetración in vitro de diclofenac dietilamina a través de piel equina mediante celdas de tipo Franz y (c) el efecto antiinflamatorio de las diferentes formulaciones a través de la cuantificación de la inhibición de la formación de edema tras la inyección intradérmica de carragenina 0.25%. Todas las formulaciones se liberaron de manera adecuada, no observándose diferencias estadísticamente significativas entre ellas. Urea al 10%, D-limoneno al 10% y ácido oleico al 15% indujeron un aumento significativo de la penetración; ninguna de las formulaciones modificó el tiempo Lag. Acido oleico 15% indujo el mayor flujo de

penetración y la mayor actividad antiedematosa. Finalmente, el efecto clínico antiinflamatorio y analgésico de esta formulación fue evaluado con un modelo de artritis aguda endotóxica inducida con LPS (E. coli O55:B5). Los parámetros clínicos mensurados fueron circunferencia carpiana, temperatura corporal, largo de paso, ángulo en estación y ángulo en flexión. La eficacia clínica de la formulación desarrollada fue demostrada a través de los cambios en el ángulo en flexión máxima, reflejando el potente efecto analgésico de la misma.

Este trabajo de tesis describe por primera vez efectos de los aumentadores de la penetración in vitro de diclofenac dietilamina a través de la piel equina. Asimismo, demuestra que la formulación transdérmica de diclofenac dietilamina con acido oleico 15% desarrollada posee un flujo de penetración suficiente como para generar un efecto antiedematoso y analgésico clínicamente evidente en equinos.

DEVELOPMENT OF A DICLOFENAC TOPIC FORMULATION FOR USE IN HORSES.

KEY WORDS: Transdermal administration, Diclofenac, Penetration enhancers, Equine.

SUMMARY

Diclofenac is a widely used NSAID in humans and animals. Previous studies have shown that this compound has a low percutaneous diffusion in horses. We studied four penetration enhancers (urea 10%, 15% and 20% oleic acid and 5% and 10% D-limonene) also, the synergistic effect of the association of 10%urea and 15 and 20% oleic acid with 20% propylene glycol on percutaneous diffusion of diclofenac diethylamine through equine skin was evaluated. For benchmarking formula, was studied (a) the release of the active ingredient from the formulation with the USP apparatus 5 (paddle over disk), (b) in vitro penetration of diclofenac diethylamine through equine skin by Franz-type cells and (c) the antiinflammatory effect of different formulations through the quantification of inhibition of oedema formation after intradermic injection of carrageenan 0.25%. All formulations were properly released, no significant difference was observed between them. 10% urea, 10% D-limonene and 15% oleic acid induced a significant increase in penetration; none of the formulations modified Lag time. 15% Oleic acid induced greater flow of penetration and anti-oedematous activity. Finally, the anti-inflammatory and analgesic clinical effect of this formulation was evaluated with a model of acute

endotoxic arthritis induced by LPS (E. coli O55: B5). Measured clinical parameters were carpal circumference, body temperature, stride length and standing and maximum flexion angles. The clinical efficacy of the formulation developed was demonstrated through changes in the maximum flexion angle, reflecting the potent analgesic effect of it.

This thesis describes, first time, the effects of the penetration enhancers on diclofenac diethylamine penetration through equine skin. It also shows that the developed transdermal formulation of diclofenac diethylamine with 15% oleic acid has a penetration flow high enough to generate clinically evident anti-oedematous and analgesic effects in horses.

1. – INTRODUCCION

Para que un fármaco provoque su acción farmacológica es imprescindible administrarlo por una vía que facilite su llegada al sitio de acción. Esto es posible a través de la administración local o sistémica.

Al momento de la administración de drogas, es posible optar por diferentes vías. La elección se realiza en base al análisis de múltiples factores; dependientes del paciente, de la enfermedad presente en el mismo, de la droga a administrar y de la formulación en que la misma se presenta.

En ciertos casos la elección de la vía no es complicada, como por ejemplo la administración ocular (local) permite el tratamiento de las queratitis, sin la necesidad de distribuir la droga en todo el organismo. Por el contrario, en el caso de drogas que ejercen su acción a nivel del SNC, existen pocas alternativas a la administración sistémica. Sin embargo, existen muchos casos en los que la elección de la vía no es tan sencilla.

En una inflamación localizada, como puede ser una tendinitis, está indicado el uso de los antiinflamatorios no esteroides (AINEs). Si se administra un AINE por vía sistémica se obtendrán concentraciones adecuadas en el foco inflamatorio, a causa de la distribución del fármaco por todo el organismo. De esto se deduce que los AINEs ejercerán su acción farmacológica (inhibición de la síntesis de prostaglandinas) en el foco inflamatorio, como así también a otros niveles, lo cual en ciertos sitios (riñón, epitelio gastrointestinal) se reflejará como efecto secundario. Para evitar los potenciales efectos tóxicos, sin modificar el efecto terapéutico, es conveniente optar por una administración local (epicutánea); siendo necesario, en

muchos casos, favorecer su penetración a través de la piel a efectos de asegurar su llegada al sitio de acción, en el presente ejemplo: el tendón inflamado.

1.1. - ADMINISTRACION TÓPICA DE FÁRMACOS

La piel representa una excelente alternativa para la administración de drogas, ya sea para ejercer acción local o sistémica. La droga que penetre todas las capas de la epidermis accederá a los fluidos tisulares, pudiendo ejercer su acción local. A su vez ingresando a los capilares dermales alcanzará concentraciones sanguíneas que determinen efectos sistémicos.

La piel es considerada una barrera eficiente que previene la absorción de la mayoría de las sustancias aplicadas tópicamente, siendo impermeable a la mayoría de las soluciones acuosas e iones (Kligman, 1964; Ramachandran y Fleisher, 2000 Barry, 2002; Bouwstra y col., 2001; Barry 2001).

1.1.1.- ESTRUCTURA HISTOLÖGICA DE LA PIEL

Desde el punto de vista histológico, la piel se puede dividir en dermis y epidermis (Geneser, 2000).

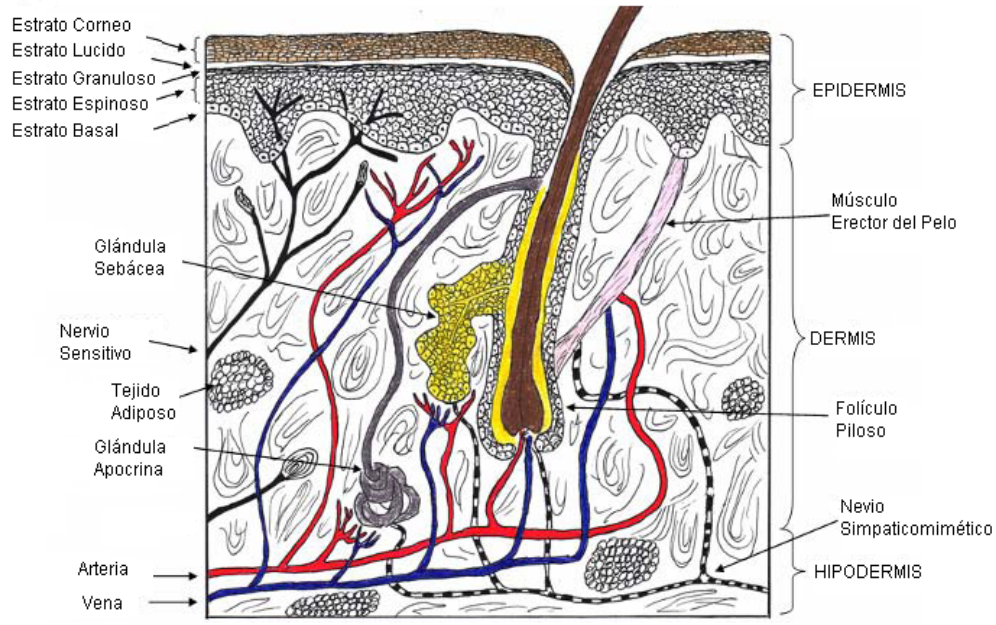


Figura 1.1.: Estructura histológica de la piel.

1.1.1.1- DERMIS

La dermis es un tejido conjuntivo laxo, muy vascularizado. Las células principales son los fibroblastos, encargados de sintetizar los constituyentes de la matriz extra celular (MEC). La MEC está integrada de material forme, como fibras de colágeno, elastina y por material amorfo.

1.1.1.2.- EPIDERMIS

La epidermis es la capa más superficial de la piel, es avascular por lo que se nutre de la dermis. Para su mejor estudio, se la divide en cuatro capas o estratos: estrato basal (EB), estrato espinoso (EE), estrato granuloso (EG) y estrato córneo (EC).

El estrato basal consta de una capa simple de células cúbicas, que yacen sobre una membrana basal. De la división de dichas células se originan los demás

estratos. Estas células son pequeñas con una alta relación núcleo/citoplasma y están unidas entre sí y a las células del EE por medio de desmosomas, y a la membrana basal por hemidesmosomas.

En el estrato espinoso las células presentan un gran número de desmosomas, por lo que en los cortes histológicos posee aspecto espinoso (de ahí su nombre). En este estrato es donde se comienzan a formar los cuerpo laminares (CL), también llamados cuerpos de Odland, queratinosomas o gránulos de recubrimiento de mucosas. Los CL son estructuras intracitoplasmáticas de 0.2 a 0.5 micras de diámetro, rodeados por una membrana trilaminar. Los CL están compuestos por ceramidas glicosiladas, fosfolípidos, colesterol y enzimas hidrolíticas (como lipasas, esfingomielinasas, beta-glucosilcerebrosidasas y fosfodiesterasas). En las capas superiores del EE las células comienzan a tornarse mas planas y elongadas dando origen al EG.

En el estrato granuloso las células presentan, como característica distintiva, la presencia de gránulos intracitoplasmáticos de queratohialina. Estas estructuras están compuestas por profilagrina, loricrina, proteínas ricas en cisteína y queratina. Desde las capas inferiores del EG las células aumentan la síntesis de proteínas y de lípidos, lo que determina el incremento en número y tamaño de los gránulos y de los CL. En las capas más superficiales del EG las células ubican sus CL en su polo apical. Posteriormente, secretan su contenido en los espacios intercelulares, en donde las enzimas co-secretadas actúan sobre los lípidos, resultando en la formación de las estructuras multilaminares. La secreción de CL es uno de determinantes de la diferenciación de los granulocitos del EG en queratinocitos. (Menon y Ghadially, 1997)

El estrato córneo está compuesto por corneocitos, derivados terminales de los queratinocitos. Los espacios intercelulares están ocupados por el contenido de los CL elaborados por los queratinocitos. El EC contiene ceramidas, colesterol, ácidos grasos y pequeñas concentraciones de triglicéridos, glicoesfingolipidos y colesterol sulfato**.** Las ceramidas representan el 40% de los lípidos y son cruciales en la función de barrera del EC. (Bouwstra y col., 1999). El colesterol representa aproximadamente el 25% de los lípidos totales del EC, y es el encargado de promover el entremezclado de los diferentes lípidos.

Los ácidos grasos libres (10%) presentes en el EC son mayoritariamente ácidos grasos saturados de cadena larga (más de 20 carbonos). Los únicos ácidos grasos insaturados en forma libre detectados en el EC son el ácido oleico en un 6% y el linoleico en un 2%. (Wertz y downing, 1991).

La deficiencia en alguno de estos tres lípidos conduce a anormalidades en la función de barrera de la piel. Esto se pone en manifiesto por incrementos en la perdida transepitelial de agua (Menon y Ghadially, 1997), así como, por alteraciones ultraestructurales de los espacios extracelulares (Jiang y Zhou, 2003).

1.1.1.3.- ORGANIZACIÓN DEL ESTRATO CÓRNEO

La clásica organización de “ladrillos y cemento” propuesto por Elias (Elias, 1989) es la más aceptada aún cuando es una simplificación de la descripción organizacional. Los corneocitos cargados de proteínas (queratina) dan nombre a los “ladrillos”. Estos imponen un alto grado de tortuosidad al paso del agua u otras sustancias que intenten atravesar el EC. La tortuosidad está dada por la superposición intercalada de corneocitos (microscópica) y a su vez multiplicada por

el alto grado de ondulaciones de sus superficies (ultramicroscópica). Los corneocitos están directamente implicados en la protección física del EC (Menon y Ghadially, 1997).

Los lípidos presentes en los espacios intercelulares dan la idea del “cemento” que se interpone entre los ladrillos. Este componente lipídico, organizado en estructuras trilaminares, provee la función específica de barrera química (Menon, 2002).

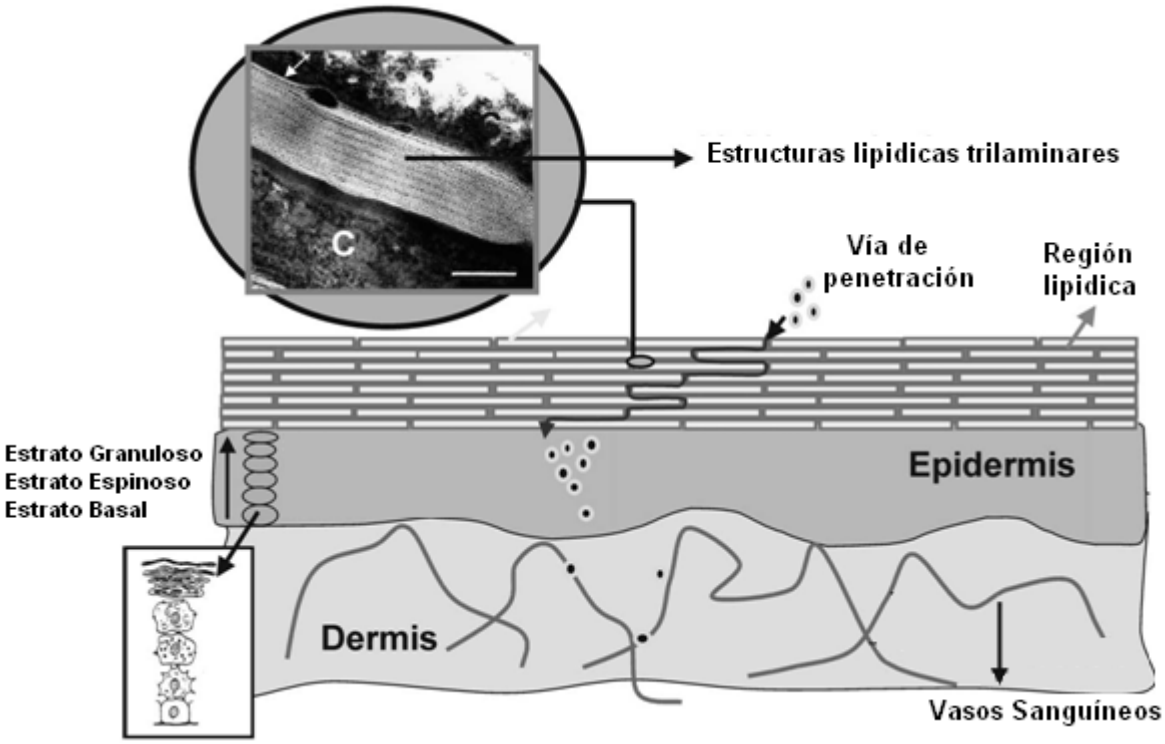


Figura 1.2.: Organización de la epidermis (Bouwstra y col., 2003)

1.1.2 – VÍAS DE PENETRACIÓN DE FÁRMACOS

Desde el punto de vista de la penetración de fármacos, la piel se considera constituida por, a) una capa epicutánea (conformada por un manto ácido y una capa acuosa) (Kligman, 1964) b) el estrato córneo (Bouwstra y col., 2001), c) una capa electrolítica sub-córnea, d) la epidermis, (Kligman, 1964) e) la unión dermato-epidérmica (Malkinson, 1964), f) la dermis y g) la unidad pilo-sebácea (folículo piloso, pelo y glándula sebácea) (Barry, 2001).

Si bien la unión dermato-epidérmica es considerada una barrera importante para la penetración de sustancias a través de la piel (Malkinson, 1964), el estrato córneo es la estructura cutánea paso limitante más importante en la penetración de las drogas (Barry, 2004; Riviere y Papich, 2001).

El pasaje de las drogas a través de los dominios lipídicos del estrato córneo es un proceso lento, seguido de una rápida difusión a través de la epidermis viable y la dermis papilar (Ramachandran y Fleisher, 2000). Ambos procesos se llevan a cabo por difusión pasiva. La velocidad y la magnitud de este transporte están gobernadas por la ley de Fick, según la cual la velocidad de difusión es directamente proporcional al coeficiente de difusión, al coeficiente de partición y a la solubilidad del principio activo en el medio acuoso que rodea la membrana, siendo inversamente proporcional al grosor de la membrana a ser atravesada.

Las drogas aplicadas de forma epicutánea pueden atravesar la piel a través de diferentes rutas: (a) intercelular, (b) transcelular, (c) transfolicular, (d) vía glándula sebácea, (e) vía glándula sudorípara y (f) mixta (Ramachandran y Fleisher, 2000;

Riviere y Papich, 2001; Barry, 2001) siendo la vía intercelular la más común (Barry, 2002) (Ver Figura 1.3).

Se ha reportado que las drogas no polares atraviesan el estrato córneo por la ruta intercelular, mientras que las drogas polares lo hacen por la ruta transcelular (Barry, 2001). Las glándulas sebáceas son más permeables que los corneocitos, por lo tanto la unidad pilo-sebácea (folículo piloso, pelo y glándula sebácea) constituye una vía alternativa que permite que las drogas alcancen la dermis evadiendo la impermeabilidad del estrato córneo intacto (Barry, 2001).

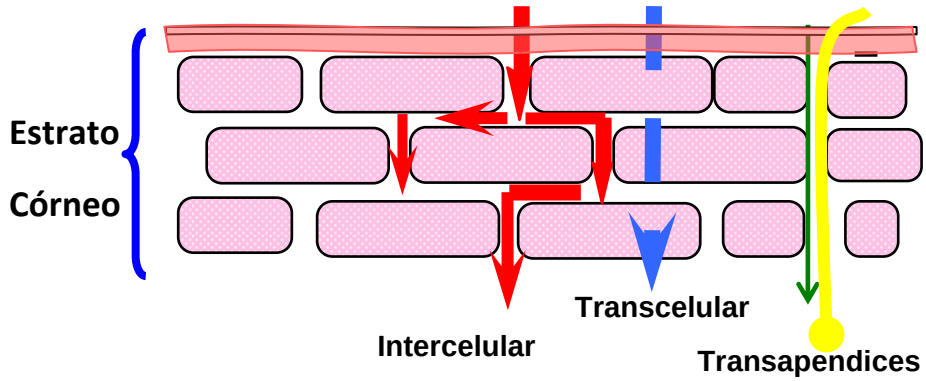


Figura 1.3.: Vías de penetración transdermal de fármacos.

1.1.3 – FACTORES QUE LIMITAN LA PENETRACIÓN

El pasaje de los fármacos administrados en forma tópica a través de todas las estructuras que conforman la piel es imprescindible si se pretende alcanzar concentraciones efectivas a nivel local o sistémico. Sin embargo, este es un objetivo difícil de alcanzar dado que este pasaje (penetración) es altamente variable (Mueller y col., 1997; Mueller y col., 1998; Elias y Feingold, 2001). Los factores que

determinan la penetración de las drogas a través de la piel pueden ser divididos, de acuerdo a su determinante primario, en: a) dependientes del paciente, b) dependientes del principio activo y c) dependientes de la formulación.

1.1.3.1 – FACTORES DEPENDIENTES DEL PACIENTE

Como se mencionara previamente, existen diferentes estructuras que actúan como barreras para la penetración de drogas: (i) la capa epicutánea, (ii) la capa electrolítica subcórnea, (iii) la epidermis, (iv) la unión dermato-epidérmica, (v) la dermis y (vi) la unidad pilosebácea (folículo piloso, pelo y glándula sebácea) (Barry, 2001), siendo el estrato córneo la principal barrera de la piel (Ramachandran y Fleisher, 2000; Barry, 2002; Morgan 2003).

La penetrabilidad de las drogas a través del estrato córneo varía dependiendo de la especie, edad del animal y sitio anatómico de administración (Mills y col., 2005; Riviere y Papich, 2001). El pH de la piel (determinante fundamental del estado de ionización de las moléculas), la temperatura medioambiental (determinante del grado de hidratación cutánea) (Akomeah y col., 2004) y el estado de hidratación general son factores que pueden alterar la magnitud del proceso de penetración de las drogas aplicadas epicutaneamente (Ramachandran y Fleisher, 2000).

Considerando que el estrato córneo posee carga negativa (Barry, 2001) las moléculas aniónicas (ej. PSGAGs) (Platt., 2001) no lo penetrarán fácilmente.

Los pelos alteran la penetración de las drogas actuando como barrera física, limitando el contacto necesario entre la droga y el epitelio para la posterior penetración (Riviere y Papich, 2001). Las consecuencias de la alta densidad pilosa

sobre la penetración de drogas son discutidas. Algunos autores consideran que existe una correlación negativa entre la densidad pilosa y la penetración (Riviere y Papich, 2001), mientras que otros consideran que la alta densidad de folículos pilosos favorece la penetración de las drogas debido a que las invaginaciones del epitelio en los folículos pilosos incrementa el área total de contacto formulación/piel (Magnusson y col., 2001).

Otro factor importante a considerar es el metabolismo epidermal de drogas (Magnusson y col., 2001). La epidermis tiene la capacidad de metabolizar drogas antes de que sean absorbidas a la circulación sistémica (efecto de 1er paso cutáneo) (Bronaugh y col., 1999), habiendo sido reportada la presencia de enzimas que catalizan reacciones metabólicas tanto de fase 1 como de fase 2 (Ramachandran y Fleisher, 2000; Bashir y Maibach, 1999).

Las secreciones de las glándulas sebáceas y sudoríparas, constituyen otra importante variable en el pasaje de las drogas a través de la piel (Riviere y Papich, 2001), lo mismo es cierto para la zona anatómica de aplicación (Ramachandran y Fleisher, 2000; Riviere y Papich, 2001). En este contexto, existen importantes diferencias en el grosor y contenido lipídico de la piel entre las diversas zonas anatómicas con características de zonas de aplicación. Un factor relacionado es el flujo sanguíneo local, cuya modificación determina cambios en los patrones de penetración de drogas (Caron y col., 1990). Estudios de flujo sanguíneo local utilizando eco-doplers han permitido demostrar diferencias intra-animal así como inter-animal (Monteiro y Riviere, 1990).

1.1.3.2 – FACTORES DEPENDIENTES DEL FÁRMACO

En forma general la capacidad de las drogas de difundir a través de las membranas biológicas depende de su peso molecular (< 400 Da), tamaño molecular, grado de ionización y solubilidad. (Riviere y Papich, 2001)

Con respecto a las propiedades fisicoquímicas de las drogas, la capacidad intrínseca de penetración de las moléculas, está determinada por el adecuado equilibrio entre liposolubilidad e hidrosolubilidad; siendo el coeficiente de partición lípido/agua uno de los factores determinantes de la magnitud de las concentraciones iniciales de droga en la capa más superficial del estrato córneo.

Otro factor relacionado con el principio activo es su grado de ionización (Barry, 2001). Este punto es importante ya que el grado de ionización del principio activo formulado para aplicaciones epicutáneas estará determinado no solo por el pH de la piel sino también, por el pH de la formulación.

Como se mencionara previamente, la dermis posee un alto contenido de agua y se comporta como barrera para la penetración de las drogas, fundamentalmente para aquellos compuestos lipofílicos con un coeficiente de partición lípido/agua mayor a 600 (Barry, 2004). Se ha estimado que el estrato córneo provee una resistencia difusional a la penetración 1000 veces superior para las drogas hidrosolubles comparado con las liposolubles.(Riviere y Papich 2001).

1.1.3.3 – FACTORES DEPENDIENTES DE LAS FORMULACIÓN

La más simple de las formulaciones para la administración transdérmica de drogas consiste en un vehículo semisólido (crema o gel), conteniendo una droga homogéneamente distribuida.

La penetración de un principio activo desde la formulación aplicada epicutaneamente hasta la circulación sistémica o tejidos locales involucra múltiples procesos; (a) disolución y liberación dentro y desde la formulación (b) partición dentro del estrato córneo, (c) difusión a través del estrato córneo, (d) partición desde el estrato córneo hacia la fase acuosa de la epidermis, (e) difusión a través de la dermis y (f) acceso a la circulación sistémica y/o tejidos circundantes (Higaki, y col., 2005).

La primera etapa del proceso de penetración, la liberación del principio activo, es controlada por la formulación, y es considerada como el paso limitante del proceso (Kalia y Guy, 2001). Una vez liberado, el principio activo difunde hasta alcanzar la interfase formulación-piel, sitio en el que alcanza un equilibrio.

Las propiedades dependientes de las drogas que determinan su flujo a través de la piel son, de acuerdo a la ley de Fick, el coeficiente de difusión y de partición del principio activo y la solubilidad del mismo en el medio acuoso que rodea la zona de pasaje.

El gradiente de concentración es influenciado por la partición de la droga dentro de la piel y desde la piel hacia los tejidos subyacentes (Müller y col., 2003). El grado de partición dentro de la piel puede ser estimado a partir del coeficiente de

partición octanol-agua (Müller y col., 2003), siendo la curva de correlación coeficiente de partición octanol-agua (logP) vs ritmo de penetración una parábola, lo que define una relación asintótica (Guy y Hadgraft, 1988).

Compuestos con bajo coeficiente de partición (log P) poseen baja permeabilidad debido a su pobre capacidad de partición dentro del dominio lipídico del estrato córneo. Compuestos con un alto log P también mostrarán baja permeabilidad, en este caso debido a su escasa partición fuera del estrato córneo. La máxima penetración se observa en compuestos con log P en el rango de 1 a 3 (Guy y Hadgraft, 1988).

Otra característica del principio activo que determina la partición de la droga dentro de la piel y en el vehículo, es la actividad termodinámica en la formulación. El grado de actividad termodinámica puede ser mejorado incrementando la concentración de la droga o manipulando la formulación para reducir la solubilidad de la droga en el vehículo. La solubilidad de la droga en el estrato córneo puede ser mejorada incorporando sustancias denominadas “mejoradoras” de la penetración, entre ellas DMSO, propilenglicol y terpenos (Aungst y col., 1990; Karande y Mitracotri, 2002).

La estructura química de la droga también influye en la difusibilidad (Scheuplein, 1965), esto sería consecuencia de la interacción de los grupos polares de la molécula con el dominio lipídico del estrato córneo.

La temperatura corporal es otro factor a considerar ya que puede alterar la cinética molecular y el desplazamiento espacial del principio activo (Akomeah, 2004).

1.2.- FORMULACIONES TOPICAS

Las formulaciones clásicas para administración tópica de fármacos pueden ser sólidas (polvos), liquidas o semisólidas.

Los polvos para aplicación cutánea son preparaciones constituidas por partículas sólidas, libres, secas y más o menos finas. Contienen uno o más principios activos, con adición o no de excipientes y, si es necesario, colorantes (Farmacopea Argentina 7ma Ed, 2003).

Las preparaciones líquidas para aplicación cutánea para uso veterinario son preparaciones líquidas destinadas a ser aplicadas a la piel para obtener un efecto local y/o general. Son soluciones, suspensiones o emulsiones que pueden contener uno o más principios activos en un vehículo adecuado (Farmacopea Argentina 7ma Ed, 2003).

Las preparaciones semisólidas para aplicación cutánea se formulan para conseguir una liberación local o transdérmica de los principios activos, o para su acción emoliente o protectora. Tienen un aspecto homogéneo. Las preparaciones semisólidas para aplicación cutánea están constituidas por una base, simple o compuesta, en la cual habitualmente están disueltos o dispersos uno o más principios activos. Pueden ser pomadas hidrófilas, cremas o geles (Farmacopea Argentina 7ma Ed, 2003).

Las pomadas hidrófilas son preparaciones cuyas bases son miscibles con agua. Las bases están constituidas generalmente por mezclas de macrogeles

(polietilenglicoles) líquidos y sólidos. Pueden contener cantidades adecuadas de agua (Farmacopea Argentina 7ma Ed, 2003).

Las cremas son preparaciones multifásicas constituidas por una fase lipófila y una fase acuosa. En las cremas lipófilas la fase contínua es la fase lipófila; estas preparaciones contienen agentes emulgentes del tipo agua en aceite tales como lanolina, ésteres del sorbitano y monoglicéridos. En las cremas hidrófilas la fase externa es la fase acuosa; estas preparaciones contienen agentes emulgentes del tipo aceite en agua tales como jabones de sodio o de trolamina, alcoholes grasos sulfatados, polisorbatos y ésteres de ácidos y de alcoholes grasos poioxietilenados, combinados, si es necesario, con agentes emulgentes del tipo agua en aceite (Farmacopea Argentina 7ma Ed, 2003).

Los geles están formados por líquidos gelificados con la ayuda de agentes gelificantes apropiados. Los geles lipófilos (oleogeles) son preparaciones cuyas bases están constituidas habitualmente por parafina líquida con polietileno o por aceites grasos gelificados con sílice coloidal o por jabones de aluminio o zinc. Los geles hidrófilos (hidrogeles) son preparaciones cuyas bases generalmente son agua, glicerol y propilenglicol gelificado con la ayuda de agentes gelificantes apropiados tales como almidón, derivados de la celulosa, carbómeros y silicatos de magnesio y aluminio (Farmacopea Argentina 7ma Ed, 2003).

1.3.- MEJORADORES DE LA PENETRABILIDAD

Existe un grupo de compuestos que ha demostrado cierta capacidad de modificar el estrato córneo, estos compuestos se denominan mejoradores de la

penetración o promotores de la absorción. Este grupo incluye numerosos compuestos de variada estructura química.

Aún cuando a la fecha no se ha descrito el compuesto ideal, existen ciertas características que estos compuestos deben poseer a efectos de ser incluidos en el grupo (Williams y Barry, 2004):

*.- Ser atóxicos, no irritantes y no alergénicos.

*.- Actuar en forma rápida, con efecto predecible y reproducible.

*.- Carecer de acción específica en el organismo, es decir no deben interactuar con receptores.

*.- Poseer efecto unidireccional. Esto significa que deben permitir el pasaje de los agentes terapéuticos al interior del organismo evitando la pérdida de compuestos endógenos.

*.- Poseer efecto reversible o sea, una vez removidos de la piel las propiedades de barrera de la misma deben retornar a basal en forma rápida y completa.

*.- Ser compatibles no solo con el principio activo sino también, con los vehículos que conforman la formulación.

*.- ser aceptables desde el punto de vista cosmético.

Basado en lo anteriormente expuesto en relación a las leyes que rigen la difusión de compuestos a través de la piel, los mejoradores de la penetrabilidad pueden provocar las siguientes acciones:

1.- Incrementar el coeficiente de difusión del principio activo en el estrato córneo (alterando las características de barrera del mismo)

2.- Incrementar la concentración efectiva del principio activo en el vehículo (actuando como solventes)

3.- Mejorar el fraccionamiento del principio activo entre la formulación y el estrato córneo (posiblemente a través de la alteración de la característica natural de solvente de las diferentes membranas de la piel, mejorando el fraccionamiento en los tejidos).

4.- Disminuir el espesor de la piel (creando atajos permeables).

Los modos de acción de los mejoradores de la penetración son, en general, complejos. Estos compuestos interactúan con los componentes lipídicos y, en menor grado, proteicos de la piel. En la Figura 1 se resumen las posibles acciones de los mejoradores de la penetración dentro del dominio lipídico intercelular. Este esquema fue propuesto por Menon y Lee (1998) y describe las acciones en este dominio.

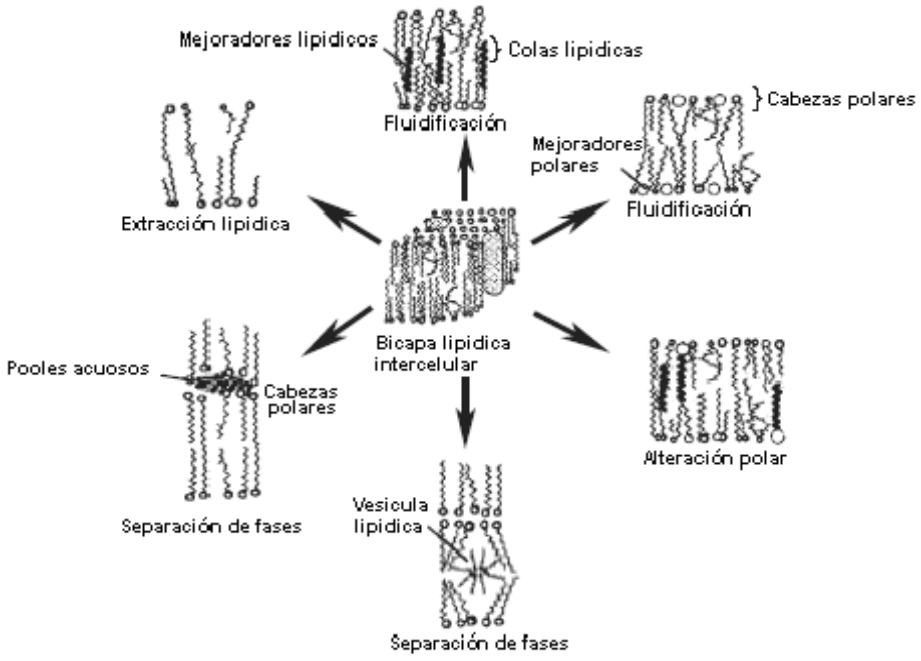


Figura 1.4.: Mecanismos de acción de los mejoradores de la penetración dentro del dominio lipídico intercelular (Williams y Barry, 2004).

Basado en este esquema los mejoradores de la penetración pueden agruparse, de acuerdo a su mecanismo de acción, en los siguientes grupos (Williams y Barry, 2004):

a).- Compuestos que alteran la altamente ordenada estructura lipídica del estrato córneo incrementando la difusión intercelular.

b).- Compuestos que interactúan con las proteínas intracelulares aumentando la penetración a través de los corneocitos.

c).- Compuestos que mejoran el particionamiento del principio activo (co-mejoradores o co-solventes) dentro del estrato córneo.

A fines del siglo pasado Menon y Lee, (1998) incorporaron otros 3 mecanismos al modelo original, a saber:

d).- Compuestos que alteran la cubierta de los corneocitos, actuando como cáusticos (fenol a altas concentraciones o hidrocarburos).

e).- Compuestos que afectan las uniones proteicas, como los desmosomas, involucrados en la cohesión de las escamas.

f).- Compuestos que alteran el particionamiento del principio activo entre los componentes del estrato córneo y los lípidos en las diferentes vías de difusión.

En el contexto de la difusión, el efecto inicial del vehículo es la entrada a los lípidos intercelulares o a la cubierta del corneocito conjuntamente con el mejorador/solvente. Esta entrada está determinada por el potencial químico del soluto para fraccionarse desde el vehículo hacia los lípidos. El soluto y/o solvente difunde/n a través de la región lipídica e incrementan la fluidez de los lípidos intercelulares o de la envoltura del corneocito a través de su interacción con las colas lipídicas (mejoradores lipídicos) y/o cabezas polares (mejoradores polares). Esto conduce a la extracción de los lípidos intercelulares y/o a cambios en la polaridad de los lípidos intercelulares o de la cubierta del corneocito. Estos efectos conducen a la formación de pooles o vesículas a través de la asociación con solventes polares (agua en la región de las cabezas polares) o solventes lipídicos (en la región lipídica de las colas). Con algunos mejoradores, especialmente los agentes higroscópicos, la integridad de los desmosomas u otras uniones proteicas involucradas en la cohesión del estrato córneo pueden verse afectadas, resultando en una fisura o solución de continuidad de las escamas del corneocito. En

condiciones severas, especialmente con solventes polares y surfactantes, los solutos pueden penetrar el citoplasma del corneocito alterando la queratina y provocando vacuolización.

En el presente trabajo de tesis se estudiará la efectividad de 4 mejoradores de la penetrabilidad, solos (a diferentes concentraciones) o combinados. A continuación se discuten las características individuales de cada uno de ellos, así como de las combinaciones.

1.3.1. – ACIDO OLEICO

Muchos ácidos grasos de cadena larga han demostrado capacidad para actuar como mejoradores de la penetrabilidad de principios activos administrados en forma epicutánea. Dentro del grupo, el ácido oleico es el compuesto que presenta la máxima eficacia.

El ácido oleico ha sido reportado como mejorador de la penetración para numerosos principios activos, como naloxona (Aungst y col., 1989) antiestrogenos (Funke at al., 2002) piroxicam (Santoyo y Ygartua, 2000) y melatonina (Kandimalla y Singh, 1999).

Su mecanismo de acción se basa en su interacción con los dominios lipídicos del estrato córneo modificando su estructura y alterando su acción de barrera. De acuerdo a Ognipattanakul (1991) el ácido oleico crearía un pool entre la bicapa lipídica. Esta hipótesis fue demostrada utilizando microscopia electrónica (Tanojo y col., 1997; Jiang y col., 2003); estos estudios demostraron que el ácido oleico induce la formación de dominios lipídicos discretos entre la bicapa lipídica, que

afectan la permeabilidad y facilitan la permeación de compuestos (fundamentalmente liposolubles) a través de la piel.

1.3.2.- UREA

La urea es uno de los componentes del factor humectante natural (NMF) presente en la piel (Lippold y Hackemuller, 1990; Ritschel y Sprockel, 1988). Al ser aplicada topicamente, provoca la hidratación del estrato córneo, aumentando la permeabilidad transdérmica para compuestos tanto hidrofílicos como lipofílicos (Gloor y col., 2001; Wong y Rytting, 1995; Williams, 1995). Asimismo, la urea posee propiedades queratolíticas lo cual (aunque en menor grado) coadyuva al incremento de la permeabilidad del estrato córneo.

La urea y sus derivados han sido utilizados como mejoradores de la penetración para numerosos principios activos, entre ellos, hidrocortisona (Feldman y Maibach, 1967; Barry y Woodford, 1976; Wohlrab, 1984), ketoprofeno (Kim y col., 1993), dihidroergotamina (Niazy, 1991) indometacina (Nishihata y col., 1990) y 5-fluorouracilo (Williams y Barry, 1989).

Urea promueve la penetración transdérmica, facilitando la hidratación del estrato córneo por medio de la formación de canales de difusión hidrofílicos dentro de la barrera. La asociación de urea con otros mejoradores de la penetración, especialmente propilenglicol, conduce a un efecto sinérgico que se refleja en el mejoramiento significativo de la permeabilidad de compuestos tanto polares como apolares (Williams y Barry, 1989).

1.3.3.- D-LIMONENO

El D-limoneno es un terpeno hidrocarbonado. Los terpenos son constituyentes de los aceites esenciales de baja toxicidad. Su estructura química es simple (carbono, hidrógeno y oxígeno) y no aromática. Existe una amplia variedad de terpenos con diferentes características; todos ellos (en mayor o menor medida) son mejoradores de la penetrabilidad, especialmente, de compuestos lipofílicos. El D-limoneno es uno de los compuestos más potentes del grupo.

Los terpenos en general y el D-limoneno en particular se han utilizado para mejorar la penetrabilidad de un amplio rango de principios activos entre ellos, midazolam (Ota y col., 2003) diclofenac (Hendradi y col., 2003) 5-fluorouracilo (Williams y Barry, 1989), indometacina (Okabe y col., 1989), morfina (Morimoto y col., 2002) e imipramina (Jain y col., 2002).

El mecanismo por el cual estos compuestos incrementan la permeabilidad se basa en su capacidad de modificar la organización lipídica intercelular en el estrato córneo.

1.3.4.- PROPILENGLICOL

Propilenglicol provoca una alteración de la organización de los lípidos del estrato córneo que incrementa la difusión de fármacos a través de la piel (Mitragotri 2000). El efecto sinérgico de la asociación glicoles-ácido oleico (especialmente propilenglicol) ha sido ampliamente reportada (Williams y Barry, 2004; Cooper y col., 1985; Ruland y col., 1994). Este efecto sinérgico ha sido reportado para tenoxicam, un AINE de tipo oxicam (Larrucea y col., 2001). Si bien el mecanismo del sinergismo

no está totalmente dilucidado, es posible que el propilenglicol actúe como solvente, interactuando con las regiones polares de la capa lipídica, facilitando la incorporación del ácido oleico al dominio alquil-lipídico del estrato córneo.

1.4.- METODOS IN VITRO PARA EL ESTUDIO DE FORMULACIONES TOPICAS

1.4.1.- MÉTODOS IN VITRO PARA EL ESTUDIO DE LA LIBERACIÓN DEL PRINCIPO ACTIVO

1.4.1.1- MÉTODO DE PALETA SOBRE DISCO

El método de paleta sobre disco que se encuentra codificado en la USP como Aparato 5, es uno de los más convenientes y con frecuencia utilizado para caracterizar la liberación del fármaco desde formulaciones de aplicación tópica (USP XXX NF25, 724 drug release, 2006).

1.4.2.- MODELOS IN VITRO PARA EL ESTUDIO DE LA PENETRACIÓN TRANSCUTÁNEA DE DROGAS.

1.4.2.1- CELDAS DE DIFUSIÓN DE TIPO FRANZ

La celda de difusión de Franz representa, desde su desarrollo en 1978 (Franz, 1978), el principal método utilizado para evaluar la penetración transepitelial de fármacos (Mills y Cross 2006; Higaki, 2005; Jacobi y col., 2005; Mukherjee y col., 2005). La celda de difusión es un sistema compuesto por dos cámaras, una donante y otra aceptora, separadas por piel o membrana artificial. El estrato córneo es orientado hacia la cámara donante a través de la cual se aplican las formulaciones a estudiar. Las celdas de difusión son mantenidas a 32-35^{o}C (Escribano y col., 2003).

Aún cuando este método es considerado un sistema confiable de screening para evaluar la bioequivalencia/ biodisponibilidad (Kreilgaard, 2002), tiene varias limitaciones. Por un lado no contiene como variable de análisis a las rutas de eliminación de drogas (sistema vascular y metabolismo en la dermis) y por otro, no pondera las modificaciones fisiológicas de la piel (contenido de agua, pH cutáneo, descamación del estrato corneo, temperatura) (Riviere y Papich, 2001; Ponec, 2002). Es importante remarcar que la piel una vez montada en celdas de Franz o sistemas similares permanece con un grado constante de hidratación durante todo el período del ensayo. Este factor podría afectar la bicapa lipídica (Warner y col., 1999) o inducir la formación de vesículas extracelulares en el estrato (Van Hal, 1996).

Aún con las desventajas mencionadas este modelo *in vitro* es el mejor indicador cualitativo de la penetración cutánea de fármacos (Nokhodch y col., 2002).

1.4.2.2- ESTIMACIÓN DEL GRADO DE PENETRABILIDAD

La aplicación de la ley de Fick al análisis de la curva de disposición de drogas tras la administración epicutánea, permite cuantificar los parámetros que reflejan la penetración como, flujo de droga (J) y coeficiente de penetrabilidad (k_p) (Roberts y Cross, 1999). La penetración de una molécula a través de las estructuras de la piel, genera un gradiente de concentración alcanzando un flujo de régimen estacionario que se puede describir con la siguiente ecuación:

$$\text{Flujo } (Js)(\mu g/cm/h)) = (Dq/Dt) \times (1/A)$$

Donde Dq es la cantidad de droga que atraviesa la piel, Dt es el tiempo, (siendo la relación Dq/Dt representativa del flujo de droga en estado estacionario expresado en µg/h) y A, el área de aplicación expresado en cm^2.

El flujo está estrechamente relacionado con el coeficiente de penetrabilidad (K_p), el cual relaciona el flujo del soluto con el gradiente de concentración a través de la membrana o piel.

$$K_p = Js/ \text{ dosis aplicada}$$

El flujo máximo (J_{max}) puede ser medido experimentalmente como el flujo desde una solución saturada a partir de K_p multiplicado por la solubilidad de la droga en la fase donante y representa una estimación de la cantidad máxima de droga que puede atravesar un área definida por unidad de tiempo (Hadgraf, 1996)

El desarrollo de modelos matemáticos para describir y estimar la permeabilidad de la piel es un área de crecimiento constante, especialmente para predecir la penetrabilidad de sustancias hidrofóbicas a través del estrato corneo (Potts, 1992; Roberts y col., 1999). Estos modelos pueden ser categorizados de acuerdo a: (I) la relación de penetrabilidad/estructura cuantitativa (QSPRs), (II) expresiones basadas en mecanismos de difusión o (III) combinación de ambos.

1.5. – ESTUDIOS IN VIVO

1.5.1.- RESPUESTA INFLAMATORIA

La respuesta inflamatoria ha sido reconocida desde la antigüedad. Descripciones precisas de los cambios orgánicos que acompañan la inflamación aguda fueron realizadas por los egipcios 2000 años antes de Cristo. Asimismo, los escritos de Hipócrates (460-380BC) incluyen su descripción, bajo la denominación de “fenómeno ardiente (*burning)*” (Majno, 1975).

El proceso inflamatorio es una respuesta compleja de los organismos vivos ante una injuria. Es un proceso que acompaña a la mayoría, sino a todos los procesos patológicos. Este proceso es la consecuencia final de una muy sofisticada interacción de mediadores y sustancias relacionadas con la inflamación. Es importante reconocer a la inflamación como un mecanismo de defensa del organismo, por lo tanto debiera ser considerado como un proceso fisiológico. La respuesta inflamatoria incluye una serie de cambios en el sistema vascular periférico, la sangre y el tejido conectivo diseñados para eliminar el estímulo inflamatorio inicial y reparar los tejidos dañados morfológica y funcionalmente.

La respuesta inflamatoria es, en los organismos superiores, uno de los mecanismos de defensa más importantes, paradójicamente también representa uno de los mecanismos por el cual los tejidos son injuriados.

La respuesta inflamatoria es un proceso complejo que involucra componentes celulares (neuronas, plaquetas y leucocitos) y humorales (proteínas de fase aguda, complemento, citocinas, etc.) que se desencadena secuencial y/o simultáneamente

(Murata, 2004; Cohen, 2002). Este importante mecanismo protector puede ser dividido conceptualmente en dos etapas, íntimamente relacionadas, que conforman un mismo proceso: *inflamación y reparación*.

La respuesta vascular que incluye vasoconstricción inicial neurogénica, vasodilatación e incremento en el flujo sanguíneo local, con expresión de moléculas de adhesión (VCAM-1, PECAM y selectinas), es consecuencia de la liberación local de mediadores químicos de la inflamación (aminas vasoactivas, eicosanoides, citocinas , factor activador plaquetario, etc.). Conjuntamente con la respuesta celular efectora (extravasación celular, quimiotaxis, fagocitosis, etc.), conduce a las manifestaciones locales de la respuesta inflamatoria aguda. Estas manifestaciones, también llamadas signos cardinales, fueron descriptos por Cornelius Celsus e incluyen dolor, tumor, calor y rubor, con un quinto signo cardinal, incluido posteriormente por Rudolf Virchow (Majno , 1975), la pérdida de función.

1.5.1.1.- MEDIADORES DE LA INFLAMACIÓN

Probablemente los mediadores inflamatorios más estudiados y considerados los blancos primarios para el manejo del proceso inflamatorio agudo son los eicosanoides y entre ellos, las prostaglandinas.

Los eicosanoides, son potentes mediadores lipídicos sintetizados a partir de la oxigenación del ácido graso poli-insaturado más abundante de la membrana celular, el ácido araquidónico (Zurier**,**2003). Tienen una actividad tanto autócrina como parácrina, interactuando con receptores asociados a proteína G. (Charlier y Michau, 2003).

La activación de la enzima fosfolipasa A_2 (PLA_2), en respuesta a varios estímulos, cataliza la liberación del ácido araquidónico (AA) desde la membrana celular. Este es metabolizado, principalmente, a través de dos vías enzimáticas: la vía ciclooxigenasa (COX) y 5- lipooxigenasa (5-LOX), sintetizándose diferentes mediadores inflamatorios: prostaglandinas, tromboxano (vía COX) y leucotrienos (vía 5-LOX) (Charlier y Michau, 2003).

La enzima ciclooxigenasa, también llamada prostaglandina sintetasa, (Broks y co., 1999; Hawken, 2001) cataliza dos tipos de reacciones: a) una reacción de ciclo-oxigenación del ácido araquidónico (en el sitio catalítico ciclooxigenasa), formando PGG_2 (Brooks y col., 1999; Hawken, 2001) y b) una reacción de reducción (en el sitio peroxidasa) de PGG_2 formándose PGH_2 (Warner, 1999; Broks y col., 1999; Hawken 2001). Posteriormente, las isomerasas y oxidoreductasas producen varios isómeros de prostaglandinas usando como sustrato PGH2 (Simmons y col., 2004).

Desde su primera purificación, en 1976 (a partir de vesículas seminales de carneros (Hemler y Lanas 1976) y toros (Miyamoto y col., 1976), se han identificado tres isoformas de la enzima ciclooxigenasa. Ciclooxigenasa-1 (COX-1), ubicada en la mayoría de los tejidos (Dewith y Smith, 1988), es considerada la isoforma constitutiva, ya que interviene en la síntesis de las prostaglandinas encargadas de funciones de ”house keeping”, o sea las funciones fisiológicas relacionadas con la homeostasis celular. Sin embargo existen reportes que indican que los productos derivados de la actividad COX-1, también contribuyen en la respuesta inflamatoria (Giuliano y Warner 2002; Wallace y col., 1998).

La isoforma COX-2, identificada en 1991, (Kujubu y col., 1991; Xie y col., 1991), es sobreexpresada en diferentes células (macrófagos, sinoviocitos, condrocitos) (Iñiguez y col., 1998) en respuesta a diferentes estímulos, entre ellos mediadores proinflamatorios (LPS, IL-1) y factores de crecimiento. Esta característica le valió la denominación de isoforma inducible. Sin embargo, actualmente se ha reportado su presencia constitutiva en diversos tejidos (SNC, ovarios y hueso). A pesar que COX-2, fue vinculada principalmente a la síntesis de prostanoides en procesos patológicos (inflamación aguda y crónica) (Simmons y col., 2004), varios investigadores reportaron su intervención en la síntesis de prostaglandinas relacionadas a procesos fisiológicos en diferentes sistemas (sistema nervioso central, sistema reproductor, sistema vascular y renal) (Charlier y Michau 2003; Colville-Nash y Gilroy, 2001) así como, en procesos de reparación de heridas (Einhorn, 2002).

Una tercera isoforma de COX (COX-3), postulada por Willoughby en el año 2000 (Willoughby y col., 2000), ha sido identificada en cerebro canino (Chandrasekharan y col., 2002). Esta enzima es una iso-variante de COX-1 con una menor capacidad de síntesis de prostaglandina E_2 (PGE_2). A la fecha, no existen reportes completos sobre su distribución tisular y/o participación en procesos fisiológicos y/o patológicos.

Las prostaglandinas se dividen, basado en la naturaleza y posición de los sustituyentes en el anillo ciclopentano, en sub-grupos identificados con letras desde la A a la J.

Las prostaglandinas se identifican como series 1, 2 y 3 de acuerdo al ácido graso precursor:

Serie 1: sintetizada a partir del ácido eicosatrienoico 20:3 (oleico)

Serie 2: sintetizada a partir del ácido araquidónico (eicosatetraenico) 20:4 (linoleico)

Serie 3: sintetizada a partir del ácido eicosapentaenoico 20:5 (linolenico).

La serie 2 incluye las prostaglandinas de mayor importancia biológica en los organismos eucariotas. Numerosos estudios demuestran que las prostaglandinas intervienen en un amplio rango de funciones fisiológicas y patológicas, entre ellas, respuesta a la injuria, inflamación, vasodilatación/vasoconstricción, homeostasis renal, mitosis, transformación celular, regulación de la respuesta inmune, diferenciación celular, reabsorción ósea, ovulación e implantación.

La prostaglandina E_2 tiene un rol fundamental en la inducción de la degradación del cartílago articular, al inducir la síntesis de metaloproteinasas en los condrocitos y fibroblastos de la membrana sinovial (McIlwraight, 2005; Nagase y Kashiwagi, 2003; Vanegas y Schaible, 2001). PGE_2 actúa sinérgicamente con PGI_2 y otros autacoides, aumentando el flujo sanguíneo local y la permeabilidad vascular. Asimismo, las prostaglandinas producen hiperalgesia (Schaible, 2004) y contribuyen a la respuesta sistémica que caracteriza a la inflamación: la hipertermia (Charlier y Michau, 2003).

1.5.2.- ARTRITIS AGUDA (SINOVITIS)

1.5.2.1.- ETIOPATOGENIA

La artritis es una de las causas más comunes de claudicaciones y disminución de la performance en los equinos de deporte. La artritis representa un fenómeno que engloba varias entidades que pueden ser divididas de acuerdo a su etiología en tres grandes grupos: traumática, del desarrollo e infecciosa. Si la severidad de estas condiciones se incrementa o las terapias utilizadas son incorrectas, puede instaurarse un deterioro progresivo y permanente del cartílago articular acompañado por cambios en el hueso y los tejidos blandos de la articulación conocido como osteoartritis (McIlwraith, 2001).

Todas estas entidades se caracterizan por que desarrollan, en mayor o menor medida, inflamación de la cápsula articular y/o membrana sinovial (McIlwraith 2005 (Kidd y col., 2001).

La membrana sinovial es un tejido metabólicamente muy activo, con componentes celulares que reaccionan marcadamente frente a estímulos externos tanto físicos (golpes, sobre-actividad) como químicos (lipopolisacárido) (Frean y Less, 2000).

El engrosamiento de la membrana sinovial, evaluado clínicamente por cambios en la circunferencia carpiana (Hamm y col., 1984; Theiler, 1994), es uno de los eventos fisiopatológicos más importantes en la sinovitis aguda. Este es reflejo de: a) una hipertrofia/hiperplasia de los componentes celulares de la cápsula articular (Kidd y col., 2001), b) infiltración de monocitos y macrófagos (Frean y Lees, 2000, c)

cambios del patrón circulatorio y d) edematización del subsinovio (Johnston y col., 1997; McIlwraith y Friesbie, 2001). Los cambios metabólicos y estructurales de la membrana sinovial, como consecuencia del proceso inflamatorio, alteran la homeostasis de la tríada membrana sinovial - líquido sinovial - cartílago articular. En los procesos artríticos agudos el aumento del volumen y la modificación de los constituyentes (proteínas, GAGs, etc.) del líquido sinovial, así como la síntesis y liberación de potentes enzimas degradativas de la matriz cartilaginosa (Nagase y Kashiwagi 2003; Fuchs y col., 2004) y de mediadores de la inflamación (citocinas, chemocinas y eicosanoides, etc) (Kidd y col., 2001), son los principales responsables de los cambios estructurales y funcionales de los tejidos articulares (cartílago articular, membrana sinovial, cápsula fibrosa, vasos sanguíneos, nervios y etc.).

Los procesos inflamatorios articulares incluyen cambios en la permeabilidad vascular de la membrana sinovial con modificación del volumen y contenido proteico del líquido sinovial (Kidd y col., 2001; McIlwraith, 2001) y de la población celular (McIlwraith y Friesbe 2001). Por otro lado, la síntesis y liberación de mediadores de la inflamación (PGE_2) (Frean y Lees, 2000) y enzimas degradativas (Agrecanasa/MMPs) (Bigg y Rowan, 2001; Curtis y col., 2004) alteran el metabolismo cartilaginoso, reflejado por aumento y/o modificación de diferentes biomarcadores (epitope 5D4 de keratan sulfato (Kidd y col., ,2001), epitope 486 de condritin sulfato (McIlwraith y Friesbe, 2001) y GAGs (Kidd y col., 2001)) tanto en el líquido sinovial como en el plasma (McIlwraith y Friesbe, 2001).

1.5.3.- ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDES

El primer AINE sintetizado fue la sal sódica del ácido salicílico en el año 1875. Veinte años más tarde un derivado del ácido salicílico, la aspirina, fue introducida en el mercado por Felix Hoffmann (Lees y Landoni, 2004).

Entre los años 1960 y 1980, numerosos agentes antiinflamatorios (ibuprofeno, indometacina, diclofenac, naproxeno) fueron introducidos en el mercado farmacéutico. En la década de 1990, como consecuencia de la identificación de COX-2, un nuevo grupo de fármacos fue introducido, los inhibidores específicos COX-2 o COXIBs (Simmons y col., 2004; Hinz y Brun, 2002). Aunque, su pobre perfil clínico para el tratamiento de la artritis (desencadenamiento de hipertensión tras su administración prolongada e inhibición de los procesos de reparación) condujo al retiro temprano del mercado de diversos miembros del grupo. La permanencia actual de estos compuestos está siendo evaluada.

1.5.3.1.- ESTRUCTURA QUÍMICA

El grupo de los AINEs está compuesto por numerosos fármacos con estructuras químicas diversas, sin embargo es posible dividirlos en dos grandes subgrupos, los derivados carboxílicos y los derivados enólicos.

Dentro del grupo de los derivados carboxílicos se encuentran los salicilatos (aspirina, ácido salicílico y diflunisal), los derivados antranílicos (flunixin meglumine, ácido tolfenámico y ácido meclofenámico), los profenos (carprofeno, ketoprofeno, naproxeno) y las indolinas (indometacina).

En el grupo de los derivados enólicos se encuentran los oxicames (meloxicam, piroxicam y tenoxicam) y las pirazolonas (fenilbutazona, oxifenbutazona y ramifenazona).

Es interesante remarcar que los compuestos del subgrupo profenos poseen en su estructura un carbono asimétrico, por lo que son moléculas quirales. Dado que en este caso la molécula y su imagen en el espejo no pueden ser superpuestas, la relación entre ellas es enantiomérica y los dos estereoisómeros son enantiomeros, denominándoselos S(+) y R(-) (Landoni y Soraci, 2001).

1.5.3.2.- FARMACOCINÉTICA

Todos los AINEs son químicamente ácidos débiles, por lo que en medios ácidos, como el estómago, se encuentran en forma no ionizada. La biodisponibilidad de estos compuestos, tras su administración tanto enteral como parenteral, es alta. (Lees y Giraudel, 2004; Lees y Landoni, 2004). Existen escasos datos sobre su biodisponibilidad tras la administración tópica en equinos.

Como se ha dicho, estos ácidos débiles se encuentran en forma disociada en plasma lo que reduce su capacidad de atravesar membranas. Asimismo y, quizás más importante, es el alto grado de unión a proteínas plasmáticas de los AINEs. En la mayoría de ellos el porcentaje de unión a proteínas, fundamentalmente albúmina, supera el 90%. El alto grado de unión podría, a primera vista, parecer una desventaja sin embargo, no lo es.

Recordemos que estos fármacos se indican para el tratamiento de la inflamación y que un sitio inflamado posee (como consecuencia de la vasodilatación

inducida por los mediadores de la inflamación) aumentada la irrigación sanguínea. Es por esta razón que comienzan a atravesar las membranas endoteliales estructuras de mayor tamaño como las albúminas, las cuales traen asociadas las moléculas de AINEs, funcionando como una administración directa al sitio de acción.

A través de la distribución los AINEs, acceden al hígado, órgano primario para su metabolización. En general, estos fármacos sufren metabolismo de fase I, principalmente oxidación, seguido por reacciones conjugativas de fase II, fundamentalmente con ácido glucurónico y glicina.

En general los metabolitos producidos tras la oxidación son inactivos (con excepción de aspirina y fenilbutazona, que poseen metabolitos activos, el ácido salicílico y la oxifenbutazona, respectivamente). Tras la metabolización, los AINEs se excretan fundamentalmente por filtración renal. De nuevo, debido a que son ácidos débiles, cuando la orina es alcalina la excreción aumenta en forma notoria. Es por esto que la vida media de estos compuestos es más corta en herbívoros comparado con carnívoros.

1.5.3.3.- FARMACODINAMIA

La inhibición irreversible (aspirina) o reversible (otros AINEs) de la enzima COX constituye el principal mecanismo de acción de este grupo de fármacos (Simmons y col., 2004). Adicionalmente, los AINEs tienen otros efectos a nivel molecular, periférica y centralmente, los cuales difieren entre las drogas y pueden contribuir a sus propiedades farmacológicas, toxicológicas y terapéuticas particulares (Lees y Landoni, 2004). La inhibición del factor de trascripción nuclear κB, el cual es un factor crítico para la expresión génica de citocinas durante la

inflamación, (Carr y Goudas, 1999) también ha sido descrita como uno de los mecanismos de acción de algunos AINEs (aspirina, flunixina).

1.5.3.4.- TOXICIDAD

Con respecto a sus efectos secundarios o tóxicos, es importante recordar que las prostaglandinas son compuestos ubicuitarios y la capacidad para su síntesis está ampliamente distribuida. Todas las células, con excepción de los eritrocitos, poseen el sistema enzimático que les permite sintetizar prostaglandinas.

Las prostaglandinas tienen una amplia gama de funciones, tanto fisiológicas como patológicas, y como se ha mencionado previamente, en algunas circunstancias son sintetizadas vía COX-1 y otras vía COX-2. Los efectos tóxicos más estudiados de los AINEs, son aquellos relacionados a la inhibición de COX-1. La irritación gástrica, es consecuencia de la inhibición de la síntesis de las prostaglandinas encargadas de inducir la producción de mucus y de bicarbonato (PGE_2), así como de modular la irrigación de la mucosa gastrointestinal (PGI_2). (Brzozowski y col., 2005; Wallace, 2005). Otro sitio donde la actividad de las prostaglandinas es imprescindible es el riñón, específicamente cuando se ha activado el sistema adrenérgico. En estas circunstancias las prostaglandinas modulan la actividad vasoconstrictora de los mediadores adrenérgicos, impidiendo el desencadenamiento de una insuficiencia renal (Caron, 2000).

La administración prolongada o en dosis altas de AINEs (ya sea solos o en combinación), provoca comúnmente la aparición de eventos adversos tanto en humanos como en equinos. En el caso de los equinos, estos efectos adversos pueden limitar el rendimiento como en el caso de úlceras gástricas (Snow y col.,

1981; Collins y Tyler, 1984) o ser potencialmente mortales como en los casos de colitis dorsal derecha en equinos (Mc Connico y col., 2008).

1.5.3.5.- DICLOFENAC

El diclofenac, un miembro de los derivados arilacéticos, está químicamente compuesto por un grupo ácido fenilacético, un grupo amino secundario y dos posiciones orto ocupados por átomos de cloro (Souza y col., 2004) (Figura E). El diclofenac es un potente inhibidor reversible inespecífico COX-1/COX-2 (Mitchell y col., 1993; Ku y col., 1986) con actividad analgésica, antipirética y antiinflamatoria (Insel, 1991). Es una molécula ácida (pKa 4.18), hidrofílica (coeficiente de partición de 13.4 y logP - 0.96) con un peso molecular de 318.1 (Sallamann, 1986).

Comparte las características farmacocinéticas comunes a todos los AINEs: buena absorción enteral y parenteral, alta unión a proteínas plasmáticas (99%), metabolización hepática y eliminación renal (en menor grado biliar).

Estructura química de diclofenac:

1.5.4.- MODELOS IN VIVO PARA EL ESTUDIO DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO DE FORMULACIONES TOPICAS DE AINEs

1.5.4.1.- ESTUDIOS EN ANIMALES

La penetración de drogas a través de las estructuras de la piel ha sido estudiada utilizando animales vivos. En estos casos la capacidad de penetración de formulaciones o drogas aplicadas localmente, es estimada evaluando las concentraciones alcanzadas en la circulación sistémica u orina (Anderson y col., 2005). Feldman y Maibach (1967) demostraron, utilizando hidrocortisona marcada (^{14}C), que existen diferencias en la penetración de drogas relacionadas al sitio de aplicación. Asimismo, se ha reportado que ciertas drogas podrían quedar secuestradas en las estructuras de la piel (Roberts y Cross, 2004) o concentrarse localmente sin penetrar en la circulación sistémica (Feldmann y Maibach, 1967). Estos factores indicarían que las concentraciones de una droga mensuradas en la circulación sistémica no son reflejo de la penetración absoluta de un fármaco.

Es por esta razón que las concentraciones sistémicas de una droga no son útiles para predecir concentraciones en los tejidos o en el líquido sinovial tras la administración tópica (Radermacher, 1991).

1.5.4.1.1.- MODELO DE EDEMA INTRADÉRMICO INDUCIDO POR CARRAGENINA

El modelo de edema intradérmico ha sido utilizado para evaluar la penetración de fármacos antiinflamatorios a través del estrato corneo de animales vivos. La aplicación de este modelo para la evaluación de la eficacia de AINEs ha sido reportada en ratas (Shin y col., 2000; Larson y Lombardino, 1980; Escribano y col.,

2003) en bovinos (King, 1993; Landoni y col., 1995) y equinos (Marr y col., 1998; Auer y Seawright. 1990; Villarino, 2006; Ferrante y col., 2008). El modelo consiste en la inyección de irritantes débiles (carragenina), los cuales provocan una respuesta edematosa local. La inhibición de la formación de edema por aplicación tópica de fármacos antiinflamatorios puede ser utilizada a efectos de describir la actividad farmacológica de los compuestos y por ende, su penetrabilidad. Este modelo farmacodinámico permite evaluar la actividad farmacológica del principio activo en función del tiempo. Sin embargo, es inadecuado cuando se pretende cuantificar la concentración del principio activo.

1.5.4.1.2.- MODELO DE SINOVITIS INDUCIDA POR LPS

La introducción en el organismo de un antígeno, como un lipopolisacarido bacteriano (Fujihara y col., 2003), genera una serie de eventos en el hospedador en el cual intervienen todos los componentes del sistema inmunológico.

La respuesta inflamatoria en el modelo de artritis endotóxica inducido con LPS puede ser dividida en dos etapas que involucran a los componentes del sistema inmune innato, a) la etapa de reconocimiento del antígeno y b) la etapa de amplificación de la respuesta inflamatoria.

La etapa de reconocimiento del antígeno depende exclusivamente de las células residentes, como macrófagos y fibroblastos, siendo las células dendríticas ubicadas en la membrana sinovial las que desempeñan un rol fundamental. Estas células, consideradas centinelas, poseen un sistema proteico de reconocimiento de antígenos (Toll-Like receptors 4 -CD14, MD2) (Seibl y col., 2003) capaz de reconocer el patrón molecular asociado a patógeno del LPS (PAMP) e inducir la

trascripción de una variedad de genes (vía el factor de trascripción nuclear κB(NκB)) (Janicke, 2003) para la expresión/liberación de importantes mediadores de inmunidad innata, entre ellos moléculas co-estimuladoras (CD80 y CD86 expresados en macrófagos y células dendríticas), citocinas (TNF a, IL-1, IL-6), y chemokinas (IL-8). (Fujihara y col., 2003).

Posteriormente a la interacción inicial de LPS con los receptores celulares, se produce una amplificación de la respuesta inflamatoria que compromete componentes humorales (pro- inflamatorios y antiinflamatorios) y celulares (Tarner y col., 2005) manifestándose localmente con dolor, tumor, calor, rubor y pérdida de la función y sistémicamente con hipertermia.

El presente modelo ha sido validado por nuestro laboratorio y aplicado al estudio de AINEs administrados por vía tópica (Villarino y col., 2006) y por vía endovenosa (Verde y col., 2001).

1.6.- OBJETIVOS

Los objetivos planteados para el presente trabajo de Tesis Doctoral son:

1.6.1.- OBJETIVO GENERAL

- Desarrollar una (o más) formulación/es tópica/s de diclofenac para uso en equinos.

1.6.2.- OBJETIVOS PARTICULARES

- Describir y caracterizar el grado y velocidad de penetración de una crema a base de diclofenac dietilamina al 2% utilizando ácido oleico al 15% como mejorador de la penetración en piel de equinos.
- Describir y caracterizar el grado y velocidad de penetración de una crema a base de diclofenac dietilamina al 2% utilizando ácido oleico al 20% como mejorador de la penetración en piel de equinos.
- Describir y caracterizar el grado y velocidad de penetración de una crema a base de diclofenac dietilamina al 2% utilizando ácido oleico al 15% en combinación con propilenglicol al 20% como mejorador de la penetración en piel de equinos.
- Describir y caracterizar el grado y velocidad de penetración de una crema a base de diclofenac dietilamina al 2% utilizando ácido oleico al 20% en combinación con propilenglicol al 20% como mejorador de la penetración en piel de equinos.
- Describir y caracterizar el grado y velocidad de penetración de una crema a base de diclofenac dietilamina al 2% utilizando urea al 10% como mejorador de la penetración en piel de equinos.
- Describir y caracterizar el grado y velocidad de penetración de una crema a base de diclofenac dietilamina al 2% utilizando urea al 10% en combinación con propilenglicol al 20% como mejorador de la penetración en piel de equinos.

- Describir y caracterizar el grado y velocidad de penetración de una crema a base de diclofenac dietilamina al 2% utilizando D-limoneno al 10% como mejorador de la penetración en piel de equinos.
- Describir y caracterizar el grado y velocidad de penetración de una crema a base de diclofenac dietilamina al 2% utilizando D-limoneno al 20% como mejorador de la penetración en piel de equinos.
- Estudiar y comparar el perfil temporal del efecto antiedematoso de las 8 formulaciones desarrolladas en equinos sanos.
- Estudiar el efecto antiinflamatorio de la formulación con mejor perfil terapéutico desarrollada en equinos con artritis experimental.

2.- MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.- PARTE 1. ESTUDIOS IN VITRO

2.1.1- ELABORACIÓN DE LAS 8 FORMULACIONES

2.1.1.1.- LUGAR DE TRABAJO

Las formulaciones fueron elaboradas en el Laboratorio de la Cátedra de Farmacotécnia I de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP.

2.1.1.2.- DESCRIPCIÓN DE LAS FORMULACIONES

Se elaboraron 9 formulaciones en total teniendo como principio activo Diclofenac Dietilamina:

1.- Formulacion 1 (Control):

Cada 100 g de crema base contiene:

Alcohol Cetílico	3 g
Cera no iónica autoemulsionable	7 g
Vaselina líquida	5 ml
Glicerina	5 ml
Dipolihidroxiestearato de Polietilenglicol (PEG-30) (*)	3 g
Nipagin	0,2 g
Nipasol	0,1 g
Agua destilada (csp)	100 ml

(*). Se lo utiliza solamente cuando se preparan cremas con ácido oleico.

2.- Formulación 2: Cada 100 g de crema base contiene 15 g de ácido oleico como mejorador de la penetración.

3.-Formulación 3: Cada 100 g de crema base contiene 20 g de ácido oleico como mejorador de la penetración

4.-Formulación 4: Cada 100 g de crema base contiene 15 g de ácido oleico más 20 g de propilenglicol como mejoradores de la penetración

5.-Formulación 5: Cada 100 g de crema base contiene 20 g de ácido oleico más 20 g de propilenglicol como mejoradores de la penetración

6.-Formulación 6: Cada 100 g de crema base contiene 10 g de urea como mejorador de la penetración

7.-Formulación 7: Cada 100 g de crema base contiene 10 g de urea más 20 g de propilenglicol como mejoradores de la penetración.

8.-Formulación 8: Cada 100 g de crema base contiene 5 g de D-limoneno como mejorador de la penetración

9.-Formulación 9: Cada 100 g de crema base contiene 10 g de D- limoneno como mejorador de la penetración.

A continuación se presenta en forma gráfica la composición de las formulaciones estudiadas:

FORMULACION	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Diclofenac dietilamina	2 g	2g	2g	2g	2g	2g	2g	2g	2g
Ac oleico	_	15g	20g	15g	20g	_	_	_	_
Propilenglicol	_	_	_	20g	20g	_	20g	_	_
Urea	_	_	_	_	_	10g	10g	_	_
D-limoneno	_	_	_	_	_	_	_	5g	10g
Crema base csp	100g	100g	100g	100g	100g	100g	100g	100g	100g

2.1.1.3. – METODO PARA LA PREPARACIÓN DE LAS FORMULACIONES

Para preparar las diferentes cremas se utilizaron los reactores A, B y C. En A se fundió la cera no iónica autoemulsionable, el alcohol cetílico y vaselina a 60-65°C. En el reactor B, se preparó el diclofenac dietilamina, la glicerina, nipagin y nipasol (todas las formulaciones) y propilenglicol (formulaciones 4, 5 y 7) a 50-55 °C y en un reactor C a baño María el PEG-30. En las formulaciones 2, 3, 4 y 5 también se adicionó el acido oleico a 50-55ºC (obteniendo un líquido viscoso de tinte oscuro).

Posteriormente, la mezcla PEG-30 (con o sin ácido oleico, según correspondía) del reactor C fue incorporada a la solución acuosa del reactor B con el diclofenac dietilamina, aplicándose agitación de 850 rpm durante 3 minutos.

El método utilizado para preparar las cremas fue el indirecto, también conocido como “Método Continental” incorporando la fase acuosa (reactor B) a la oleosa (reactor A) con elevada velocidad de agitación. Este procedimiento permite obtener una crema más homogénea con menor tamaño de partículas (gotícula), y por lo tanto con mejor textura y estabilidad. La mezcla en el reactor A, fue mezclada por 10 minutos más a 850 rpm. Luego se redujo la velocidad de agitación a 500 rpm durante 10 minutos adicionales y a 200 rpm hasta que la emulsión alcanzara la temperatura de 40 ± 2 ºC. A esta temperatura en las formulaciones 8 y 9 se procedió a adicionar el D-limoneno.

Las emulsiones obtenidas, fueron envasadas en potes plásticos por 250 g y dejadas en reposo por 24 horas.

2.1.2.- ESTUDIO DE LA LIBERACION DEL PRINCIPIO ACTIVO DESDE LAS 8 FORMULACIONES DE DICLOFENAC DIETILAMINA

2.1.2.1.- LUGAR DE TRABAJO

Los estudios de liberación fueron realizados en el Laboratorio de la Cátedra de Farmacotécnia I de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP.

2.1.2.2.- DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE DICLOFENAC EN LAS DISTINTAS FORMULACIONES

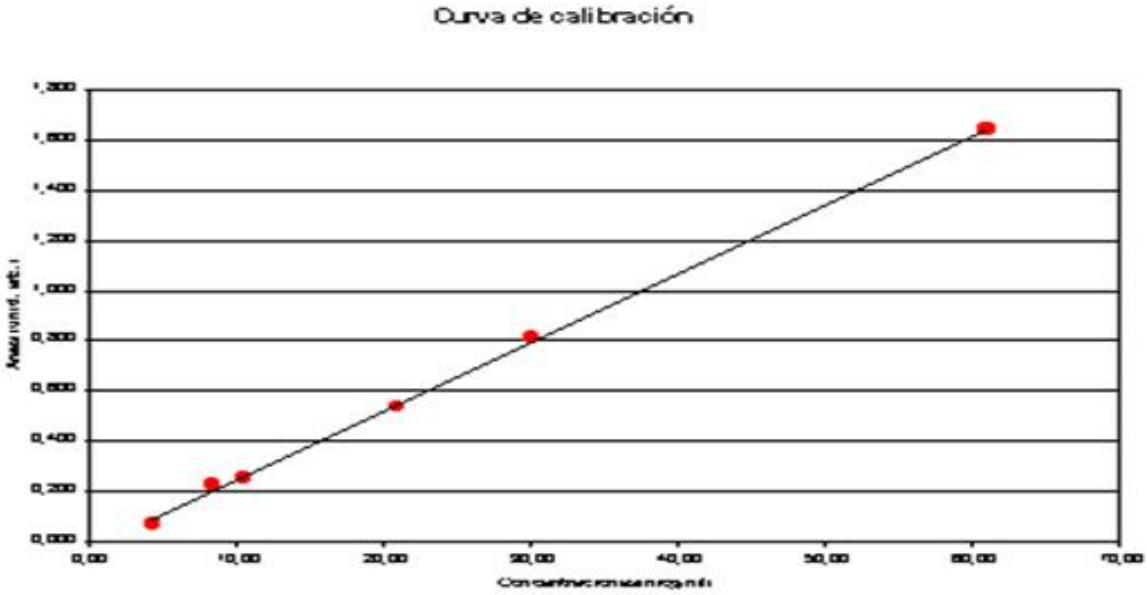
La concentración de diclofenac presente en las muestras extraídas de los ensayos de liberación fueron examinadas por espectrofotometría, utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV-Visible Modelo 260.

Previo a la medición, las muestras fueron filtradas con filtro Millipore de 45 µm. La longitud de onda aplicada fue de 276 ηm (máxima absorción del diclofenac dietilamino).

El método aplicado fue validado en el laboratorio y los parámetros de validación obtenidos son presentados en la siguiente Tabla:

Parámetros	
Intervalo linear (µg . ml^{-1})	4,0 – 70,0
Curva de calibración:	
Intercepción	- 0,025 ± 0.0282
Pendiente (μg^{-1}. ml)	0,0274 ± 0.000953
Coeficiente de correlación	0,9996
Exactitud(%)	102,0 ± 1,2
R.S.D(%)(n=6)	2,6

En la siguiente figura, se presenta la curva de calibración obtenida para 6 concentraciones de estándares de diclofenac dietilamina preparada por duplicado.



2.1.2.3.- ESTUDIOS DE LIBERACIÓN

La evaluación de la velocidad de liberación del principio activo fue realizada aplicando el método de la Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP XXX NF25, 724 drug release, 2006).

Se utilizó un disco de vidrio conteniendo 3 g de la formulación a evaluar, los cuales fueron retenidos en el mismo con una malla de polipropileno (350 µm tamaño de red), adherida con grampas de acero inoxidable. Los discos fueron colocados en un equipo de disolución de paletas, modelo Alycar, de seis vasos (modelo ADS 650) conteniendo 900 ml de buffer fosfato monopotásico (pH 7.2) y termostatizado a 35ºC.

Siguiendo las normativas de la USP, las paletas fueron colocadas a una altura de 2.5 cm respecto a la posición del disco (como muestra la figura), siendo la velocidad de giro aplicada de 50 rpm.

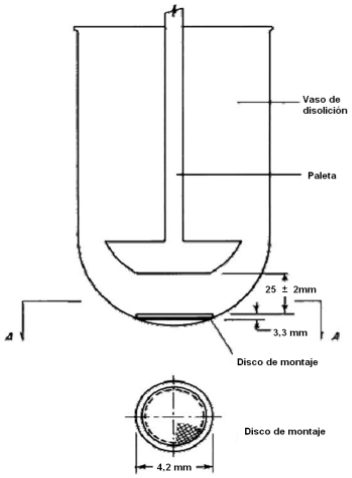


Figura 2.1.2.: Esquema del aparato del modelo de paleta sobre el disco.

Muestras de buffer (3ml) fueron extraídas, con reposición de volumen, a los 15, 30, 60, 90, 120 y 360 minutos.

Todos los ensayos fueron realizados por duplicado.

2.1.2.4.- ANÁLISIS DE LOS DATOS OBTENIDOS

A partir de los resultados obtenidos previa cuantificación del diclofenac dietiamina, a cada una de las 9 formulaciones mencionadas se le efectuaron estudios de la velocidad de liberación realizando las gráficas correspondientes y calculando las cantidades de fármaco liberado por cm2 (Qt), en función del tiempo en horas correspondientes a tres replicados para cada una de las formulaciones.

A efectos de estudiar la cinética de liberación de diclofenac y poder establecer comparaciones entre las formulaciones preparadas se procedió al análisis de las curvas de liberación obtenidas y a la estimación de los parámetros representativos mediante una aproximación de modelos de liberación.

El modelo de Higuchi, es un caso particular del modelo de potencia, que adapta a perfiles de liberación cuya cinética se relaciona a los fenómenos de difusión del principio activo desde la formulación. Este modelo es derivado a partir de la ecuación:

$$Q(t) = M(t)/M\infty = k \cdot t^{n}$$

Donde:

Q(t) concentración liberada a tiempo t

M(t) es la masa acumulativa liberada al tiempo t.

M∞ es la masa acumulada a tiempo infinito.

k: es una constante de liberación.

n: es el exponente de liberación que indica, de acuerdo al valor numérico que toma, el mecanismo de liberación que ocurre. Para el caso de Higuchi, n tiene un valor de 0,5. Si n es igual a 1 se dice que es una curva de orden cero.

2.1.3.- ESTUDIO DE LA PENETRACION DEL PRINCIPIO ACTIVO DESDE LAS 8 FORMULACIONES DE DICLOFENAC DIETILAMINA

2.1.3.1.- LUGAR DE TRABAJO

Los estudios de penetración fueron realizados en el Laboratorio de la Cátedra de Farmacología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP.

2.1.3.2.- PIEL

En el estudio de penetración in vitro se utilizó piel de la región de cervical de equinos sanos, adultos. El material fue obtenido del servicio de necropsia de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata y de frigoríficos de la zona.

2.1.3.3.- CELDAS DE TIPO FRANZ

La penetración percutánea de diclofenac fue estudiada utilizando celdas de difusión estática tipo Franz (Franz, 1978), construidas en el laboratorio. Cada celda de difusión consta de dos piezas de acrílico; una cámara donante y una cámara aceptora.

La cámara donante, posee una ventana circular de 4cm de diámetro y 1cm de profundidad a través de la cual se realizó la aplicación de la formulación, siendo la superficie total de administración de 12.5 cm^2.

La cámara aceptora, posee un diámetro interno de 4 cm y una profundidad de 2 cm lo que determina un volumen total de 24 ml. La misma posee un orificio de

extracción a través del cual fueron tomadas las muestras para su posterior análisis.

Los dispositivos de cierre (4 tuercas, arandelas y tornillos de 7,4 cm. de longitud) se ubican en los extremos de las cámaras.

El diagrama de la celda se presenta a continuación:

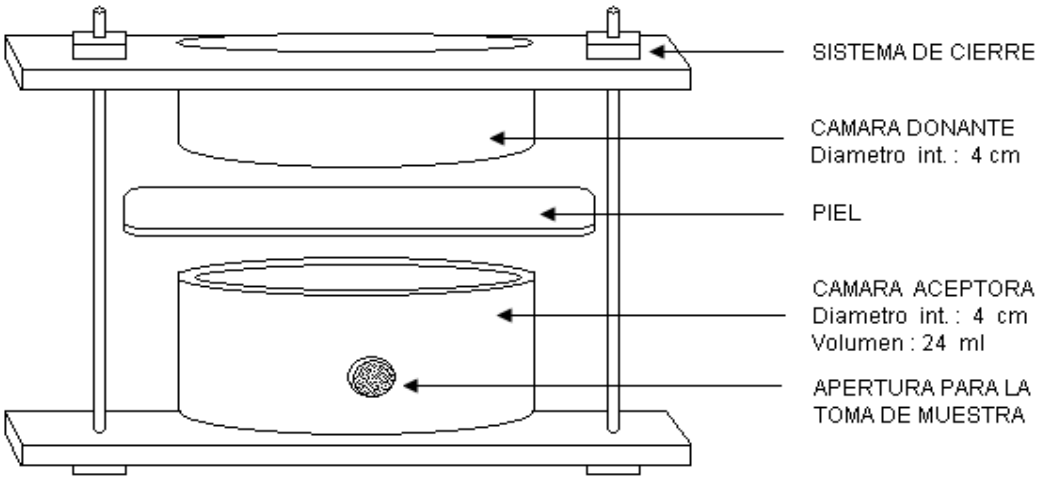


Figura 2.1.3.: Esquema celda de tipo Franz.

2.1.3.4.- PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

2.1.3.4.1.- PREPARACIÓN DE LA PIEL

Piezas de piel (10cm x 10cm) fueron acondicionadas (limpieza, eliminación del tejido celular subcutáneo y rasurado con máquina eléctrica) y congeladas (-20 ºC) hasta su posterior ensayo. La piel fue utilizada dentro de los 15 días posteriores a su obtención.

2.1.3.4.2.- PREPARACIÓN DE LAS CELDAS DE DIFUSIÓN

Las muestras de piel fueron descongeladas a temperatura de laboratorio (25ºC) y montadas entre las dos cámaras (aceptora y donante) de la celda de Franz, con la superficie pilosa (12.5cm^2) hacia la cámara donante. Las cámaras fueron selladas utilizando los dispositivos de cierre; la cámara aceptora fue cargada con 24 ml de buffer fosfato (pH 7.4, 35ºC). Posteriormente, la celda fue llevada a estufa a 37 ºC por un lapso de 30min, a efectos de estabilizar el sistema; transcurrido este tiempo se procedió a la administración de la formulación a ensayar (tiempo cero).

2.1.3.4.3.- APLICACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS

La dosis de diclofenac dietilamina (DFD) administrada fue de 1mg/cm2 (para la superficie total de cada una de las celdas [12,5cm^2] 12.5 mg), correspondiente a 0.625 g de las formulaciones DFD al 2%.

A efectos de asegurar una distribución homogénea, las formulaciones fueron aplicadas a través de frotación suave por un lapso de 30 segundos.

2.1.3.4.4.- TOMA DE MUESTRAS Y ALMACENAMIENTO

Alícuotas de 1 ml fueron extraídas de la cámara aceptora a los siguientes tiempos post-administración: 1, 3, 5, 7, 9, 12 y 23, con reposición del volumen con buffer fosfato libre de fármaco. Las muestras fueron rotuladas y almacenadas a -20ºC hasta su posterior ensayo.

2.1.3.5.- DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE DICLOFENAC DIETILAMINA

Las concentraciones de DFD en las muestras extraídas fueron dosadas por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) (Krisna, 1991). Previamente al análisis cromatográfico las muestras fueron extraídas con un método líquido/líquido. Brevemente, 1 ml de muestra fue acidificada con 1 ml de buffer de McIlvane's (pH 3), y adicionada con 5 ml de éter etílico. La mezcla fue vortexada durante 1 minuto y centrifugada 10 minutos a 6000 rpm. Una alícuota de 4 ml de la fase orgánica fue removida, y evaporada a 45ºC bajo atmósfera de N_2. Posteriormente, el extracto evaporado fue resuspendido en 200 µl de metanol.

El sistema cromatográfico estaba compuesto de una bomba de gradiente isocrático (Digital pump series II Konik Instruments) asociado a un detector de absorbancia UV (Konik 200) y un integrador SP4600 (Thermo Separation Products). Las condiciones cromatográficas aplicadas fueron: columna C_{18} Waters Spherisorb® 5um ODS2 (4.6x250mm); fase móvil: acetonitrilo: agua (59:39) con la adición de ácido acético glacial (2%); longitud de onda UV 280ηm; atenuación: 2 AUFS; volumen de inyección 20 µl y ritmo del flujo: 1ml/min.

2.1.3.6.- ANALISIS DE DATOS

La cinética de penetración de diclofenac fue analizada aplicando un modelo que asume que: (A) la concentración de soluto en el vehículo (cv) aplicado a la piel es constante y (B) la condición sink del receptor permanece constante durante el

estudio (Roberts y col., 1999; Nokhodchi y col., 2006; Kamal y col., 2007; Larrucea, 2001; Takahashi y col., 1995; Takahashi y col., 2002; McDougal 2000).

2.1.3.6.1.- CALCULO DEL FLUJO DE PENETRACIÓN

A partir la porción lineal de la curva concentración acumulativa de diclofenac en la cámara aceptora vs. tiempo se realizó un análisis de regresión lineal simple estimando la recta de regresión y su coeficiente de correlación (r).

Se estableció como limite un $r \geq 0,98$.

$$y = a\,x + b$$

Donde **y** expresa la cantidad de diclofenac (µg/cm2), ***a*** es la pendiente, x expresa el tiempo (h) y ***b*** es la ordenada al origen.

El flujo en estado estacionario (Js) fue determinado partir de la pendiente de la recta expresando la cantidad de droga (µg/cm2) que penetra la piel por unidad de tiempo (h) (Nokhodchi y col., 2006; Kamal y col., 2007; Larrucea, 2001; Takahashi y col., 1995; Takahashi y col., 2002; McDougal 2000).

2.1.3.6.2.- CALCULO DE TIEMPO LAG

El tiempo lag (h) fue determinado como el valor correspondiente a la intersección de la recta de regresión (estimada para el cálculo del flujo de penetración) con el eje de las abscisas (Nokhodchi y col., 2006; Larrucea, 2001; Takahashi y col., 1995; Takahashi y col., 2002).

$$\text{Tiempo lag} = 0 + b / a$$

2.1.3.6.3.- CALCULO DEL COEFICIENTE DE PENETRABILIDAD (Kp)

El coeficiente de penetrabilidad fue calculado a través de la siguiente ecuación (Nokhodchi y col., 2006; Kamal y col., 2007; Larrucea, 2001; Takahashi y col., 2002; McDougal 2000).

$$Kp = Js\ (\mu g/cm^2/h) / \text{dosis aplicada } (\mu g).$$

2.1.3.6.4.- CALCULO DE LA TASA DE AUMENTO DE LA PENETRACIÓN (ER)

La tasa de incremento de la penetración fue calculada en base a la siguiente ecuación (Nokhodchi y col., 2006; Larrucea, 2001; Takahashi y col., 2002):

$$ER = Kp \text{ con aumentador} / Kp \text{ sin aumentador}$$

2.1.3.6.5.- CALCULO DEL PORCENTAGE DE AUMENTO DE LA PENETRACIÓN (ER%)

El porcentaje de aumento de la penetración fue calculado en base a la siguiente ecuación:

$$ER\% = (Js \text{ con aumentador} / Js \text{ sin aumentador}) \times 100$$

2.1.3.7.- ANALISIS ESTADISTICO

El análisis estadístico fue realizado mediante el test de Kruskal-Wallis seguido por el test de Dunns. El nivel de significancia establecido fue del 5%

2.2.- PARTE 2. ESTUDIOS IN VIVO

2.2.1.- ESTUDIO DEL EFECTO ANTIEDEMATOSO DE LAS 8 FORMULACIONES DE DICLOFENAC DIETILAMINA

2.2.1.1.- LUGAR DE TRABAJO

Los estudios del efecto antiedematoso se realizaron en el Establecimiento Las Bandurrias ubicado en General Belgrano Provincia de Buenos Aires.

2.2.1.2.- ANIMALES

Se utilizaron 6 equinos mestizos clínicamente sanos (4 machos y 2 hembras) con edades entre 4 y 9 años y un peso promedio de 400 ± 30kg.

2.2.1.3.- DISEÑO EXPERIMENTAL

Estudios piloto demostraron diferencias significativas en el efecto antiedematoso de diclofenac entre los equinos utilizados, lo que motivó la inclusión del factor equino en el estudio como criterio de bloque.

El estudio se realizó aplicando un diseño de cuadrado latino de 2 factores (factor tratamiento y factor equino).

Se consideró a cada equino como una unidad experimental en la cual se determinó el efecto antiedematoso para cada una de las formulaciones ensayadas.

El estudio se dividió en tres etapas; en cada etapa se estudiaron cuatros formulaciones (tres formulaciones problema y la control) por duplicado en cada

equino. El tiempo trascurrido entre las etapas fue de 15 días. A continuación se presenta un esquema de las formulaciones estudiadas en cada etapa.

Formulaciones estudiadas en cada equino según la etapa.									
Nº de Equino	Primera etapa			Segunda etapa			Tercera etapa		
Equino 1	1	2	7	4	5	6	7	8	9
Equino 2	8	9	1	2	3	4	5	6	7
Equino 3	6	7	8	9	1	2	3	4	5
Equino 4	9	5	6	7	8	9	1	2	3
Equino 5	2	3	4	5	3	1	8	9	1
Equino 6	3	4	5	6	7	8	6	4	2

2.2.1.4.- MODELO EXPERIMENTAL

Dos días previo al comienzo del estudio una superficie de aproximadamente 20 x 30cm a ambos lados del cuello de cada equino fue rasurada. En la misma 4 áreas de 12,5cm^2, distribuidas de manera equidistante, fueron delimitadas por medio de un marcador para piel.

El tratamiento a aplicar sobre cada una de las 8 áreas fue asignado de forma aleatoria; de esta manera en cada equino fue posible evaluar por duplicado las cuatro formulaciones correspondientes a la etapa.

La lesión edematosa fue inducida mediante la inyección intradérmica de una solución de carragenina sódica 0,25% (ICN BIOMEDICALS INC: 1263 South Chillicothe Road Aurora, Ohio 44202) en agua estéril apirógena. La solución fue preparada el día previo al comienzo de cada etapa y conservada a 4 ºC hasta el momento de su inyección.

Aproximadamente 20 minutos antes del inicio del estudio la solución de carragenina fue vortexeada por 5 min y alícuotas de 0,1ml cargadas en jeringas de 1ml provistas de agujas 27G. Los sitios de inyección fueron lavados con una solución acuosa de clorhexidina al 0.05%.

A tiempo 0, la solución de carragenina fue inyectada intradérmicamente en cada sitio. Una vez finalizadas las inyecciones se aplicó sobre cada una de ellas 0.625 g (equivalente a 1mg/cm^2) de la formulación asignada mediante la frotación suave durante 30 segundos.

El volumen del edema inducido fue mensurado a las 2, 4, 6 y 8 horas post administración.

2.2.1.5.- PARÁMETROS DE EFICACIA ANTIEDEMATOSA

Considerando que la lesión edematosa se asemeja a un cuerpo de forma semi-eliptica su volumen fue estimado mediante la siguiente fórmula:

$$V\ (ml) = 4/3 \times \pi \times (d_1 / 2) \times (d_2 / 2) \times ((e_3 / 2 - e_{basal} / 2)$$

Donde V es el volumen de lesión, π es la constante matemática cuyo valor es 3,1416, d_1 es el diámetro mayor, d_2 es el diámetro menor, e_3 es el espesor de la

lesión y e_{basal} es el espesor del sitio de inyección previo a la inyección de carragenina.

Los valores de d_1, d_2, e_3 y e_{basal} fueron mesurados mediante un calibre de precisión.

El porcentaje de inhibición de la formación de edema fue calculado en función de los datos del sitio placebo mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - (100 * V_t / V_p)$$

Donde V_t corresponde al volumen de lesión del área tratada y V_p al volumen de lesión del área control.

El área bajo la curva % de inhibición de la formación de edema en función del tiempo fue calculada a través de la siguiente ecuación:

$$AUC = 0.5 \sum_{i=0}^{n-1} (t^{i+1} - t^i)(y^i + y^{i+1})$$

Donde “t” es el tiempo de obtención de la muestra e "y" es el % de inhibición estimado.

2.2.1.6.- ANALISIS ESTADISTICO

Para el análisis descriptivo de los datos fueron calculados los promedios, desvíos estándar y coeficientes de variación.

La comparación estadística del efecto antiedematoso de las diferentes formulaciones fue realizada aplicando análisis de varianza de dos factores

(formulación y equino), tomando como parámetros de comparación, las áreas bajo la curva ($AUC_{0\text{-}8\ h}$) % de inhibición de la formación de edema en función del tiempo. El nivel de significancia establecido fue del 5%

2.2.2.- ESTUDIO DEL EFECTO CLINICO ANTINFLAMATORIO DE LA FORMULACION DE DICLOFENAC DIETILAMINA CON MEJOR PERFIL *IN VIVO* e *IN VITRO*

2.2.2.1.- LUGAR DE TRABAJO

Los estudios del efecto clínico antiiflamatorio se realizaron en las instalaciones del a Sociedad Rural de General Paz, Provincia de Buenos Aires.

2.2.2.2.- ANIMALES

Para este estudio fueron utilizados cuatro equinos, de raza mestiza de entre 3 y 4 años de edad con un peso promedio de 300 ± 20 Kg.

Los animales experimentales fueron estabulados individualmente desde el mes previo al comienzo del estudio. Diariamente (exceptuando los días de trabajo experimental) a las 8.00 AM los animales eran llevados a un piquete de 700 m² hasta las 8.00 PM momento en el cual eran conducidos a sus establos.

Todos los animales tuvieron acceso libre a agua potable y fueron alimentados con 3 raciones diarias compuestas por avena y forraje de excelente calidad.

2.2.2.3.- CRITERIOS DE INCLUSIÓN DE LOS ANIMALES

Los equinos utilizados en el presente estudio fueron incorporados en base a los siguientes criterios de inclusión.

- Edad superior a 2 años
- Correcto estado nutricional
- Hembras no gestantes
- No haber sufrido ningún procedimiento quirúrgico articular previo.
- No padecer o haber padecido enfermedades sistémicas de origen inmune
- No estar recibiendo medicación de ninguna clase
- No presentar problemas artríticos.

2.2.2.4.- DISEÑO EXPERIMENTAL

Se aplicó un diseño de cuadrado latino de dos fases (Tabla 1) de manera tal, que cada animal experimental recibiera tratamiento placebo, y tratamiento con la formulación que demostró las mejores características de acuerdo a los estudios anteriores (FORMULACION 2: diclofenac dietilamina al 2%, como principio activo, y ácido oleico al 15% como mejorador de la penetración).

Entre cada fase del estudio se dejo transcurrir un periodo de 2 semanas a efectos de asegurar la eliminación de concentraciones efectivas de fármaco.

Todos los parámetros clínicos fueron determinados a 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 72, 96 y 120 h.

Diseño cuadrado latino de dos fases:

FASE 1		FASE 2	
Individuo	**Tratamiento**	**Individuo**	**Tratamiento**
A	PL	**A**	DFD
B	DFD	**B**	PL
C	PL	**C**	DFD
D	DFD	**D**	PL

DFD: Diclofenac dietilamina (formulación 2); PL: Placebo

2.2.2.5.- MODELO EXPERIMENTAL

La superficie de administración fue delimitada de acuerdo a los límites topográficos de la articulación del carpo:

Límite proximal: las apófisis estiloides del radio.

Límite distal: una línea que une las cabezas de los metacarpianos.

La superficie total del área delimitada fue estimada considerando a la misma como un cilindro (circunferencia x altura). La superficie total de aplicación de las formulaciones fue calculada en 450 cm^2 (circunferencia =30 y altura 15 cm).

El día previo al inicio de cada fase experimental la superficie dorsal de la articulación carpiana de ambos miembros de todos los animales experimentales fue rasurada y lavada con agua y jabón.

A tiempo 0 se inyectó intraarticularmente 1ml de PBS conteniendo 1µg de LPS (Escherichia coli O55:B5 (Sigma Chemical Co, St Louis USA). Transcurridas 48 h se inyectó una segunda dosis de 0,1 µg de LPS contenido en 0,1ml de PBS (Palmer y Bertone, 1994).

La administración de los tratamientos de inició inmediatamente después de la 1ra inyección de LPS.

En las fases 1 la artritis se indujo en el carpo izquierdo, mientras que en la fase 2 se utilizó la articulación del miembro opuesto.

2.2.2.6.- APLICACIÓN DE TRATAMIENTOS

Los animales experimentales fueron divididos en 2 grupos. El grupo tratado recibió epicutaneamente 20 gramos totales de la formulación A cada 6 h (equivalente a 1.04 mg/cm2/6h) por un período de 5 días. El grupo control recibió, por la misma vía, 20 g totales de la formulación placebo con el mismo esquema de dosificación.

La homogénea distribución de las formulaciones fue asegurada a través de un masaje suave de 2 minutos de duración. Previamente a la segunda administración así como, en las administraciones subsiguientes, el sitio de administración fue higienizado varias veces con una solución acuosa de clorhexidina 0,05%.

2.2.2.7.- EVALUACION CLINICA DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO

El efecto antiinflamatorio de las formulaciones ensayadas fue evaluado a través de los siguientes parámetros clínicos: Largo de paso; ángulo carpiano en estación y en flexión máxima y circunferencia carpiana.

Mediciones de control fueron efectuadas en los días previos a la administración así como, el mismo día antes de la administración de los tratamientos (-60 a -30min), a efectos de construir una línea basal de los diferentes parámetros clínicos evaluados.

2.2.2.7.1.- LARGO DE PASO

El largo de paso fue determinado haciendo caminar al caballo sobre un papel extendido en una superficie dura y midiendo la distancia entre las pisadas del miembro afectado. Diez pasos consecutivos fueron medidos con una cinta métrica flexible. El primero y el último fueron descartados, tomándose el promedio de los ocho restantes. El valor basal del largo de paso fue el promedio de 10 determinaciones realizadas 2 veces al día durante los 5 días previos al comienzo del estudio.

2.2.2.7.2.- ÁNGULO EN ESTACIÓN Y FLEXIÓN MÁXIMA

Estas mediciones fueron tomadas utilizando un goniómetro. Primero fue medido (en grados) el ángulo en reposo del miembro inflamado. Posteriormente, el miembro fue flexionado progresivamente hasta la aparición de una reacción de dolor momento en que se registró el valor en grados correspondiente a la flexión máxima.

2.2.2.7.3.- CIRCUNFERENCIA CARPIANA

La circunferencia carpiana fue medida en el punto medio de la articulación, usando una cinta métrica flexible con el miembro extendido (en posición normal erguida). Esta maniobra permite medir la circunferencia en milimetros.

2.2.2.7.4.- TEMPERATURA CORPORAL

La temperatura corporal fue determinada utilizando termómetro clínico digital (Citizen ^{TM} CT-513W) colocado en el ano hasta la determinación automática. El registro de este parámetro fue realizado en grados centígrados.

2.2.2.8.- ANÁLISIS ESTADISTICO

Los datos fueron analizados mediante análisis descriptivo calculándose las medias de tendencia central (promedio) y de dispersión (desvio estándar) de los parámetros mensurados.

Posteriormente se realizó un análisis inferativo aplicando análisis de varianza de dos vías tomando como fuente de variación el tratamiento y el individuo. Como parámetros de comparación se utilizaron las áreas bajo la curva porcentaje de cambio desde basal de cada individuo (100% corresponde al valor basal) en función del tiempo. El nivel de significancia fue establecido en 5%

Las áreas bajo la curva fueron calculadas aplicando la siguiente ecuación:

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

Donde t es tiempo de obtención de la muestra e "y" es la medición observada.

3.- RESULTADOS

3.1.-PARTE 1. ESTUDIOS IN VITRO

3.1.1.- ESTUDIO DE LA LIBERACION DEL PRINCIPIO ACTIVO DESDE LAS 8 FORMULACIONES DE DICLOFENAC DIETILAMINA

Los porcentajes de liberación de diclofenac desde las formulaciones estudiadas en los diferentes tiempos muestréales se presentan en la Tabla 3.1.1. Cuando la cantidad de diclofenac liberada fue graficada en función de la raíz cuadrada del tiempo según la cinética de liberación de Higuchi (Ver figura 3.1.1) se obtuvo una relación lineal en todas las formulaciones ensayadas, no observándose diferencias significativas entre las formulaciones cuando las pendientes fueron comparadas estadísticamente.

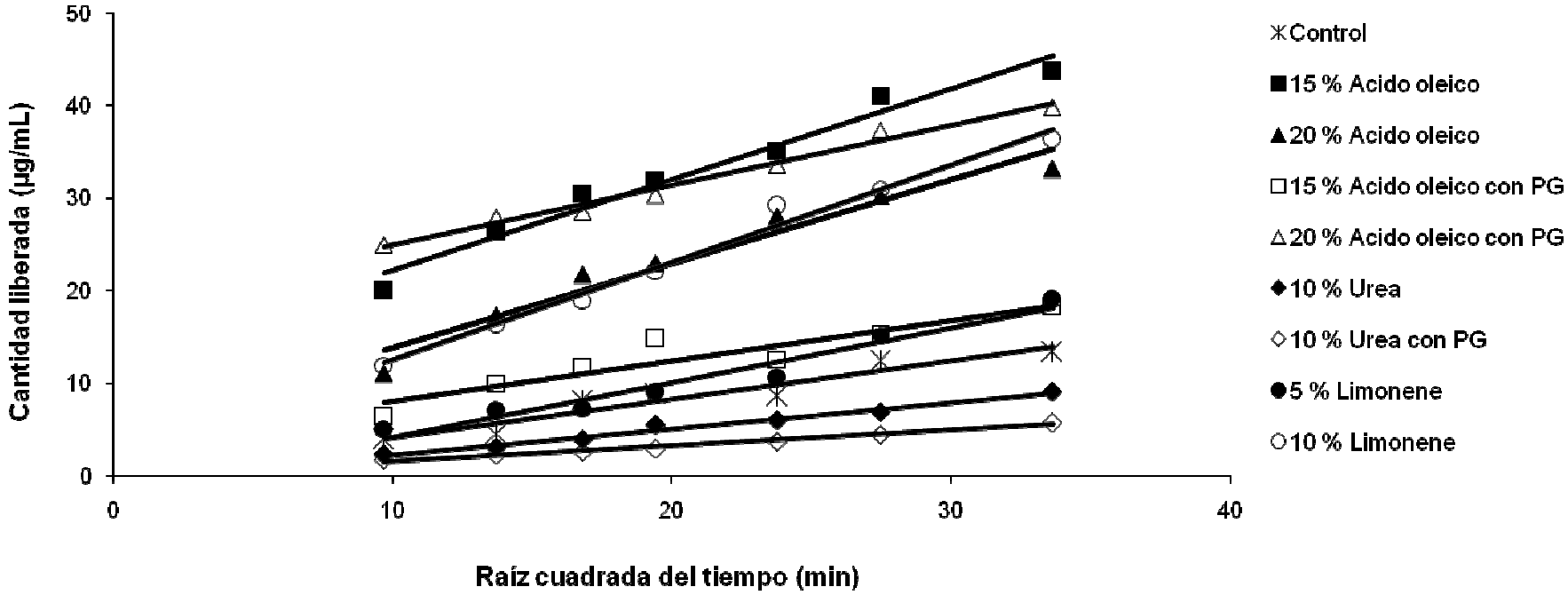


Figura 3.1.1: Cantidad de diclofenac liberado en función de la raíz cuadrada del tiempo (n=2).

Tabla 3.1.1: Porcentaje de diclofenac dietilamina liberado a cada tiempo muestral (min) correspondiente a cada ensayo de liberación in vitro (Media ± DS, n=2).

	30	60	90	120	180	240	360
Formulación 1	6,50 ± 3,51	7,63 ± 3,86	13,48 ± 9,09	14,68 ± 5,72	14,34 ± 5,53	20,64 ± 10,09	22,29 ± 11,21
Formulación 2	31,23 ± 16,91	49,09 ± 1,59	50,87 ± 1,37	53,00 ± 1,48	58,68 ± 3,39	68,51 ± 5,77	72,84 ± 5,63
Formulación 3	18,39 ± 3,87	28,80 ± 13,34	36,27 ± 16,36	38,37 ± 14,87	46,64 ± 5,00	50,48 ± 1,72	55,30 ± 2,29
Formulación 4	10,62 ± 6,66	16,70 ± 6,55	19,75 ± 6,20	24,74 ± 5,95	20,98 ± 1,70	25,35 ± 2,88	30,62 ± 0,07
Formulación 5	41,67 ± 7,99	46,43 ± 4,95	47,56 ± 4,63	50,57 ±6,38	55,94 ± 13,42	62,34 ± 8,32	66,46 ± 4,75
Formulación 6	3,89 ± 0,84	5,09 ± 1,17	6,61 ± 0,34	9,19 ± 0,97	9,96 ± 0,66	11,58 ± 0,12	15,17 ± 5,20
Formulación 7	2,98 ± 1,07	3,91 ± 0,26	4,40 ± 0,61	4,96 ± 0,51	6,26 ± 0,33	7,47 ± 0,69	9,67 ± 2,24
Formulación 8	8,47 ±6,40	11,65 ±3,49	12,12 ±3,11	15,25 ±3,19	17,57 ±3,44	25,27 ±7,34	31,75 ±13,11
Formulación 9	19,95 ±17,94	27,26 ±9,69	31,61 ±9,20	36,91 ±4,79	48,76 ±11,25	51,67 ±13,12	60,54 ±5,74

3.1.2.- ESTUDIO DE LA PENETRACION DEL PRINCIPIO ACTIVO DESDE LAS 8 FORMULACIONES DE DICLOFENAC DIETILAMINA

Concentraciones de diclofenac, superiores al límite de detección, fueron detectadas en la cámara aceptora de todas las celdas difusión tras la aplicación de todas las formulaciones ensayadas.

La formulación control fue, de las formulaciones estudiadas, la de menor flujo de penetración en estado estacionario (2,653 ± 1,576 μg/cm^2/h). El mayor flujo de penetración fue observado tras la aplicación de urea 10% (5,419 ± 2,902 μg/cm^2/h) seguido por ácido oleico 15% (5,003 ± 1,475 μg/cm^2/h) ($p<0.05$).

Las formulaciones conteniendo ácido oleico presentaron, comparadas con la formulación control, un aumento del flujo de penetración en estado estacionario mayor al 50%; la formulación ác. Oleíco al 15% fue la que presentó el mayor grado de aumento (>90%). Esta observación es interesante ya que indicaría que el efecto aumentador de la penetración del ácido oleico llega a un máximo, a partir del cual el aumento de su concentración no se refleja en un aumento en la penetración de diclofenac (Ver Tabla 3.1.2).

La incorporación de PG en las formulaciones conteniendo ácido oleico como aumentador de la penetración produjo un efecto antagónico. Aun cuando, en la formulación conteniendo bajas concentraciones de ácido oleico se observó un leve aumento del flujo de penetración en estado estacionario, este no fue significativo. En

la formulación conteniendo 20% de ácido oleico fue observada una significativa disminución del flujo de penetración en estado estacionario.

La formulación conteniendo urea 10% duplicó el flujo de penetración en estado estacionario estimado para la formulación control (5,419 ± 2,902 vs 2,653 ± 1,576 μg/cm^2/h respectivamente). La incorporación a esta formulación de PG al 10%, de manera similar a lo observado para el ácido oleico, disminuyó de manera significativa ($p>0.05$) el flujo de penetración en estado estacionario (5,419 ± 2,902 y 3,831 ± 3,399, respectivamente).

De manera similar a lo observado para el ácido oleico, la actividad aumentadora de la penetración de limonene no fue concentración dependiente; observándose un mayor flujo de penetración en estado estacionario para la formulación conteniendo 5% comparada con la que contenía 10% (4,581 ± 4,032 y 3,871 ± 1,659 μg/cm^2/h) respectivamente).

Todas las formulaciones ensayadas mostraron, comparado con la formulación control, un leve aumento del T Lag. Este aumento fue bastante uniforme para todas las replicaciones (Ver CV en Tabla 3.1.2) excepto para las formulaciones conteniendo limonene 5% y urea 10% para las cuales el CV calculado fue mayor.

Las formulaciones conteniendo 20% de ácido oleico, independientemente de la presencia de PG, mostraron un mayor T Lag comparadas que las formulaciones conteniendo 15% de ácido oleico.

En el caso de las formulaciones conteniendo urea, la presencia de PG provocó una leve y estadísticamente no significativa reducción del T Lag.

Las formulaciones conteniendo limonene como aumentador de la penetración mostraron T Lags similares, aunque la variabilidad entre la replicaciones fue mayor para limonene al 5%.

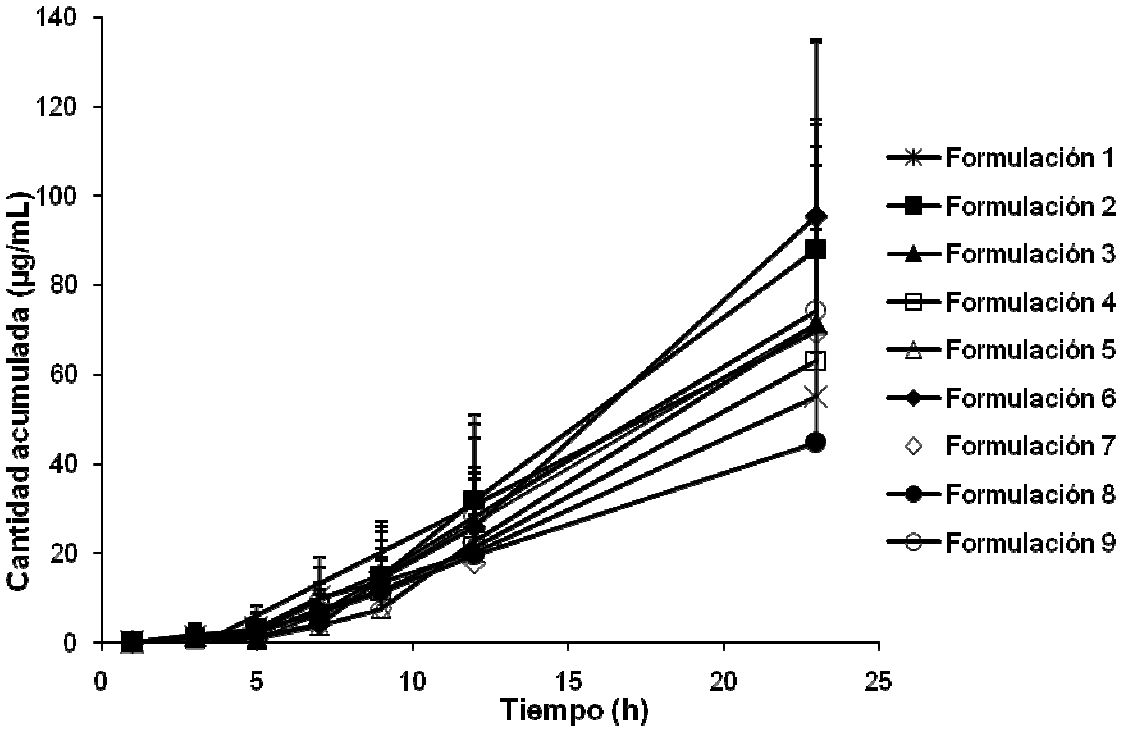


Figura 3.1.2: Cantidad acumulada de diclofenac en la cámara aceptora tras la aplicación de 1mg/cm^2 sobre piel equina (Media ± DS; n=6).

Tabla 3.1.2: Flujo de penetración in vitro y tiempo lag a través de piel equina tras la aplicación de 1mg/cm^2 de diclofenac dietilamina (Media ± DS; n=6).

	Flujo de penetración en estado estacionario (µg/cm^{2}h)		T lag (h)	
	Media ± DS	CV (%)	Media ± DS	CV (%)
Formulación 1	2,653 ± 1,576	59	4,77 ± 2,05	48
Formulación 2	5,003 ± 1,475*	29	5,25 ± 1,47	28
Formulación 3	4,161 ± 1,823	60	6,36 ± 2,29	29
Formulación 4	4,160 ± 2,482	44	5,32 ± 1,55	36
Formulación 5	4,578 ± 2,095	36	6,69±1,00	15
Formulación 6	5,419 ± 2,902	52	6,13 ± 2,05	33
Formulación 7	3,831 ± 3,399	89	5,39 ± 2,46	46
Formulación 8	4,581 ± 4,032	88	5,73 ± 3,14	55
Formulación 9	3,871 ± 1,659	43	5,48 ± 1,25	23

* Diferencia significativa comparada con formulacion 1, $p<0.05$ (Test de Kruskall Wallis seguido por test de Dunns).

3.2.- PARTE 2. ESTUDIOS IN VIVO

3.2.1.- ESTUDIO DEL EFECTO ANTIEDEMATOSO DE LAS 8 FORMULACIONES DE DICLOFENAC DIETILAMINA

El efecto antiedematoso fue evaluado mediante el modelo de edema inducido por la inyección intradérmica de 0.1ml de carragenina (0.25%). El análisis del volumen de las lesiones edematosas de todos los animales experimentales (tanto las lesiones tratadas como controles) refleja la variabilidad inter-sujeto de la respuesta inflamatoria. Sin embargo, las variaciones en el volumen de las lesiones edematosas tratadas (reflejado en los desvíos estándares) fue considerablemente superior a la observada en las lesiones control, siendo esto observado con todas las formulaciones estudiadas. Estas observaciones indican que, si bien la respuesta inflamatoria a la inyección intradérmica de carragenina posee variabilidad inter-sujeto, la fuente mayor de variabilidad se origina en la respuesta individual al tratamiento.

La inyección intradérmica de carragenina indujo una reacción edematosa en todos los sitios experimentales.

La reacción edematosa en los sitio placebo fue observada a partir de la primer muestra (1h) con un volumen de 100 ± 45 µl;. El volumen de lesión se incrementó marcadamente hasta la hora 5 (525 ± 241 µl), decreciendo posteriormente. El $AUC_{(0\text{-}8h)}$ fue 2120 ± 1101 µl/h.

La variabilidad de la reacción antiedematosa, calculada inter-día presento un CV de entre 41-53% mientras que la variabilidad inter-animal un CV de 34 % (Ver

tabla 3.3). Aún cuando los valores son altos, lo que indica las diferencias en la reacción inflamatoria, la aplicación de un diseño de cross-over (en el cual el sujeto experimental es su propio control) reduce su influencia en el análisis estadístico de la respuesta temporal.

La aplicación de la formulación control indujo una inhibición del edema en cuatro de los seis animales a partir de las 2 horas post tratamiento; de los restantes dos animales, uno presentó inhibición del edema a partir de las 4h y el otro no presentó inhibición del edema durante todo el periodo evaluado.

El mayor porcentaje de inhibición del edema (46 ± 42 %) fue observado a las 4 h posteriores al tratamiento. Al finalizar el estudio (8h), el porcentaje de inhibición estimado fue del 39 ± 29 %.

La aplicación de la formulación conteniendo ácido oleico al 15% indujo una inhibición del edema en todos los animales a partir de las 2 horas post tratamiento (34 ± 19 %). En los siguientes tiempos muestrales este valor fue en aumento con un pico de inhibición (62 ± 20 %) al finalizar el ensayo (8h).

La incorporación de PG a la formulación indujo una clara reducción en la inhibición del efecto antiedematoso. Esta observación era predecible considerando la disminución en la penetración de diclofenac cuando PG era incorporado a la formulación conteniendo ácido oleico (Ver Figura 3.3)

La aplicación de la formulación conteniendo acido oleico 15% + PG, provocó la inhibición del edema en cinco de los seis animales a partir de las 2 horas post-tratamiento. El animal restante presentó inhibición del edema a partir de las 6h. El pico de inhibición del edema, 45 ± 47 %, fue observado a las 2 h post-tratamiento.

Posteriormente, el porcentaje de inhibición fue decayendo, hasta un valor de 29 ± 13 % a las 8 horas.

La aplicación de la formulación conteniendo acido oleico al 20% provocó la inhibición del edema en todos los animales a partir las 2 horas post tratamiento. El mayor valor de inhibición del edema fue de 69 ± 21 % a las 4 h post-tratamiento. A partir de este tiempo la inhibición fue decayendo con un mínimo de 32 ± 21 % a las 8 horas.

La incorporación de PG a la formulación de ácido oleico al 20% provocó una disminución del efecto antiedematoso, aunque menos marcada que la reportada para acido oleico al 15%.

Tras la aplicación de esta formulación la inhibición del edema en cinco de los seis animales se hizo evidente a partir de las 2 horas post-tratamiento. El animal restante presentó inhibición del edema a partir de las 4 h. El mayor valor de inhibición del edema (64 ± 16 %) se presentó a las 4 h post-tratamiento. A partir de este tiempo la inhibición fue decayendo con un mínimo de 37 ± 24 % a las 8 horas.

La aplicación de la formulación conteniendo urea al 10% provocó, a partir de las 2 h post-tratamiento la inhibición del edema en cinco de los seis animales experimentales. En el animal restante ésta fue evidente a partir de las 4 h post-tratamiento. El mayor valor de inhibición del edema (55 ± 34 %) fue observado a las 6 h post-tratamiento. Al finalizar el estudio (8h), se observó una de inhibición del edema de 43 ± 42 %.

El perfil temporal del volumen de lesión de los sitios tratados con Urea 10% + PG, fue similar al observado en los sitios control.

La incorporación de PG a la formulación de urea al 10% provocó, a partir de las 2 h post-tratamiento, la inhibición del edema en cinco de los seis animales experimentales. El animal restante presentó inhibición del edema a partir de las 6 h. El mayor valor de inhibición del edema (43 ± 25 %) fue observado fue a las 6 h post-tratamiento. Al finalizar el estudio (8h), el porcentaje de inhibición del edema fue 38 ± 23.

La aplicación de la formulación conteniendo limonene al 5% de provocó, a partir de las 2 horas post-tratamiento la inhibición del edema en tres de los seis animales. Los animales restantes presentaron inhibición del edema solo al finalizar el estudio (8 h). El mayor valor de inhibición del edema observado fue del 27 ± 41 % a las 2 h posteriores al tratamiento, manteniéndose una inhibición similar (21 ± 14 %) hasta finalizar el estudio (8h),

La aplicación de la formulación conteniendo limonene al 10%, fue claramente más efectiva que la anterior, provocando la inhibición del edema en cuatro de los seis animales a partir de las 2 horas post-tratamiento. De los restantes dos animales, uno presento inhibición del edema a partir de las 4h y el otro a las 6 h.

El mayor valor de inhibición del edema fue de 51 ± 44 % a las 4 h post-tratamiento, manteniendo un nivel similar (46 ± 11 %) al finalizar el estudio (8h).

Tabla 3.2.1.1.: Variación del volumen de lesión edematosa en los sitios controles (2 replicados)

ANIMAL	DÍA	INTRA-DIA		INTER-DIA		INTER-ANIMAL	
		MEDIA ± DS	CV (%)	MEDIA ± DS	CV (%)	MEDIA ± DS	CV (%)
Equino 1	Día 1	423 ± 22	5	2.243 ± 1.017	45	2.014 ± 675	34
	Día 2	2.573 -	-				
	Día 3	3.615 ± 586	16				
	Día 4	2.804 ± 68	2				
Equino 2	Día 1	787 ± 37	5	1.746 ± 722	41		
	Día 2	1.703 -	-				
	Día 3	1.984 ± 949	48				
	Día 4	2.510 ± 570	23				
Equino 3	Día 1	737 ± 143	19	1.451 ± 707	49		
	Día 2	1.700 ± 108	6				
	Día 3	733 ± 199	27				
Equino 4	Día 1	1.916 ± 945	49	3.280 ± 1.750	53		
	Día 2	3.822 ± 1.610	42				
	Día 3	5.456 ± 1.305	24				
	Día 4	5.634 ± 726	13				
Equino 5	Día 1	1.517 ± 2	0	1.750 ± 786	45		
	Día 2	3.151 ± 1.390	44				
	Día 3	1.732 ± 1.089	63				
	Día 4	2.125 ± 498	23				
Equino 6	Día 1	3.304 ± 2.517	76	1.611 ± 792	49		
	Día 2	1.546 ± 1.219	79				
	Día 3	1.132 ± 169	15				
	Día 4	1.589 ± 169	11				

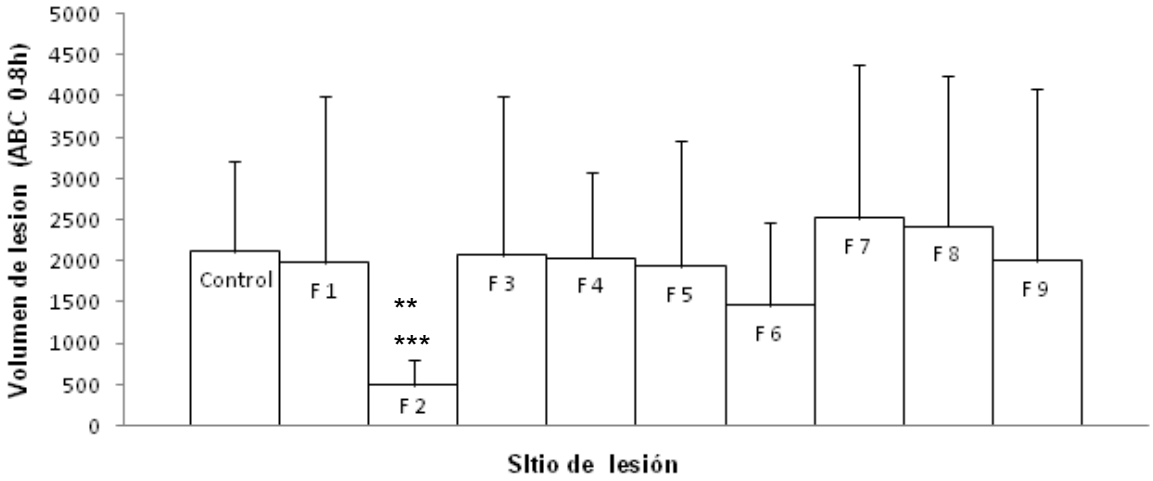


Figura 3.3: ABC 0-8h del volumen de lesión del edema intradérmico inducido por carragenina (n=6, 2 replicados).

** Diferencia significativa con Control, F1, F3, F4, F5 y F9 . ANOVA de dos vías

*** Diferencia significativa P<0.001 Control, F7 y F8.

Tabla 3.2.1.2.: Porcentaje de inhibición del volumen de lesión tras la administración tópica de la formulación 1 de diclofenac (dosis 1mg/cm2, n=6, 2 replicados).

TIEMPO (h)	2	4	6	8	ABC 0-8h
Equino 1	82 ± 26	84 ± 13	59 ± 7	61 ± 12	510 ± 76
Equino 2	0 ± 0	36 ± 37	27 ± 38	35 ± 28	160 ± 180
Equino 3	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	66 ± 35	666 ± 35
Equino 4	14 ± 13	0 ± 0	3 ± 4	9 ± 13	43 ± 47
Equino 5	63 ± 41	57 ± 33	74 ± 17	63 ± 18	451 ± 199
Equino 6	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± **0**
MEDIA ± DS	43 ± 44	46 ± 42	44 ± 40	39 ± 29	305 ± 274
CV	102	91	92	75	90

Tabla 3.2.1.3.: Porcentaje de inhibición del volumen de lesión tras la administración tópica de la formulación 2 de diclofenac (dosis 1mg/cm2, n=6, 2 replicados).

TIEMPO (h)	2	4	6	8	ABC 0-8h
Equino 1	33 ± 46	31 ± 37	60 ± 11	84 ± 8	330 ± 136
Equino 2	24 ± 34	35 ± 19	17 ± 24	27 ± 19	178 ± 173
Equino 3	8 ± 11	80 ± 28	84 ± 23	64 ± 6	407 ± 120
Equino 4	62 ± 29	69 ± 24	87 ± 10	80 ± 15	515 ± 141
Equino 5	48 ± 47	39 ± 55	61 ± 29	61 ± 8	355 ± 272
Equino 6	30 ± 42	59 ± 18	59 ± 18	58 ± 35	354 ± 124
MEDIA ± DS	34 ± 19	52 ± 20	61 ± 25	62 ± 20	356 ± 110
CV	55	39	41	33	31

Tabla 3.2.1.4.: Porcentaje de inhibición del volumen de lesión tras la administración tópica de la formulación 3 de diclofenac (dosis 1mg/cm2, n=6, 2 replicados).

TIEMPO (h)	2	4	6	8	ABC 0-8h
Equino 1	100 ± 0	89 ± 5	66 ± 24	24 ± 8	533 ± 30
Equino 2	46 ± 48	55 ± 28	40 ± 28	54 ± 8	335 ± 24
Equino 3	100 ± 0	100 ± 0	53 ± 0	41 ± 9	547 ± 9
Equino 4	27 ± 38	44 ± 40	30 ± 37	20 ± 8	221 ± 238
Equino 5	31 ± 7	67 ± 18	18 ± 16	0 ± 0	230 ± 82
Equino 6	48 ± 22	63 ± 2	64 ± 16	54 ± 24	401 ± 31
MEDIA ± DS	59 ± 33	69 ± 21	45 ± 19	32 ± 21	378 ± 142
CV	56	30	43	67	38

Tabla 3.2.1.5.: Porcentaje de inhibición del volumen de lesión tras la administración tópica de la formulación 4 de diclofenac (dosis 1mg/cm2, n=6, 2 replicados).

TIEMPO (h)	2	4	6	8	ABC 0-8h
Equino 1	100 ± 0	78 ± 21	55 ± 4	28 ± 27	492 ± 21
Equino 2	5 ± 6	15 ± 21	14 ± 20	6 ± 8	73 ± 103
Equino 3	100 ± 0	100 ± 0	18 ± 25	34 ± 48	469 ± 98
Equino 4	53 ± 66	29 ± 41	43 ± 16	34 ± 6	283 ± 242
Equino 5	0 ± 0	0 ± 0	22 ± 31	29 ± 1	73 ± 62
Equino 6	11 ± 15	0 ± 0	18 ± 25	43 ± 2	100 ± 19
MEDIA ± DS	45 ± 47	37 ± 42	28 ± 16	29 ± 13	248 ± 197
CV	105	114	59	44	79

Tabla 3.2.1.6.: Porcentaje de inhibición del volumen de lesión tras la administración tópica de la formulación 5 de diclofenac (dosis 1mg/cm2, n=6, 2 replicados).

TIEMPO (h)	2	4	6	8	ABC 0-8h
Equino 1	52 ± 6	42 ± 40	29 ± 30	17 ± 16	263 ± 144
Equino 2	32 ± 25	61 ± 13	87 ± 18	50 ± 71	408 ± 184
Equino 3	100 ± 0	75 ± 17	45 ± 63	40 ± 57	479 ± 216
Equino 4	37 ± 52	53 ± 56	49 ± 42	0 ± 0	276 ± 300
Equino 5	81 ± 6	86 ± 6	66 ± 23	50 ± 25	514 ± 71
Equino 6	0 ± 0	67 ± 6	58 ± 22	65 ± 3	313 ± 34
MEDIA ± DS	50 ± 36	64 ± 16	55 ± 20	37 ± 24	375 ± 107
CV	72	25	36	65	29

Tabla 3.2.1.7.: Porcentaje de inhibición del volumen de lesión tras la administración tópica de la formulación 6 de diclofenac (dosis 1mg/cm2, n=6, 2 replicados).

TIEMPO (h)	2	4	6	8	ABC 0-8h
Equino 1	0 ± 0	10 ± 4	67 ± 3	85 ± 4	239 ± 6
Equino 2	18 ± 25	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	35 ± 49
Equino 3	18 ± 25	79 ± 30	100 ± 0	100 ± 0	493 ± 10
Equino 4	56 ± 11	57 ± 33	59 ± 12	26 ± 12	368 ± 53
Equino 5	72 ± 23	62 ± 8	67 ± 18	46 ± 65	446 ± 164
Equino 6	17 ± 24	38 ± 54	38 ± 54	0 ± 0	186 ± 263
MEDIA ± DS	30 ± 27	41 ± 31	55 ± 34	43 ± 42	294 ± 173
CV	92	76	61	99	59

Tabla 3.2.1.8.: Porcentaje de inhibición del volumen de lesión tras la administración tópica de la formulación 7 de diclofenac (dosis 1mg/cm^2, n=6, 2 replicados).

TIEMPO (h)	2	4	6	8	ABC 0-8h
Equino 1	43 ± 3	49 ± 28	30 ± 42	12 ± 17	255 ± 163
Equino 2	45 ± 11	14 ± 19	60 ± 24	35 ± 9	271 ± 40
Equino 3	72 ± 40	81 ± 28	50 ± 71	44 ± 62	449 ± 337
Equino 4	0 ± 0	0 ± 0	4 ± 4	22 ± 8	30 ± 0
Equino 5	30 ± 42	48 ± 67	38 ± 54	37 ± 52	268 ± 378
Equino 6	10 ± 13	45 ± 45	77 ± 20	78 ± 19	340 ± 175
MEDIA ± DS	33 ± 26	39 ± 29	43 ± 25	38 ± 23	269 ± 137
CV	79	73	59	60	51

Tabla 3.2.1.9.: Porcentaje de inhibición del volumen de lesión tras la administración tópica de la formulación 8 de diclofenac (dosis 1mg/cm2, n=6, 2 replicados).

TIEMPO (h)	2	4	6	8	ABC 0-8h
Equino 1	50 ± 71	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 141
Equino 2	6 ± 8	33 ± 11	29 ± 41	35 ± 49	170 ± 169
Equino 3	100 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	15 ± 21	415 ± 21
Equino 4	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	35 ± 6	35 ± 6
Equino 5	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	13 ± 18	13 ± 18
Equino 6	3 ± 4	0 ± 0	0 ± 0	30 ± 2	36 ± 11
MEDIA ± DS	27 ± 41	22 ± 40	5 ± 12	21 ± 14	128 ± 152
CV	154	183	245	66	119

Tabla 3.2.1.10.: Porcentaje de inhibición del volumen de lesión tras la administración tópica de la formulación 9 de diclofenac (dosis 1mg/cm2, n=6, 2 replicados).

TIEMPO (h)	2	4	6	8	ABC 0-8h
Equino 1	88 ± 17	100 ± 0	65 ± 21	53 ± 13	558 ± 6
Equino 2	0 ± 0	5 ± 7	27 ± 37	33 ± 46	96 ± 135
Equino 3	100 ± 0	100 ± 0	34 ± 30	59 ± 46	527 ± 105
Equino 4	0 ± 0	0 ± 0	6 ± 8	35 ± 1	47 ± 16
Equino 5	78 ± 1	59 ± 25	51 ± 4	56 ± 12	432 ± 74
Equino 6	21 ± 29	45 ± 59	70 ± 1	45 ± 62	314 ± 238
MEDIA ± DS	48 ± 46	51 ± 44	42 ± 24	46 ± 11	329 ± 217
CV	96	85	58	24	66

3.2.2.- ESTUDIO DEL EFECTO CLINICO ANTINFLAMATORIO DE LA FORMULACION DE DICLOFENAC DIETILAMINA CON MEJOR PERFIL IN VIVO e IN VITRO (Formulación 2 [15% ácido oleico como mejorador de la penetración]).

Durante el transcurso de los estudios experimentales *in vivo* no se observó ningún tipo de toxicidad relacionada a los tratamientos administrados. Asimismo, no se observaron reacciones cutáneas de hipersensibilidad que pudieran ser asociadas a las formulaciones farmacéuticas tópicas aplicadas.

3.2.2.1.- LARGO DEL PASO

La inyección intracarpiana de LPS provocó una disminución en el largo de paso en todos los animales del grupo control. La disminución en este parámetro fue clínicamente evidente a partir de las 3 h post-inyección. En este grupo 2 de los 4 animales mostraron incapacidad de caminar; uno a las 3 h post-inyección y el otro en el periodo de 6 a 9 h post-inyección.

La disminución máxima se presentó a las 3 h post-inyección con un valor promedio de 87%. Aún cuando el largo de paso mostró una clara tendencia de retornar a los valores basales, el valor promedio para la última muestra registrada (120h) fue de 96.5 ± 1.3%. El $AUC_{0\text{-}120}$ promedio (cambio desde basal vs tiempo) para los animales tratados con placebo fue 11408.6 ± 246.7 % de cambio desde basal/h.

En el grupo tratado, solo 1 de los 4 animales experimentales mostró (entre las 3 y 6 horas post-administración) incapacidad para caminar. La disminución

máxima del largo de paso se presentó a las 9 horas post-inyección con un valor promedio de 86 ± 213.1%. (Ver figura 3.4.1)

Al igual que en el grupo control, luego de 120 h post-inyección de LPS, solo uno de los animales experimentales recuperó su largo de paso basal. El valor promedio para la última muestra registrada fue de 96.3 ± 3.6 %. El AUC_{0-120} promedio para los animales tratados fue 11520.6 ± 247.8 % de cambio desde basal/h (Ver Figura 3.4.1, cuadro interior).

Si bien existen diferencias numéricas entre el grupo control y el tratado, estas no son, desde el punto de vista estadístico, significativas.

El análisis completo del proceso a través del AUC_{0-120}, no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales.

3.2.2.2.-ÁNGULO EN ESTACIÓN

En el grupo control la inyección intracarpiana de LPS provocó una modificación del ángulo en estación en 2 de los animales experimentales. La disminución del ángulo en estación fue clínicamente evidente a partir de las 3 h post-LPS, con un valor cercano al 47%. Este parámetro retornó a los valores basales en uno de los animales a las 6 h post-LPS y en el otro de los animales a las 12 h post-LPS (Ver Fig. 3.2.2.2).

En el grupo tratado solo uno de los animales mostró una disminución en el ángulo en estación. El perfil temporal fue similar al observado en el grupo control, siendo el valor máximo de disminución 70% a las 6 h post-inyección. El animal recuperó sus valores basales a las 9 h post-LPS.

El análisis de los cambios registrados en este parámetro en el grupo tratado, permitió identificar dos subpoblaciones. La primera, definida como “sensible”, mostró disminuciones mayores del ángulo en estación, mientras que la segunda “resistente”, no mostró prácticamente cambios en este parámetro.

3.2.2.3.- ÁNGULO EN FLEXIÓN

En el grupo control, la inyección intracarpiana de LPS provocó un aumento del ángulo en flexión en todos los animales experimentales. El aumento en este parámetro fue evidente clínicamente en todos los animales a partir de 1 h post-LPS. El máximo aumento (≅ 475%) se presentó a las 9 h (Ver Fig. 3.4.3)

El ángulo en flexión tendió a volver a valores pre-inyección de LPS, sin embargo al finalizar el estudio, uno de los animales del grupo no había recuperado su valor basal, siendo su último valor medido 25% más alto. El $AUC_{0\text{-}120}$ promedio para los animales del grupo control fue 18.259 ± 5.150 de cambio desde basal/h (Ver Fig. 3.2.2.3., cuadro interno).

Los animales del grupo tratado mostraron un aumento en el ángulo en flexión con un perfil temporal comparable al observado en el grupo control.

El aumento máximo del ángulo en flexión fue de 408% y se presentó a las 12 h post-LPS. A diferencia del grupo control, luego de 120 h post-LPS, todos los animales experimentales recuperaron su valor basal. El $AUC_{0\text{-}120}$ promedio para los animales tratados con placebo fue 10.775 ± 4.488 de cambio desde basal/h (Ver Fig. 3.4.3, cuadro interior).

3.2.2.4.- CIRCUNFERENCIA CARPIANA

En el grupo control la inyección intracarpiana de LPS provocó un aumento de la circunferencia carpiana en todos los animales experimentales. El aumento fue clínicamente evidente a partir de la 3 h post-inyección, con un valor máximo promedio del 7.7 ± 2.1% a las 72 h post-LPS.

Si bien la circunferencia carpiana mostró una tendencia de retornar a los valores basales (pre-LPS), al finalizar la experiencia (120 h post-LPS) ninguno de los animales del grupo había recuperado su valor basal, presentando un valor promedio de 6.4 ± 2.1 % (Ver Fig. 3.2.2.4). El $AUC_{0\text{-}120}$ promedio estimada fue de 690 ± 173 de cambio desde basal/h (Ver Fig. 3.2.2.4, cuadro interior).

En el grupo tratado, de manera similar a lo observado en el grupo control, la circunferencia carpiana aumentó en todos los animales tratados. El aumento máximo (7.8 ± 0.8%) se presentó a las 72 h post-LPS.

Aun cuando la circunferencia carpiana mostró una tendencia de retornar a los valores basales (pre-LPS), al finalizar la experiencia (120 h post-LPS) ninguno de los animales del grupo había recuperado su valor basal, presentando un valor promedio de 6,3 ± 2,9% (Ver Fig. 7). El $AUC_{0\text{-}120}$ promedio estimada fue de 624 ± 157 cambio/h (Ver Fig. 3.4.4, cuadro interior).

3.2.2.5.- TEMPERATURA CORPORAL

En el grupo control la inyección intracarpiana de LPS indujo a las 3 h post-LPS, una leve disminución de la temperatura corporal en todos los animales

experimentales (-0,7%). En los siguientes tiempos muestrales, los valores de temperatura corporal se mantuvieron ligeramente superiores a los valores basales; el máximo valor fue registrado a las 12 h post-LPS y fue del 1%. Solo uno de los animales presentó un cambio superior (2.6%) a las 12 h. Al finalizar el estudio (120 h post-LPS) los animales presentaron un valor promedio de cambio de 0,1 ± 0,1 % (Ver Fig. 3.2.2.5).

Los animales del grupo tratado mostraron, de manera similar a lo observado en el grupo control, una leve disminución de la temperatura a las 3 h post-LPS (-0,6%). A continuación, los valores de este parámetro fueron cercanos a los valores basales, el máximo valor fue registrado a las 12 h post-LPS (1,1%). Ninguno de los animales presentó un cambio superior a 2%, el máximo valor observado fue de 1,8% a las 12 h post-LPS. Al igual que en el grupo control, todos los animales experimentales recuperaron el valor basal al final del estudio (0,1 ± 0,4 %).

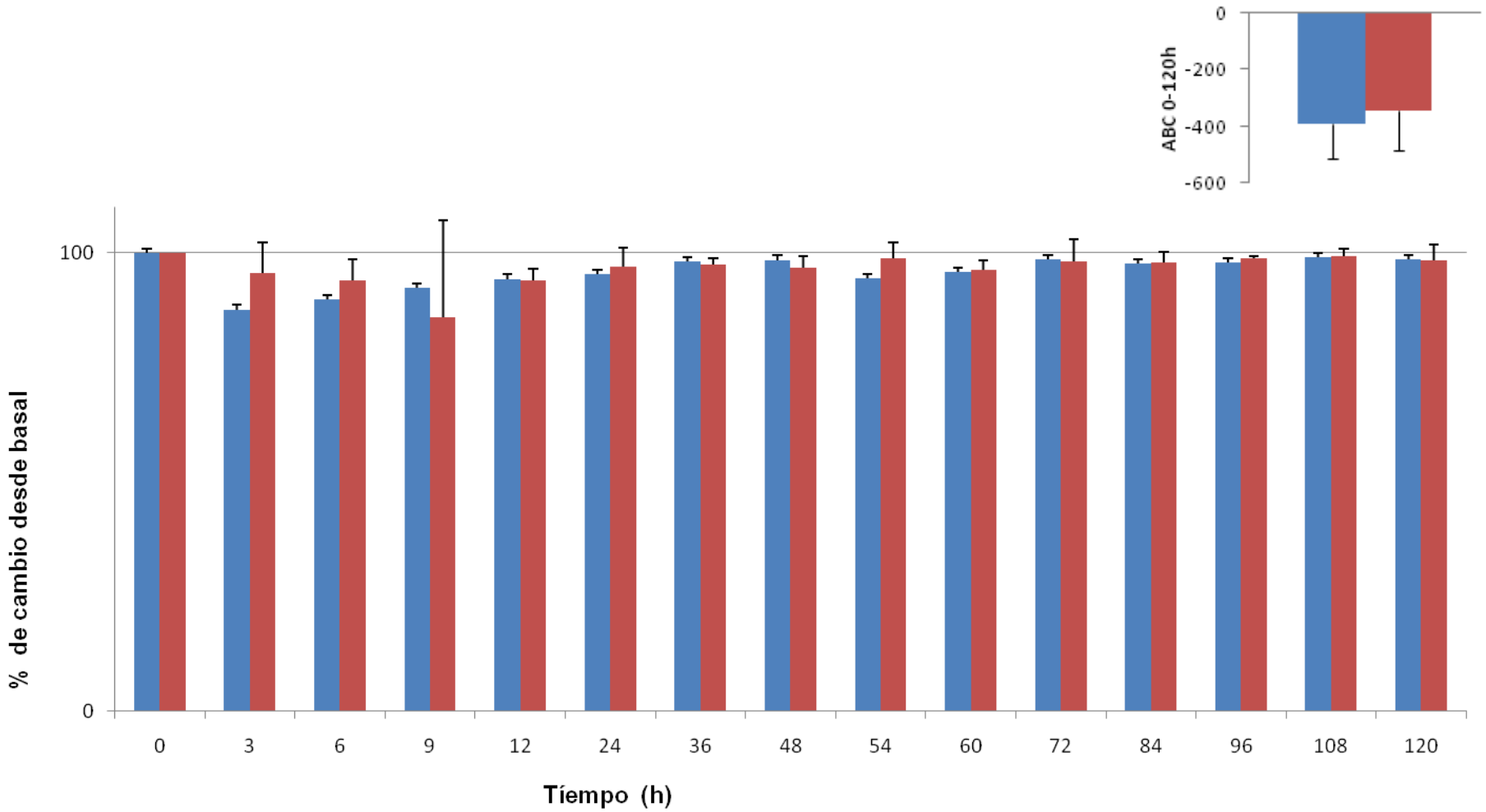


Figura 3.2.2.1.: Porcentaje de cambio desde basal (Media ± DS) en función del tiempo del largo del paso en equinos artríticos luego de la administración epicutánea de placebo ( ) y 1 mg/cm2/6h de diclofenac ( ). Cuadro interior: áreas bajo la curva (ABC) % cambio desde basal vs. tiempo para el largo del paso normalizado en los dos grupos experimentales.

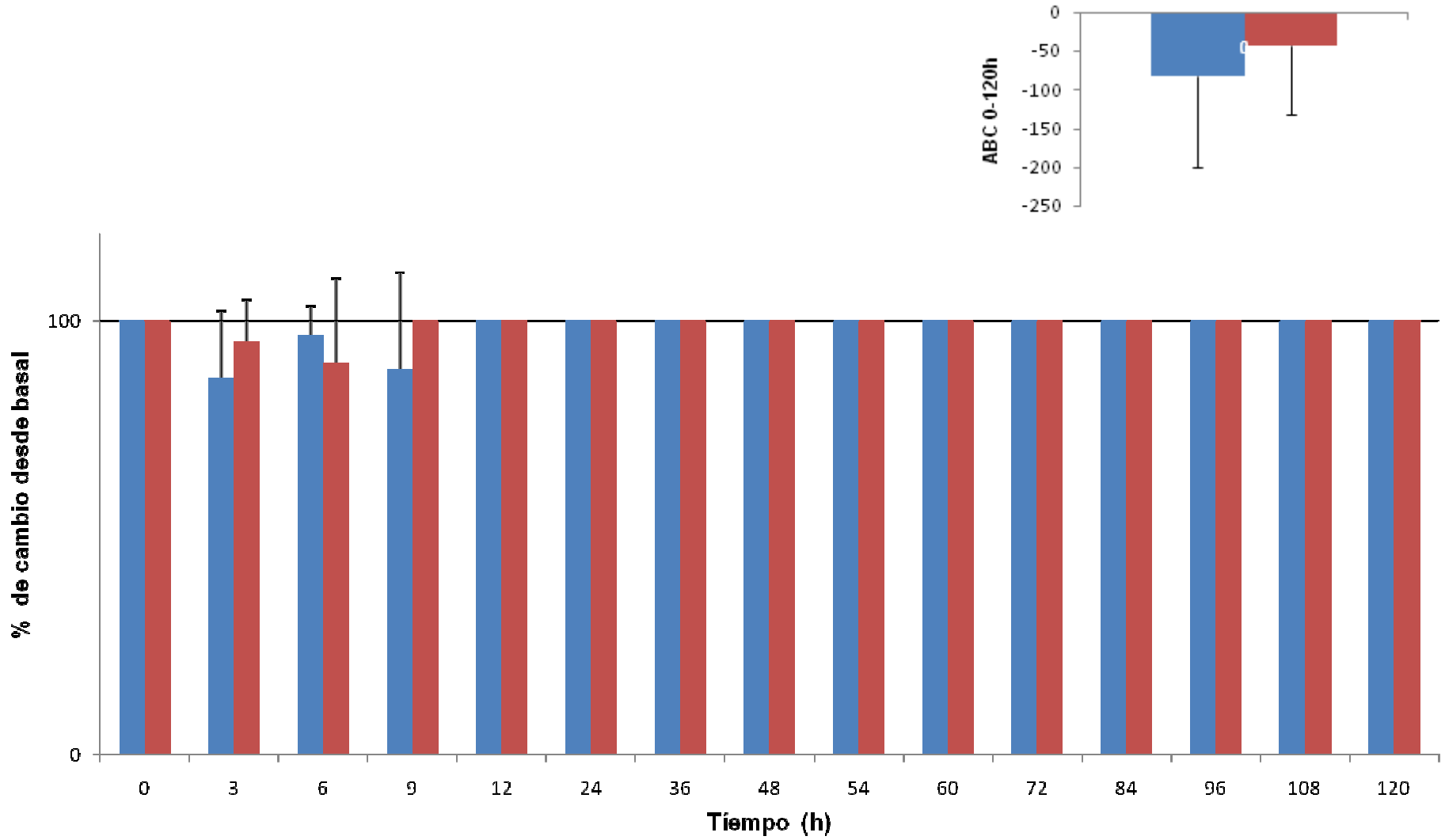


Figura 3.2.2.2.: Porcentaje de cambio desde basal (Media ± DS) en función del tiempo del ángulo en estación en equinos artríticos luego de la administración epicutánea de placebo ( ) y 1 mg/cm2/6h de diclofenac ( ). Cuadro interior: áreas bajo la curva (AUC) cambio desde basal vs. tiempo para el ángulo en estación normalizado en los dos grupos experimentales.

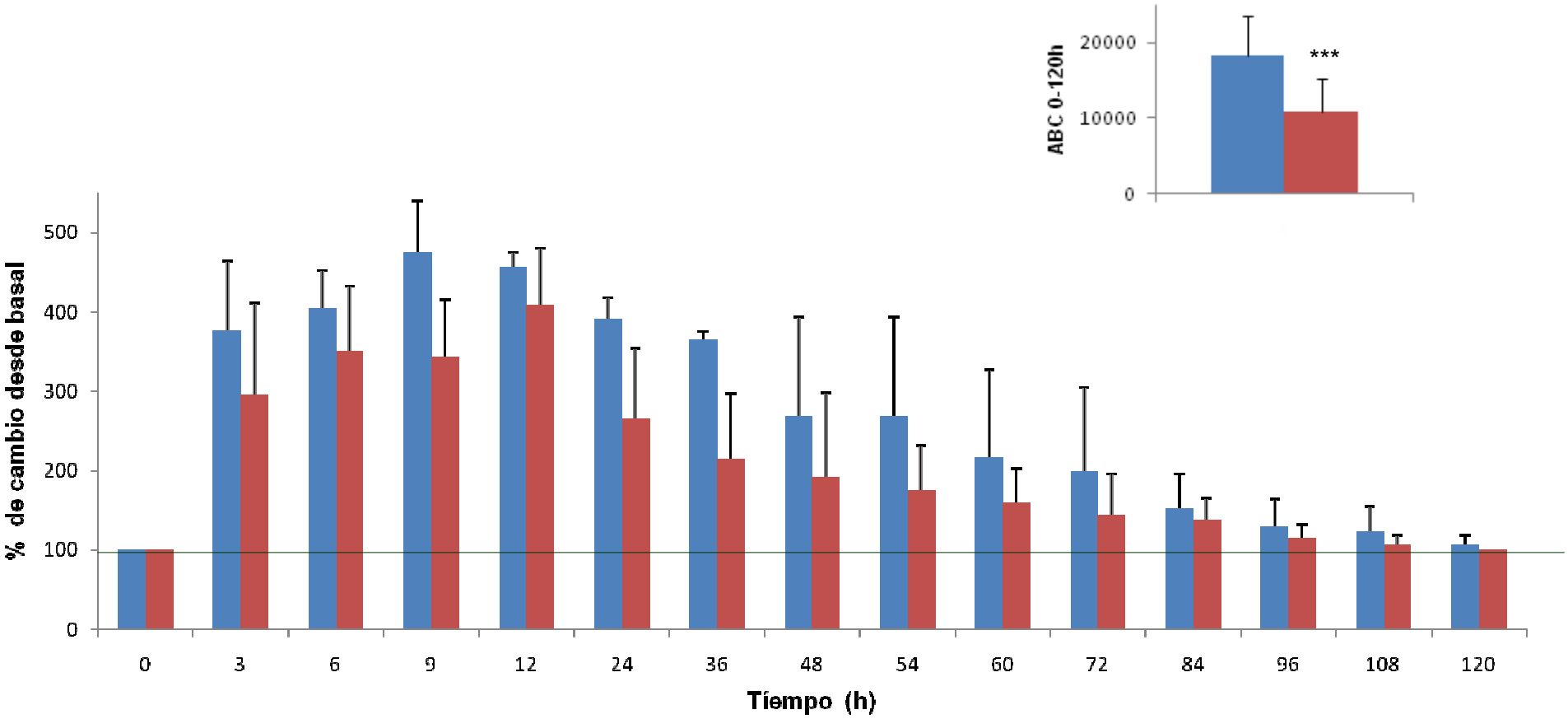


Figura 3.2.2.3.: Porcentaje de cambio desde basal (Media ± DS) en función del tiempo del ángulo en flexión en equinos artríticos luego de la administración epicutánea de placebo ( ) y 1 mg/cm2/6h de diclofenac ( ). Cuadro interior: áreas bajo la curva (AUC) cambio desde basal vs. tiempo para el ángulo en flexión normalizado en los dos grupos experimentales. ***

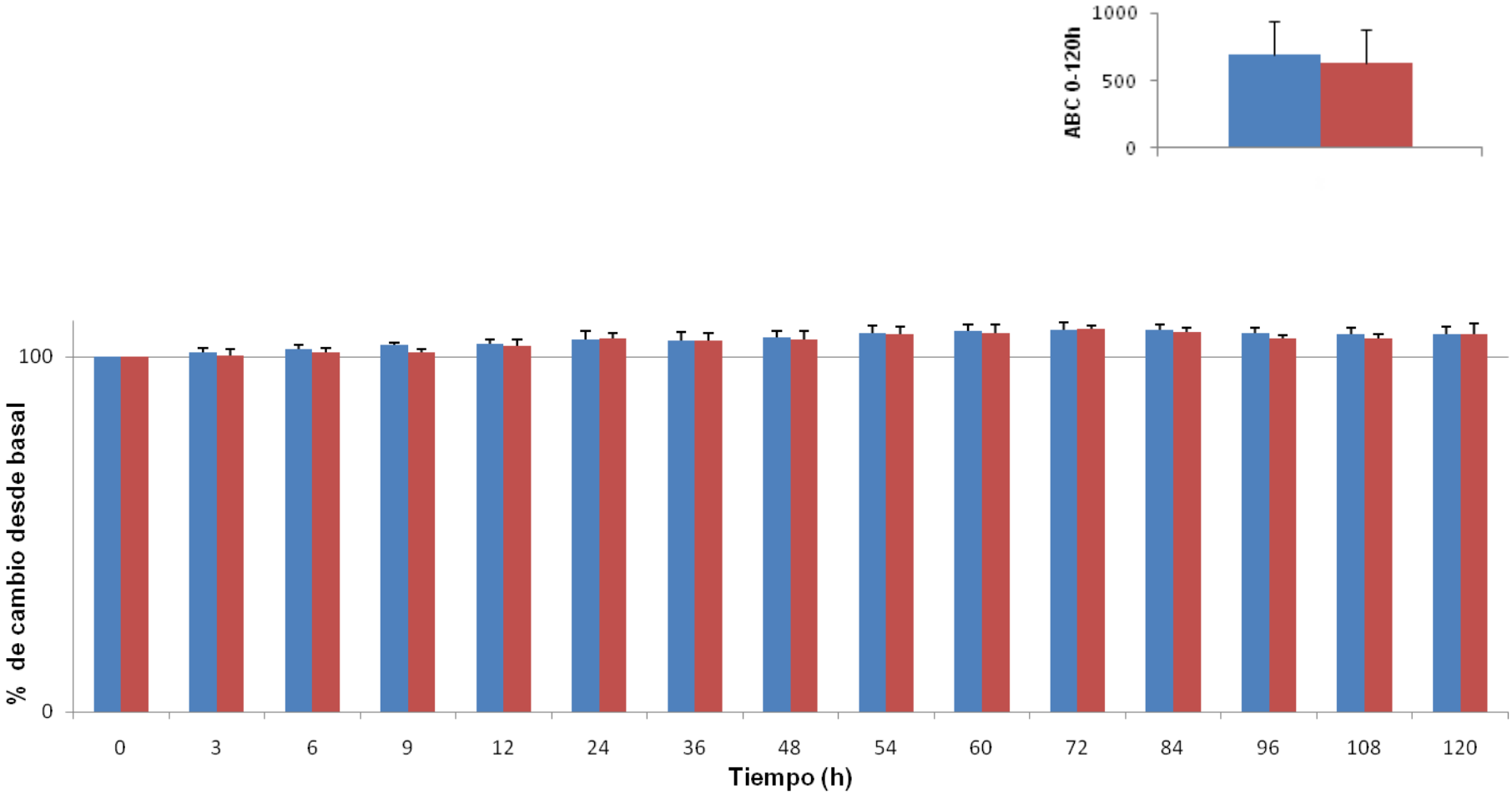


Figura 3.2.2.4.: Porcentaje de cambio desde basal (Media ± DS) en función del tiempo de la circunferencia carpiana en equinos artríticos luego de la administración epicutánea de placebo ( ) y 1 mg/cm2/6h de diclofenac ( ). Cuadro interior: áreas bajo la curva (AUC) cambio desde basal vs. tiempo para la circunferencia carpiana normalizado en los dos grupos experimentales.

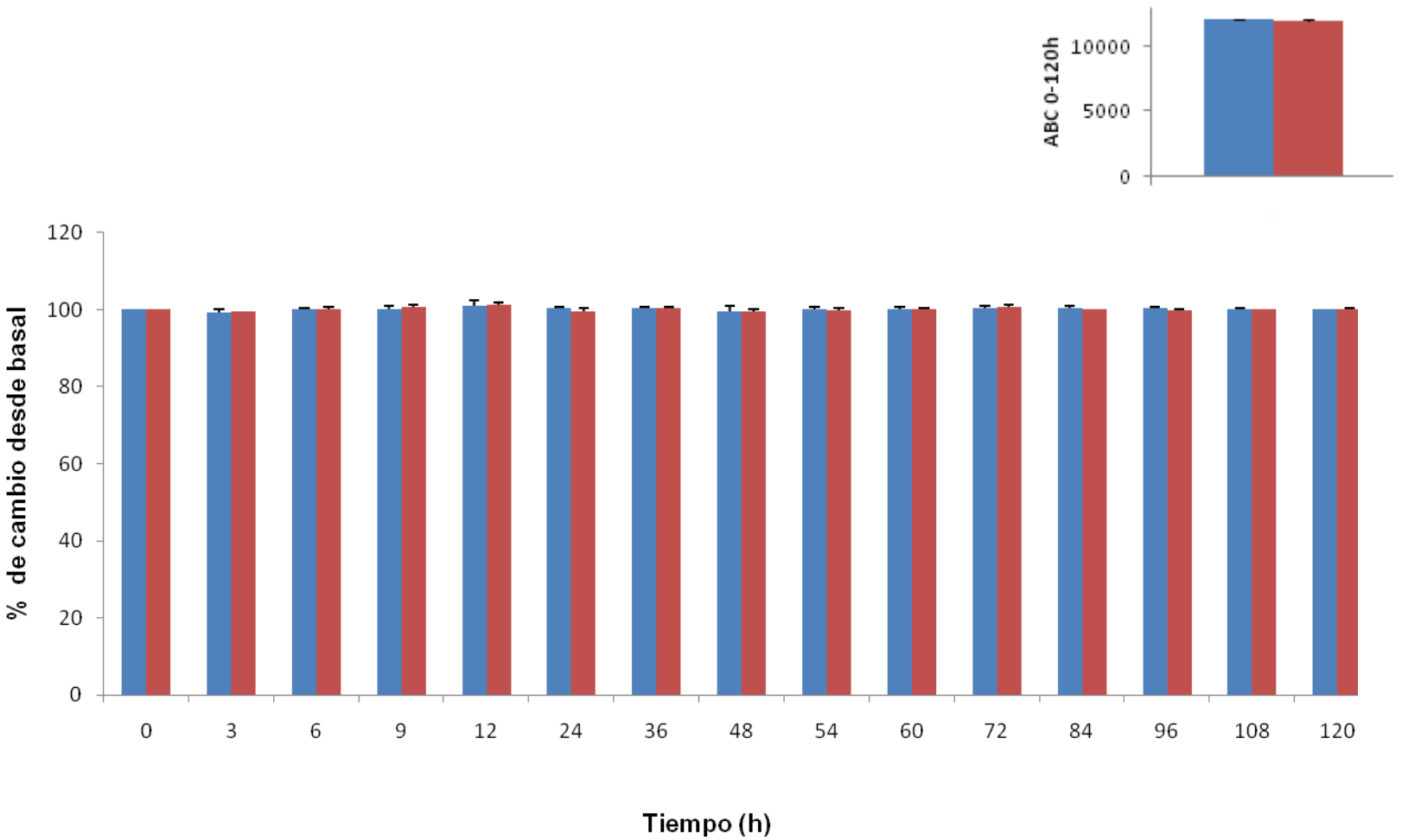


Figura 3.2.2.5.: Porcentaje de cambio desde basal (Media ± DS) en función del tiempo de la temperatura corporal en equinos artríticos luego de la administración epicutánea de placebo ( ) y 1 mg/cm2/6h de diclofenac ( ). Cuadro interior: áreas bajo la curva (AUC) porcentaje de cambio desde basal vs. tiempo para la temperatura corporal en los dos grupos experimentales.

TABLA 3.2.2.1.A: Porcentaje de cambio desde basal del largo de paso en equinos con artritis endotóxica tras la administración tópica de 20g totales de la formulación placebo cada 6 h. (n=4).

TIEMPO (h)	Equino 1	Equino 2	Equino 3	Equino 4	MEDIA ± DS
0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0 ± 0.0
3	95.1	79.7	88.2	No camino	87.7 ± 7.7
6	94.1	86.5	No camino	88.9	89.8 ± 3.9
9	95.5	86.5	No camino	95.1	92.4 ± 5.1
12	95.7	84.7	100.4	96.5	94.3 ± 6.7
24	96.4	94.5	93.0	97.4	95.3 ± 2.0
36	97.2	98.9	96.2	100.3	98.2 ± 1.8
48	95.1	100.6	101.2	96.9	98.5 ± 2.9
54	92.5	95.5	93.0	96.7	94.4 ± 2.0
60	92.9	96.8	94.8	98.6	95.8 ± 2.5
72	97.6	97.7	99.2	99.7	98.5 ± 1.1
84	93.3	97.6	100.1	99.3	97.6 ± 3.0
96	96.6	100.0	95.8	99.2	97.9 ± 2.0
108	96.9	102.2	96.4	100.3	99.0 ± 2.8
120	97.2	99.6	97.7	99.6	98.5 ± 1.3
ABC Total	11490	11582	11043	11518	11408.6 ± 246.7

TABLA 3.2.2.1.B: Porcentaje de cambio desde basal del largo de paso en equinos con *artritis endotó*xica tras la administración tópica de 20g totales de la formulación 2 diclofenac (1mg/cm^2) cada 6 h. (n=4).

TIEMPO (h)	Equino 1	Equino 2	Equino 3	Equino 4	MEDIA ± DS
0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0 ± 0.0
3	97.6	87.9	101.0	No camino	95.5 ± 6.8
6	99.2	90.4	92.4	No camino	94.0 ± 4.6
9	98.8	96.6	94.1	54.6	86.0 ± 21.1
12	97.9	91.9	93.0	93.2	94.0 ± 2.7
24	100.9	91.2	98.2	97.4	96.9 ± 4.1
36	96.1	97.9	96.4	99.1	97.4 ± 1.4
48	93.3	96.7	99.1	97.7	96.7 ± 2.5
54	97.8	94.6	102.1	101.1	98.9 ± 3.4
60	95.3	93.9	98.3	97.7	96.3 ± 2.1
72	91.8	97.2	100.4	102.9	98.1 ± 4.8
84	95.0	98.5	98.0	100.2	97.9 ± 2.2
96	98.5	98.7	99.1	99.4	98.9 ± 0.4
108	97.6	97.9	99.9	101.3	99.2 ± 1.8
120	95.8	95.5	98.9	103.2	98.3 ± 3.6
ABC Total	11589	11496	11797	11201	11520.6 ± 247.8

TABLA 3.2.2.2.A: Porcentaje de cambio desde basal del ángulo en estación en equinos con artritis endotóxica tras la administración tópica de 20g totales de la formulación placebo cada 6 h. (n=4).

TIEMPO (h)	Equino 1	Equino 2	Equino 3	Equino 4	MEDIA ± DS
0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0 ± 0,0
3	100,0	72,2	100,0	75,0	86,8 ± 15,3
6	100,0	100,0	100,0	86,1	96,5 ± 6,9
9	100,0	100,0	100,0	55,6	88,9 ± 22,2
12	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0 ± 0,0
24	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0 ± 0,0
36	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0 ± 0,0
48	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0 ± 0,0
54	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0 ± 0,0
60	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0 ± 0,0
72	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0 ± 0,0
84	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0 ± 0,0
96	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0 ± 0,0
108	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0 ± 0,0
120	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0 ± 0,0
ABC Total	12000	11917	12000	11750	11916,7 ± 117,9

TABLA 3.2.2.2.B: Porcentaje de cambio desde basal angulo en estación en equinos con artritis endotóxica tras la administración tópica de 20g totales de la formulación 2 diclofenac (1mg/cm^2) cada 6 h. (n=4).

TIEMPO (h)	Equino 1	Equino 2	Equino 3	Equino 4	MEDIA ± DS
0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0 ± 0,0
3	100,0	100,0	100,0	80,6	95,1 ± 9,7
6	100,0	100,0	100,0	61,1	90,3 ± 19,4
9	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0 ± 0,0
12	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0 ± 0,0
24	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0 ± 0,0
36	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0 ± 0,0
48	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0 ± 0,0
54	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0 ± 0,0
60	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0 ± 0,0
72	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0 ± 0,0
84	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0 ± 0,0
96	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0 ± 0,0
108	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0 ± 0,0
120	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0 ± 0,0
ABC Total	12000	12000	12000	11825	11956,3 ± 87,5

TABLA 3.2.2.3.A: Porcentaje de cambio desde basal del ángulo en flexión en equinos con *artritis endotó*xica tras la administración tópica de 20g totales de la formulación placebo cada 6 h. (n=4).

TIEMPO (h)	Equino 1	Equino 2	Equino 3	Equino 4	MEDIA ± DS
0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0 ± 0.0
3	300.0	333.3	500.0	375.0	377.1 ± 87.5
6	350.0	400.0	466.7	400.0	404.2 ± 47.9
9	500.0	550.0	400.0	450.0	475.0 ± 64.5
12	475.0	433.3	466.7	450.0	456.3 ± 18.5
24	375.0	366.7	400.0	425.0	391.7 ± 26.4
36	375.0	366.7	366.7	350.0	364.6 ± 10.5
48	100.0	400.0	300.0	275.0	268.8 ± 124.8
54	100.0	400.0	300.0	275.0	268.8 ± 124.8
60	100.0	366.7	200.0	200.0	216.7 ± 110.6
72	100.0	350.0	166.7	175.0	197.9 ± 106.8
84	100.0	200.0	133.3	175.0	152.1 ± 44.3
96	100.0	166.7	100.0	150.0	129.2 ± 34.4
108	100.0	166.7	100.0	125.0	122.9 ± 31.5
120	100.0	100.0	100.0	125.0	106.3 ± 12.5
ABC Total	23963	36550	29850	30675	30259.4 ± 5149.9

TABLA 3.2.2.3.B: Porcentaje de cambio desde basal del ángulo en flexión en equinos con *artritis endotó*xica tras la administración tópica de 20g totales de la formulación 2 diclofenac (1mg/cm2) cada 6 h. (n=4).

TIEMPO (h)	Equino 1	Equino 2	Equino 3	Equino 4	MEDIA ± DS
0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0 ± 0.0
3	400.0	300.0	133.3	350.0	295.8 ± 115.8
6	250.0	333.3	366.7	450.0	350.0 ± 82.8
9	325.0	300.0	300.0	450.0	343.8 ± 71.8
12	375.0	333.3	500.0	425.0	408.3 ± 71.7
24	175.0	200.0	333.3	350.0	264.6 ± 89.8
36	125.0	266.7	166.7	300.0	214.6 ± 82.3
48	100.0	266.7	100.0	300.0	191.7 ± 106.7
54	100.0	233.3	166.7	200.0	175.0 ± 56.9
60	100.0	200.0	166.7	175.0	160.4 ± 42.7
72	100.0	200.0	100.0	175.0	143.8 ± 51.5
84	100.0	166.7	133.3	150.0	137.5 ± 28.5
96	100.0	133.3	100.0	125.0	114.6 ± 17.2
108	100.0	100.0	100.0	125.0	106.3 ± 12.5
120	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0 ± 0.0
ABC Total	17288	24450	21500	27863	22775.0 ± 4488.0

TABLA 3.2.2.4.A: Porcentaje de cambio desde basal de la circunferencia carpiana en equinos con *artritis endotó*xica tras la administración tópica de 20g totales de la formulación placebo cada 6 h. (n=4).

TIEMPO (h)	Equino 1	Equino 2	Equino 3	Equino 4	MEDIA ± DS
0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0 ± 0.0
3	102.4	102.3	100.3	100.3	101.3 ± 1.2
6	102.2	103.6	101.0	102.4	102.3 ± 1.0
9	102.5	103.9	103.5	103.2	103.3 ± 0.6
12	102.5	104.6	104.3	103.6	103.8 ± 0.9
24	102.9	107.7	102.4	105.9	104.7 ± 2.5
36	103.2	107.8	102.4	104.7	104.6 ± 2.4
48	103.9	107.8	104.2	105.8	105.4 ± 1.8
54	106.6	109.1	104.5	106.9	106.8 ± 1.9
60	106.6	109.8	105.9	106.9	107.3 ± 1.7
72	108.6	110.2	106.3	105.6	107.7 ± 2.1
84	108.5	109.3	105.6	106.6	107.5 ± 1.7
96	108.5	107.5	105.2	105.3	106.6 ± 1.6
108	108.6	107.1	104.2	104.9	106.2 ± 2.0
120	109.0	107.1	104.2	105.3	106.4 ± 2.1
ABC Total	12713	12915	12503	12629	12689.9 ± 173.0

TABLA 3.2.2.4.B: Porcentaje de cambio desde basal de la circunferencia carpiana en equinos con artritis endotóxica tras la administración tópica de 20g totales de la formulación 2 diclofenac (1mg/cm^2) cada 6 h. (n=4).

TIEMPO (h)	Equino 1	Equino 2	Equino 3	Equino 4	MEDIA ± DS
0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0 ± 0.0
3	100.2	102.5	97.7	100.7	100.3 ± 2.0
6	101.2	103.0	100.0	100.8	101.3 ± 1.3
9	102.2	101.2	100.2	101.4	101.2 ± 0.8
12	103.2	105.3	101.0	103.0	103.2 ± 1.8
24	105.3	106.7	103.0	105.1	105.0 ± 1.6
36	103.6	106.7	102.1	105.8	104.5 ± 2.1
48	105.4	107.8	101.9	104.4	104.9 ± 2.4
54	105.9	109.2	104.2	105.8	106.3 ± 2.1
60	105.6	109.2	104.0	108.0	106.7 ± 2.3
72	108.0	108.2	106.6	108.5	107.8 ± 0.8
84	108.6	106.4	106.1	106.4	106.9 ± 1.2
96	105.3	106.0	103.6	105.4	105.1 ± 1.0
108	106.8	105.2	103.3	105.1	105.1 ± 1.4
120	110.7	104.6	104.5	105.4	106.3 ± 2.9
ABC Total	12683	12768	12403	12644	12624.4 ± 156.6

TABLA 3.2.2.5.A: Porcentaje de cambio desde basal de la temperatura corporal en equinos con artritis endotóxica tras la administración tópica de 20g totales de la formulación placebo cada 6 h. (n=4).

TIEMPO (h)	Equino 1	Equino 2	Equino 3	Equino 4	MEDIA ± DS
0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0 ± 0.0
3	99.7	98.4	99.7	99.5	99.3 ± 0.6
6	100.5	100.0	100.0	99.5	100.0 ± 0.4
9	100.0	101.3	99.5	99.7	100.1 ± 0.8
12	99.7	102.6	100.0	101.6	101.0 ± 1.4
24	100.5	100.3	100.5	100.5	100.5 ± 0.1
36	100.3	100.3	100.8	100.0	100.3 ± 0.3
48	100.5	97.9	100.0	100.3	99.7 ± 1.2
54	100.5	100.5	99.7	99.2	100.0 ± 0.6
60	100.8	99.7	100.0	99.7	100.1 ± 0.5
72	101.3	99.5	100.3	100.3	100.3 ± 0.8
84	100.5	99.7	100.3	101.1	100.4 ± 0.5
96	101.1	100.0	100.0	100.0	100.3 ± 0.5
108	100.5	99.7	100.3	100.3	100.2 ± 0.3
120	100.0	100.0	100.3	100.0	100.1 ± 0.1
ABC Total	12065	11994	12023	12028	12027.6 ± 28.8

TABLA 3.2.2.5.B: Porcentaje de cambio desde basal de la temperatura corporal en equinos con artritis endotóxica tras la administración tópica de 20g totales de la formulación 2 diclofenac (1mg/cm^2) cada 6 h. (n=4).

TIEMPO (h)	Equino 1	Equino 2	Equino 3	Equino 4	MEDIA ± DS
0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0 ± 0.0
3	99.2	99.7	99.5	99.2	99.4 ± 0.3
6	99.7	100.0	100.8	100.3	100.2 ± 0.5
9	99.5	100.8	101.1	101.1	100.6 ± 0.8
12	101.8	101.1	101.3	100.3	101.1 ± 0.7
24	100.3	100.0	98.7	99.7	99.7 ± 0.7
36	100.5	100.3	100.3	100.5	100.4 ± 0.2
48	100.3	99.5	99.2	99.5	99.6 ± 0.5
54	100.5	100.3	99.2	99.7	99.9 ± 0.6
60	100.3	99.7	100.3	100.5	100.2 ± 0.3
72	101.3	100.0	100.3	101.1	100.7 ± 0.6
84	100.0	100.0	100.3	100.0	100.1 ± 0.1
96	100.0	99.7	100.0	99.7	99.9 ± 0.2
108	100.3	99.7	100.0	100.0	100.0 ± 0.2
120	100.3	100.3	100.3	99.5	100.1 ± 0.4
ABC Total	12047	12002	12000	12011	12015.1 ± 21.9

4. DISCUSIÓN

En el presente trabajo de Tesis se describen los efectos de un grupo de potenciadores de la penetración en la difusión transdérmica de diclofenac dietilamina a través de la piel del caballo. El diseño de este estudio incluyó métodos in vitro e in vivo lo que permitió describir los efectos de los aumentadores sobre la penetración de diclofenac, así como, evaluar los cambios farmacodinámicos reflejo de las modificaciones de la cinética de penetración del principio activo.

Los AINEs son fármacos ampliamente utilizados tanto en medicina humana como en veterinaria para el tratamiento de procesos inflamatorios. En medicina equina son las drogas de elección para el tratamiento de patologías inflamatorias con asiento en el sistema músculo-esquelético (Goodrich y Nixon, 2006). La eficacia de los AINEs tras su administración sistémica, oral o parenteral, en todas las especies es indiscutible (Lees 1999; Lees 2003), sin embargo, cuando su administración es prolongada o en dosis altas (ya sea solos o en combinación), la aparición de eventos adversos es común. Estos efectos adversos pueden limitar el rendimiento como en el caso de úlceras gástricas (Snow y col., 1981; Collins y Tyler, 1984) o ser potencialmente mortales como en los casos de colitis dorsal derecha en equinos (Mc Connico y col., 2008). La administración transdermica de AINEs representa una excelente alternativa para evitar estas situaciones ya que reduce de manera importante el riesgo de aparición de efectos adversos (Villarino, 2006).

En los seres humanos, los AINE se administran rutinariamente de manera tópica en el tratamiento de las condiciones traumáticas que afectan músculos y tendones (Nair y Taylor-Gjevre, 2010). Sin embargo, la eficacia tras la administración

epicutánea es terreno de controversia; las diferencias en eficacia clínica entre formulaciones comerciales son muy profundas (Galer y col., 2000; Patel y Leswell 1996; Bookman y col., 2004; Escribano, 2003).

Existen importantes diferencias en la anatomía y la fisiología de la epidermis entre las especies (grosor de la piel, el número de capas de células, las secreciones sebáceas). Estas diferencias determinan las variaciones en la penetración transdermal de fármacos entre especies diferentes. Basado en esto, la simple extrapolación de la cinética de penetración de fármacos tras su administración tópica entre las especies, incluyendo seres humanos, no es aconsejable (Mills y Cruz. 2006).

En medicina equina el uso de formulaciones diseñadas para seres humanos no es raro, aún cuando no existen datos concretos que permitan extrapolar la eficacia de estas formulaciones entre las mencionadas especies.

Hasta la fecha, sólo hay una formulación de aplicación tópica con diclofenac como principio activo diseñada para caballos y aprobada por la FDA. Esta formulación es comercializada por el laboratorio IDEXX (USA) bajo el nombre de Surpass. Basado en los datos del fabricante, el producto es una crema tópica que contiene 1% de diclofenac sódico en una base compuesta de Phospholipon 90H, propilenglicol, alcohol (5.94%), acetato de vitamina E, cloruro de bencetonio y agua purificada.

La eficacia clínica de esta formulación ha sido reportada por diferentes autores. Bertone y colaboradores (2002) reportaron mejoras clínicas estadísticamente significativas tras 5 días de administración. Sin embargo el tamaño

de la muestra del estudio fue muy pequeño (n=5) considerando que no se aplico un un modelo de inflamación experimental sino, casos clínicos articulares crónicos de diversa gravedad y localización. Asimismo, la evaluación aplicada fue exclusivamente clínica (grado de claudicación, dolor y movilidad articular), sin corrección de datos basales.

Otro estudio clínico ha sido reportado por Schleining y colaboradores (2008). Este consistió en la administración tópica de la formulación de diclofenac a base de liposomas en caballos con carpitis inducida por anfotericina B. Desafortunadamente. los autores no informan la dosis exacta aplicada y si bien reportan concentraciones de diclofenac en sinovia a la hora 24, luego de dos administraciones con un intervalo interdosis de 12 h, estas son extremadamente variables (3.36 ± 8.17 ng/ml). Es importante remarcar que en ese trabajo se reporta la detección de diclofenac en un sujeto del grupo no tratado. Asimismo, los autores no detectan inhibición de la síntesis de prostaglandina E2 en líquido sinovial ni mejoría en la sintomatología clínica.

En el estudio realizado por Frisbie y colaboradores (2009) se reporta la eficacia clínica de Surpass® en un modelo experimental de osteoartritis tras su aplicación a la dosis de 7.3 g cada 12h . Los autores reportan concentraciones sinoviales de diclofenac de 8 ng/ml con ausencia de inhibición de la síntesis de PGE2. Aún así, de manera sorprendente, los autores reportan una mejoría clínica (evaluada a través del grado de claudicación) equivalente a la obtenida tras la administración oral de 2g de pasta oral de fenilbutazona.

Con respecto a la capacidad de penetración de Surpass® existe un único estudio, cuyos resultados son controversiales debido al modelo experimental

aplicado. El mencionado estudio reportado por Caldwell y colaboradores (2004) aplica un modelo de inflamación de cajas tisulares implantadas subcutáneamente y estimuladas con carragenina, mensurándose las concentraciones de diclofenac en función del tiempo en el exudado inflamatorio. Los autores concluyen que diclofenac se absorbe fácilmente por vía transdérmica. Sin embargo, el modelo experimental aplicado no es el apropiado para el estudio de la absorción transdérmica de fármacos, ya que la piel por encima de las cajas está estirada y adelgazada, lo que modifica la actividad de barrera del estrato córneo con la consecuente mayor penetración del principio activo.

Villarino y colaboradores (2006) estudiaron el efecto clínico de una formulación diseñada para humanos (Atomo Geldic, laboratorio IMVI, Argentina) en equinos con una artritis endotóxica experimental. Estos autores reportan bajas y muy variables concentraciones sinoviales de diclofenac (80 ± 80 ng/ml) tras la administración de una dosis de 0.52mg/cm^2 cada 8h. Asimismo, no se detectó un grado significativo de inhibición en la síntesis de PGE2 ni mejoría evidente de los signos clínicos de artritis (Villarino y col., 2006).

En un estudio relacionado, Villarino (2006), se demostró que la falta de eficacia de la formulación Atomo Geldic era consecuencia de la incapacidad de la misma de atravesar el estrato córneo. De hecho, la eliminación del mismo por métodos físicos provoco un aumento cercano al 100% en el flujo de penetración.

Las 8 formulaciones ensayadas en el presente trabajo de tesis mostraron una cinética de liberación de principio activo similar. Todas ellas siguieron una cinética de liberación de tipo Higuchi (Higuchi, 1962), lo que era esperable debido a que el principio activo se hallaba suspendido en la formulación. Asimismo, se observó la

ausencia de interacciones fuertes entre el principio activo y los componentes de la formulación (incluidos los aumentadores de la penetración).

Una apropiada liberación del principio activo y el correcto contacto del mismo con los estratos más superficiales de la epidermis representan el paso inicial y limitante para la penetración y, por ende, de la eficacia de una formulación farmacéutica de aplicación epicutánea (Rougier y col., 1999; Kalia y Guy 2001; Mohammed, 2001). Es importante tener en cuenta, que solo la fracción disuelta de la droga en el vehículo, puede tomar contacto con los estratos superficiales de la epidermis y penetrar la piel (Kreilgaard, 2002). Por lo tanto las propiedades de solubilidad/ disolución de la droga en el vehículo representan un factor determinante para la penetración de un fármaco (Kreilgaard, 2002).

La falta de diferencias entre las 8 formulaciones ensayadas en el proceso de liberación sugiere que este proceso no es la causa principal de las diferencias observadas en la permeación de diclofenac dietilamina a través de la piel equina.

La difusibilidad de una droga a través de la piel y el tiempo necesario para que una molécula la atraviese, está determinado por sus propiedades fisicoquímicas y por la interacción con esta barrera (Naik y col., 1999), siendo el estrato córneo el principal determinante de la cantidad y ritmo de penetración de un fármaco (Naik y col., 1999). El estrato córneo es una biomembrana heterogénea relativamente delgada (8-10um) (Riviere y Papich, 2001) que representa una de las barreras más eficientes del organismo (Scheuplein y Blank 1971; Kligman 1964; Ramachandran y Fleisher, 2000; Barry, 2002; Bouwstra y col., 2001).

Son varios los factores que intervienen en la penetración transepitelial de drogas (Magnusson y col., 2001) incluyendo el grosor de la piel, densidad de los folículos pilosos y el flujo sanguíneo local (Ramachandran y Fleisher. 2000). Sin embargo, la conservación de la estructura del estrato córneo es una de las variables más importantes que determinan el pasaje de las drogas a través de la piel (Ferrante y col., 2008).

El método para el estudio de penetración in vitro de fármacos a través de la piel utilizando las celdas de Franz fue validado en 1978 (Franz, 1978). Este método ha sido reportado en la evaluación de AINEs y glucocorticoides administrados tópicamente en equinos (Villarino, 2006; Mills y Cross, 2006; Mills, 2007). De hecho es uno de los métodos más aplicados para el estudio y validación de nuevas formulaciones tópicas de fármacos en la mayoría de las especies (Bonina, 2001; Nokhodch ycol., 2002; Higaki y col., 2005; Jacobi y col., 2005; Mukherjee y col., 2005; Escribano. Y col., 2003).

Existen reportes sobre la importante variación inter-individuo en los estudios de penetración in vitro (Southwell y col., 1984; Larsen y col., 2003). En el presente estudio, la utilización de piel del mismo equino permitió minimizar esta fuente de variación.

En el presente estudio, 3 de las sustancias ensayadas (acido oleico, urea y limonene) como aumentadores de la permeabilidad, cumplieron (en mayor o menor cuantía) su objetivo.

El efecto aumentador de los ácidos grasos sería reflejo de su capacidad para alterar la matriz y el orden de los lípidos del estrato córneo (Ongpipattanakul y col.,

1991; Jiang y Zhou, 2003). Takahashi y colaboradores (1995) reportan un flujo de penetración más alto cuando diclofenac sódico es formulado con ácido oleico en concentraciones más bajas que las utilizadas en el presente estudio. Sin embargo, en su estudio los autores utilizaron piel de rata, que tiene más folículos pilosos que la piel de caballos y carece de glándulas sudoríparas (Smith y col., 1990).

El aumento de la penetración de fármacos a través de la piel inducido por la urea es consecuencia de su capacidad de aumentar la permeación del agua lo que conduce a la expansión de los espacios intercelulares y de los corneocitos, con la consecuente reducción del efecto barrera del estrato córneo (Menon y col., 1998). Shah y colaboradores (2006) reportan un flujo de penetración de diclofenac similar al reportado por nosotros, pero utilizando concentraciones de urea inferiores a la utilizada en el presente estudio. Esta diferencia podría deberse a la utilización de piel de conejos sin pelo. Se ha informado que la piel sin pelo tiende a ser más delgada, tiene menor número de capas en el estrato córneo y, por tanto, proporciona una barrera ligeramente inferior a la penetración de la mayoría de las moléculas (Spencer, 1997).

Excipientes tales como etanol o propilenglicol incrementan la difusión de fármacos a través de la piel por la alteración de la organización de los lípidos del estrato córneo (Mitragotri, 2000). El sinergismo entre ácido oleico y propilenglicol ha sido reportado para otros AINEs como tenoxicam (Larrucea y col., 2001). En nuestro estudio, no se observó evidencia de sinergismo en ninguna de las combinaciones propilenglicol-ácido oleico ensayadas. Este resultado no coincide con lo reportado por Kim y Hea-Jong (2008) quienes reportan un sinergismo entre propilenglicol y ácido oleico en la permeación de diclofenac a través de piel de rata. Sin embargo,

existen diferencias entre los estudios, por un lado el uso de piel de otra especie y, quizás la diferencia mayor, las concentraciones de propilenglicol utilizadas por Kim y Hea-Jong que son de 100% (diclofenac es disuelto en propilenglicol).

El efecto aumentador de la penetración inducido por terpenos, como el limonene, sería consecuencia de su capacidad de formar puentes de hidrógeno con los grupos amida de los lípidos del estrato córneo y por lo tanto romper la red de enlaces de hidrógeno inter e intra-lamelares de los lípidos del estrato córneo, lo que lleva alteración de la integridad y disminución en la función de barrera (Narishetty y Panchagnula 2004). En el presente trabajo de tesis el mayor efecto aumentador de D-limoneno fue observado a la concentración más baja estudiada (5%). Un hallazgo similar fue reportado previamente por Nokhodchi y colaboradores (2007); estos autores observaron que la absorción percutánea de diclofenac en piel de ratas aumentaba de forma proporcional a la concentración del terpeno hasta un máximo, tras lo cual la penetración disminuía. Esto también ha sido reportado para otras drogas, como el propofol formulado con ácido oleico o terpenos (Yamato y col., 2009) y valsartán en combinación con los terpenos (Rizwan y col., 2008).

Una tendencia similar se observa para la actividad de la mejora de la penetración de los tensioactivos, en la que se atribuye la concentración óptima a la concentración micelar crítica de surfactantes (Shokri y col., 2001; Nokhodchi y col., 2003).

Los aumentadores ensayados demostraron capacidad para incrementar la cuantía y velocidad de pasaje de diclofenac a través de la piel equina. Es importante tener en cuenta, que desde el punto de vista clínico no solo sería relevante un aumento en la cuantía de la penetración del fármaco, sino también en la velocidad

de este pasaje, reflejado por la disminución del tiempo lag. La marcada disminución del tiempo lag permitiría obtener una respuesta clínica más rápida, lo cual sería muy importante en la terapéutica de procesos inflamatorios agudos (Villarino, 2006). En el presente estudio no se encontraron diferencias significativas en el T lag entre las formulaciones ensayadas. Sin embargo, debido a que transcurrido el T lag el flujo de penetración alcanza un estado estacionario, el impacto de su disminución solo sería evidente en la primera aplicación.

Es importante remarcar que, si bien existen métodos físicos que aumentan la penetración de los fármacos aplicados tópicamente, entre ellos la iontoforesis y electroporación (Benson, 2005), estos son caros y desde el punto de vista de la práctica clínica equina, poco aplicables.

La respuesta biológica/farmacológica es uno de los métodos in vivo más importantes para evaluar la penetración/absorción de un fármaco aplicado epicutaneamente (Wester y Maibach, 1999).

Existen reportes sobre el uso de carragenina como irritante para el estudio de la respuesta inflamatoria (Calixto y col., 2004), así como, para el estudio del efecto antiedematoso (antiinflamatorio) de formulaciones de aplicación epicutánea de AINEs en ratas (Shin y col., 2000; Larson y Lombardino 1980). En esta especie este modelo es ampliamente aceptado para la evaluación in vivo de formulaciones transdermales de AINEs desarrolladas para uso en humanos (Sosa et. al., 2002; Escribano y col., 2003). Su aplicación en veterinaria es menos común, fundamentalmente por la baja tasa de desarrollo de formulaciones tópicas para uso exclusivo en animales. Aun así, su aplicación para la evaluación de la eficacia de

AINEs ha sido reportada en bovinos (King 1993; Landoni y col., 1995) y equinos (Marr y col., 1998; Auer y Seawright. 1990; Villarino, 2006; Ferrante y col., 2008).

El modelo de administración intradérmica de carragenina permite evaluar el efecto antiedematoso mediante la comparación del volumen de lesión de cada sitio tratado respecto del sitio control en un mismo animal (Landoni, 1995), lo que en nuestro estudio fue utilizado para inferir el grado de penetrabilidad del diclofenac.

A diferencia del modelo de cajas tisulares utilizado por Caldwell y col (2004) para evaluar la eficacia de la aplicación tópica de una formulación de diclofenac para uso en equinos, el modelo de inyección intradérmica de carragenina no altera la piel del sitio de aplicación de la formulación a evaluar, por lo que es modelo de especial elección para la evaluación de formulaciones tópicas.

Existen otros irritantes utilizados para inducir edema tras su administración intradérmica, como dextrano o zimozano. Sin embargo, a diferencia de estos últimos, carragenina en las sucesivas reinyecciones no modifica la magnitud de la respuesta (Landoni, 1995). Este hecho pudo ser confirmado en nuestro estudio donde la variación del volumen de lesión no presentó modificaciones en la respuesta inflamatoria local en los sucesivos días de trabajo. Este característica se debería a que carragenina induce una reacción edematosa mediante mecanismos de inmunidad innata sin memoria (King, 1993).

Cabe destacar que una importante variabilidad inter-individuo (>50 %) en la penetración transepitelial de diclofenac ha sido reportada en diferentes especies (Mueller y col., 1997; Mueller y col., 1998), incluyendo la equina (Caldwell et., al 2004). Esta variación, como es esperable, se refleja en la respuesta terapéutica

(Bertone y col., 2001). Basado en esto y en función de los objetivos planteados, la variabilidad inter-individuo fue neutralizada aplicando los diferentes tratamientos simultáneamente en el mismo animal, replicando la prueba en seis animales. El análisis de los volúmenes de lesión del los sitios controles arrojó una variación INTER-ANIMAL del 34% y una variación INTER-DIA de entre 41-53%. Estos resultados demuestran la menor variación del presente modelo comparado con otros utilizados en equinos (Caldwell y col., 2004) y reafirma la buena reproducibilidad del mismo. Esta buena reproducibilidad hace que sea un modelo de elección no solo para las formulaciones de aplicación epicutánea, sino también para formulaciones de administración sistémica.

La inyección intradérmica de 0.1 ml de carragenina al 0.25 % indujo en todos los sitios de inyección, una reacción inflamatoria reproducible, de corta duración, severidad leve y evolución benigna. No observándose efectos adversos asociados a la administración de ninguna de las formulaciones estudiadas.

El análisis del volumen de lesión, en los sitios de inyección, tras la administración cada una de las formulaciones indicó que todos los tratamientos fueron capaces de disminuir en mayor o menor grado el volumen de lesión.

Los valores de porcentaje de inhibición del volumen de lesión post-carragenina obtenidos permiten inferir que la incorporación de los aumentadores determinó un aumento in vivo de la penetración de diclofenac, demostrando la existencia de una buena correlación con los parámetros de penetración obtenidos in vitro a través de las celdas de tipo Franz. Este hecho concuerda con los reportes de Moretti y col., (2000) con ketoprofeno y los de Özgüney y col., (2006) con diclofenac,

en ratas y los de Villarino, (2006) en equinos donde se reporta la alta correlación in-vivo/in vitro.

Como se mencionó anteriormente, los resultados obtenidos in vitro se vieron reflejados claramente en el estudio antiedematoso. Ambos resultados indican claramente que la incorporación de ácido oleico, urea o D-limoneno representan alternativas para aumentar la penetración de diclofenac tras la aplicación epicutánea en la especie equina. El análisis detallado de los resultados permitió identificar las diferencias en los efectos de cada uno de ellos.

La formulación de urea 10% mostró un alto grado de variabilidad tanto el flujo de penetración (evaluado in vitro) como el efecto antiedematoso (evaluado in vivo). Esta variación podría ser consecuencia de su mecanismo de acción, expansión de los corneocitos y espacios intercelulares por aumento de la penetración de agua, lo cual es altamente influenciado por el grado de hidratación de la piel (Menon y col., 1998).

El efecto aumentador de D-limoneno del flujo de penetración in vitro fue mayor para su menor concentración (D-limoneno 5%), sin embargo en este caso la variabilidad del efecto fue del doble (CV 88%) respecto de la concentración mayor (D-limoneno 10%) con CV de 43%. La evaluación in vivo de las formulaciones con D-limoneno demostró que la formulación al 5% presentó una variabilidad muy alta con prácticamente nulo efecto antiedematoso mientras que, la formulación al 10% presentó un efecto antidematoso de magnitud y variabilidad correlacionado con los resultados obtenidos in vitro. El análisis en conjunto de estos resultados indica que para los terpenos, la formulación de mayor concentración es de elección para inducir

un efecto aumentador de la penetración de diclofenac clínicamente detectable en equinos.

La formulación con ácido oleico 15% fue una de las tres formulaciones que presento mayor flujo de penetración in vitro (junto con la formulación con urea 10% y D-limoneno 5%), su principal ventaja respecto de las restantes formulaciones fue su menor variabilidad de efecto. Al observar los resultados del estudio antiedematoso, es posible concluir que la formulación posee un potente efecto antiinflamatorio de muy baja variabilidad. El importante y reproducible efecto aumentador de ácido oleico observado sería consecuencia de su mecanismo de acción, el cual se basa en la capacidad de esta sustancia de interactuar con los dominios lipídicos del estrato córneo modificando su estructura y alterando su acción de barrera (Ognipattanakul, 1991).

Es ampliamente aceptado que la elección de un aumentador de la penetración no es simple y debe ser basada no solo en el grado del efecto producido sino también en la reproducibilidad del mismo (Williams y Barri, 2004). Basado en estos postulados, la formulación de ácido oleico 15% fue seleccionada para su evaluación utilizando el modelo de artritis aguda inducida por LPS.

El efecto clínico de un antiinflamatorio no esteroideo en un modelo experimental de artritis aguda, que emula la presentación clínica de la enfermedad, depende de su capacidad de acceder al sito de acción o sea, a la biofase. El acceso del principio activo tras la administración sistémica depende de su absorción a la circulación sistémica y su posterior distribución en el organismo. Sin embargo, tras la administración epicutánea la concentración de diclofenac en el sitio de acción es la resultante de diferentes procesos que ocurren en simultáneo, siendo los principales

la liberación desde la formulación, el flujo de penetración a través de la piel, y el clearence tisular (lavado, difusión y metabolismo). Por tanto, las concentraciones en el sitio de acción serán más altas cuanto mayor sea el flujo de penetración respecto del clearence tisular (Roberts y Cross, 1999).

Tanto el flujo de penetración como el clearence tisular están muy relacionados con la estructura anatómica del sitio de aplicación. Diferencias regionales en la penetración de fármacos aplicados de forma tópica serían consecuencia de la variación en el grosor de la piel (Lloyd y Garthwaite, 1982; Monteiro y Riviere, 1990; Auxilia y Hill, 2000) y la composición del estrato córneo (Mc Ewan y col., 2009) entre las diferentes áreas anatómicas. Otra variable que puede contribuir a las diferencias regionales es la variación en la densidad de los apéndices cutáneos (Riviere y Papich, 2001) y el flujo sanguíneo local (Monteiro y Riviere, y col., 1990).

Varios modelos experimentales han sido utilizados en la especie equina, tanto para el estudio de los fenómenos fisiopatológicos de la artritis como para la evaluación del efecto de diferentes tipos de drogas, incluyendo antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y drogas modificadoras de la osteoartritis DMOADS (McIlwraight, 2005).

Los modelos de inflamación articular experimental son numerosos, los hay de tipo físico (inmovilización) (Palmoski y col., 1979), quirúrgico (Verde y col., 2006) y químicos. Estos últimos difieren en el tipo de irritante utilizado; entre los más comunes se incluyen, carregenina (Owens, 1995), monoiodoacetato de sodio, (Welsh y col., 1991) adjuvante de Freund (Tew, 1982; Botrel 1994; Pozzobon y col., 2008) y anfotericina B (Suominen y col., 1999). Sin embargo, el modelo de artritis endotóxica, inducido con la inyección intraarticular de lipopolisacaridos bacterianos

(LPS), es el más estudiado. (Palmer y Bertone, 1994; Palmer y col., 1996; Firth 1987; Todhunter, 1998, Hawkins, 1993; Morton y col., 2005; Verde y col., 2001; Campbell y col., 2004; Villarino, 2006).

El modelo experimental de inflamación inducido por LPS (lipopolisacárido de Escherichia coli O55:B5) fue descripto por Palmer y Bertone (1994). Se caracteriza por provocar una lesión aguda de evolución benigna y reversible que permite, tras un periodo de lavado (wash out), la utilización del mismo animal experimental o sea, que es aplicable a diseños cross-over.

Si bien el modelo inflamatorio experimental agudo utilizado en el presente estudio es un modelo reproducible, la respuesta inflamatoria desencadenada en cada animal es dependiente de la respuesta individual al estímulo aplicado (Palmer y Bertone 1994; Hawkins y col., 1993), lo cual es una fuente de variación a considerar en el diseño experimental (Verde y col., 2005; Owens y col., 1996, Villarino, 2006). Esta variabilidad individual, será reflejada directamente en los diferentes parámetros clínicos utilizados para evaluar la acción antiinflamatoria de la formulación.

A efectos de modular la variación individual en la respuesta al estímulo inflamatorio aplicado, se utilizó un diseño de cross-over, el cual tiene la ventaja de permitir que cada animal sea su propio control. Se estableció un tiempo de dos semanas entre cada etapa para asegurar la ausencia de efecto carry-over (Verde y col., 2005).

La evaluación clínica de los procesos inflamatorios a nivel articular utiliza rutinariamente los siguientes parámetros clínicos: largo del paso, circunferencia carpiana, ángulo en estación, ángulo en flexión forzada y temperatura corporal

(Stashak 2004; Trotter y McIlwraith 1996, Verde y col., 2005; Pozzobon y col., 2008). La modificación cuali/cuantitativa de estos parámetros es aceptada como subrogante de la acción farmacológica de los compuestos antiinflamatorios y antiartríticos (White y col., 2004; Hanson y col., 1997). Por lo tanto, el análisis del perfil temporal de los cambios de cada uno de estos parámetros clínicos en los animales experimentales permitió evaluar la acción antiinflamatoria de diclofenac dietilamina formulado para aplicación epicutánea en equinos, a la dosis de 1.0 mg/cm²/6h.

Coincidiendo con lo publicado por otros autores, quienes utilizaron modelos de artritis endotóxica para evaluar la acción antiinflamatoria de AINEs (Verde y col., 2001; Blikslager 2005; Palmer y Bertone, 1994; Palmer y col., 1996; Firth y col., 1987; Todhunter y col., 1998; Morton y col., 2005; Hawkins y col., 1993; Smith y col., 1998. Villarino, 2006), la inyección intracarpiana de LPS (0.01ug/kg) indujo, en todos los animales, una reacción inflamatoria reproducible, de corta duración, severidad mediana y evolución benigna. El análisis de los perfiles temporales de los parámetros clínicos coincide de manera completa con los reportados, indicando claramente que el modelo endotóxico funcionó de manera correcta.

La valoración del grado de dolor en animales domésticos es muy difícil (Anill y col., 2002). Sumado a esto, la manifestación del dolor es altamente variable entre individuos, aun cuando pertenezcan a la misma población. La utilización de modelos experimentales que permitan a cada individuo ser su propio control es de gran utilidad para neutralizar esta fuente de variación. Con el modelo de inyección de LPS utilizado fue posible evaluar el efecto analgésico permitiendo que cada animal sea su propio control (Verde y col., 2006).

En los diferentes reportes de estudios realizados con el modelo de LPS es posible observar una correlación en los perfiles temporales entre los parámetros clínicos indicadores de la inflamación, los cuales luego de una fase aguda inicial retornan, a distintas velocidades, a sus valores basales (Verde y col.,. 2005; Villarino, 2006; Pozzobon y col., 2008). En el presente estudio, el orden de retorno fue : el ángulo en estación, luego el largo de paso y por último, el ángulo en flexión, lo que indica el grado de sensibilidad de cada parámetro para cuantificar dolor inflamatorio.

El presente estudio permitió identificar una asociación entre los cambios en los parámetros clínicos y la administración de diclofenac.

La administración de LPS a la dosis de 0.01ug/kg, no indujo cambios sistémicos en ninguno de los animales experimentales. A dosis mayores, 0.1 µg/ml, se reportan efectos sistémicos clínicamente detectables como, taquicardia, hipotensión y aumento de la temperatura corporal (Firthec y col., 1987). En el presente estudio no se observaron aumentos estadísticamente significativos de la temperatura corporal, en consonancia a lo reportado previamente por Palmer y Bertone (1994).

La evaluación cuantitativa del largo de paso a través del método de caminata sobre una cinta de papel demostró ser altamente precisa, con coeficientes de variación intradía de entre 1,4% y 4,3% y una interdia de entre 2,1% y 3,5%. Es interesante remarcar que se observó, tanto para el grupo tratado como para el control, un aumento en el largo de paso a medida que transcurría el estudio; la comparación entre grupos no mostró diferencias significativas.

La manifestación de dolor a través del ángulo en estación solo fue evidente en el momento agudo inicial y en solo 2 de los 4 animales experimentales. Contrariamente, el ángulo en flexión mostró un claro aumento (manifestación de la presencia de dolor) en la totalidad de los animales y por un periodo de tiempo prolongado. Esta observación concuerda con los reportes de otros autores (Verde y col.,. 2005; Villarino 2006; Pozzobon y col., 2008) y evidencia la utilidad de la flexión máxima como método diagnóstico para la evaluación del dolor articular en equinos, así como, la eficacia analgésica de la formulación ensayada.

Para que la eficacia de un fármaco pueda ser clínicamente evidente es necesario que exista una diferencia significativa en los valores del parámetro evaluado a tiempo t y el valor basal registrado. Cuanto mayor sea esta diferencia mayor será la posibilidad de demostrar la eficacia clínica del fármaco (Nakagawa y Cuthill, 2007).

En nuestro estudio, el ángulo en flexión fue el único parámetro que se diferenció ampliamente de su valor basal. Esta podría ser la razón por la que evidencia claramente la eficacia de la formulación. El efecto analgésico observado permite inferir que la formulación posee la capacidad de liberar diclofenac mejorando la penetración, lo que conduce a su acumulación en concentraciones superiores a la efectiva para la inhibición de ciclooxigenasa a nivel de la biofase o zona de acción.

5 .- CONCLUSIONES

Este es el primer estudio de los efectos de los aumentadores de la penetración in vitro de diclofenac dietilamina a través de la piel equina.

En este estudio el análisis comparativo de los cambios farmacodinámicos demostró la autenticidad de los resultados obtenidos en los estudios in vitro.

La mayor actividad antiedematosa estuvo correlacionada con el mayor flujo de penetración.

En función de los resultados obtenidos, es posible concluir que los estudios de penetración in vitro con piel equina permiten predecir la penetración de la piel in vivo en equinos, resultando una excelente alternativa para la selección de los aumentadores óptimos de una formulación.

Los hallazgos sugieren que el ácido oleico, la urea y el D-limoneno son útiles para incrementar la absorción transdérmica del diclofenac dietilamina a través de la piel de equinos.

Entre los aumentadores de la penetración estudiados en el presente trabajo de tesis, el ácido oleico al 15% mostró el mayor efecto de mejora; Asimismo, la urea al 10% de urea y el D-limoneno al 5% también indujeron un aumento significativo en la penetración.

Los resultados indican que la formulación transdérmica de diclofenac dietilamina conteniendo 15 % de acido oleico posee un flujo de penetración suficiente como para generar un efecto antiedematoso y analgésico clínicamente evidente en equinos.

6.- BIBLIOGRAFIA

1. Adebowale A, Du J, Liang Z, Leslie J, Eddington N. (2002). The bioavailability and pharmacokinetics of glucosamine hydrochloride and low molecular weight chondroitin sulfate after single and multiple doses to beagle dogs. Biopharmaceutics and Drug Disposition ;23 :217-225.

2. Akomeah F, Nazirb T, Martin G, Brown M. (2004). Effect of heat on the percutaneous absorption and skin retention of three model penetrants. European Journal of Pharmaceutical Sciences ;21 (2-3):337-345.

3. Anderson D, Kollias-Baker C, Colahan P, Keene R, Lynn R, Hepler D. (2005). Urinary and serum concentrations of diclofenac after topical application to horses. Veterinary Therapeutics ;5 (1):57-66.

4. Anil SS, Anil L, Deen J. Challenges of pain assessment in domestic animals. J Am Vet Med Assoc. 2002 Feb 1;220(3):313-9.

5. Auer D, Seawright A. (1990). Copper salicylate and copper phenylbutazone as topically applied anti-inflammatory agents in the rat and horse. J Vet Pharmacol Ther. ;13 (1):67-75.

6. Aungst B, Blake J, Hussain M. (1990). Contributions of drug solubilization, partitioning, barrier disruption, and solvent permeation to the enhancement of skin permeation of various compounds with fatty acids and amines. Pharmacology Research ;7 (7): 712-718.

7. Aungst BJ. Structure effect studies of fatty acid isomers as skin penetration enhancers and skin irritant. Pharm Res 1989; 6:244-247.

8. Auxilia, S.T. and Hill, P.B. (2000). Mast cell distribution, epidermal thickness and hair follicle density in normal canine skin: possible explanations for the predilection sites of atopic dermatitis? Veterinary Dermatology, 11(4), 247-254.

9. Barry B. (2001). Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. European Journal Pharmaceutical Science ;14 (2):101-114.

10. Barry B. (2002). Drugs Delivery Routes in Skin: a novel approach. Advance Drug Delivery Reviews ;54 (1):31-40.

11. Barry B. (2004). Breaching the skin´s Barrier to drugs. Nature Biothechnology ;22 (2):165-167.

12. Barry BW, Woodford R. Proprietary hydrocortisone creams. Vasoconstrictor activities and bioavailabilities of six preparations (1976). Br J Dermatol. 95(4):423-5.

13. Bashir S, Maibach H. (1999) Cutaneous Metabolism of Xenobitics. 3rd ed. New York: Marcel Dekker,

14. Benson H. (2005). Transdermal Drug Delivery: Penetration Enhancement Techniques. Current Drug Delivery ;2 (1):23-33.

15. Bertone J, Lynn R, Vatistas N, Kelch W, Sifferman R, Helper D. Clinical field trial to evaluate the efficacy of topically applied diclofenac liposomal cream for the relief of joint lameness in horses. 2002.

16. Bigg H, Rowan A. (2001). The inhibition of metalloproteinases as a therapeutic target in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Current Opinion in Pharmacology ;1 (3):314-320.

17. Blikslager A, Jones S. (2005). NSAIDs. Journal of Equine Veterinary Science ;25 (3):98-102.

18. Bonina P, Puglia C, Barbuzzi T, et al. (2001). In vitro and in vivo evaluation of polyoxyethylene esters as dermal prodrugs of ketoprofen, naproxen and diclofenac. European Journal of Pharmaceutical Science ;12 (2):123-134.

19. Bookman A, Willams K, Shaihouse J. (2004). Effect of topical diclofenac solution for relieving symptoms of primary osteoarthritis of the knee: a randomized controlled trial. Canadian Medical Association Journal ;171 (4):333-338.

20. Botrel MA, Haak T, Legrand C, Concordet C, Chevalier R, Toutain P. (1994). Quantitative evaluation of an experimental inflammation induced with Freund's Adjuvant in dogs. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods 32 (2):63-71.

21. Bouwstra J, Honeywell--Nguyen PL. (2002). Skin structure and mode of action of vesicles. Advanced Drug Delivery Reviews ;54 (1):S41-S55.

22. Bouwstra J, Pilgram G, Gooris G, Koertn H, Ponec M. (2001). New aspects of the skin barrier organization. Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology ;14 (Suppl 1):52-62.

23. Bouwstraa JA; Honeywell-Nguyena PL;Goorisa GS;Ponecb M; (2003) Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. Progress in Lipid Research 42 (2003) 1–36.

24. Bronaugh R, Kraeling M, Yourick J, Hood H, Maibach H. Cutaneous Metabolism of Drugs. In Vitro Percutaneous Absorption. 3rd ed. New York: Marcel Dekker, 1999.

25. Brooks P, Emery P, Evans JF, et al. (1999). Interpreting the clinical significance of the differential inhibition of ciclooxgenasa-1 and ciclooxigenasa-2. Rheumatology ;38 (8):779-788.

26. Brzozowski T, Konturek P, Konturek S, Brzozowska I, Pawlik T. (2005). Role of prostaglandins in gastroprotection and gastric adaptation. Journal of Physiology and Pharmacology. ;56 (5):33-55.

27. Caldwell F, Mueller E, Lynn R, Budsberg S. (2004). Effect of topical application of diclofenac liposomal suspension on experimentally induced subcutaneous inflammation in horses. American Journal of Veterinary Research. ;65 (3):271-276.

28. Calixto J, Medeiros R, Fernandes E, Ferreira J, Cabrini D, Campos M. (2004). Kinin B1 receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. British Journal of Pharmacology ;143 :803-18.

29. Caron D, Queille-Roussel C, Shah V, Schaefer H. (1990). Correlation between the drug penetration and the blanching effect of topically

applied hydrocortisone creams in human beings. Journal of the American Academy of Dermatology ;23 (3):458-462.

30. Caron J. Non-steroideal Antiinflamatory Drugs. 46th Annual Convention 2000, San Antonio, Texas, Usa: 243-249.

31. Carr D, Goudas L. (1999). Acute pain. The Lancet ;353 (9169):2051-2058.

32. Chandrasekharan, N.V.; Dai,H.; Roos,K.; Evanson, N.K.; Tomsik,J.; Elton, T.S.; Simmons D.L.; Cox-3 Cyclooxygenas1 variant inhibit by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drug: cloning, structure and expression. 2002: 13926-13931.

33. Cohen J. (2002). Insight on inflammation: The inmmunopathogenesis of the sepsis. Nature ;420 (26):485-491.

34. Collins LG, Tyler DE.J Am Vet Med Assoc. 1984 Mar 15;184(6):699-703.Phenylbutazone toxicosis in the horse: a clinical study.

35. Colville-Nash P, Gilroy D. (2001). Potential adverse effects of cyclooxygenase-2 inhibition: evidence from animal models inflammation. Biodrugs ;15 (1):1-9.

36. Cooper, E.R., Merrit, E.W., Smith, R.L. Effect of fatty acids and alcohols on the penetration of acyclovir across human skin in vitro, J. Pharm. Sci. 74 (1985) 688.

37. Curtis C, Harwood J, Dent C, Caterson B. (2004). Biological basis for the benefit of nutraceutical supplementation in arthritis. Drug Discovery Today ;9 (4):165-172.

38. DeWith D, Smith W. Primary structure of Prostaglandin G/HSyntetase from sheep vesicular gland determined from the complementary DNA sequence. 1988: 1412-1416.

39. Elias P. (1989). The stratum corneum as an organ of protection: old and new concepts. Curr Probl Dermatol. ;18 :10-21.

40. Escribano E, Calpena A, Queralt J, Obachant R, Domenech J. (2003). Assessment of diclofenac permeation with different formulations: anti-inflammatory study of a selected formula. European Journal of Pharmaceutical Sciences ;19 (4):203-210.

41. Feldmann R, Maibach H. (1967). Regional variation in percutaneous penetration of 14C cortisol in man. Journal of Investigative Dermatological ;48 (2):181-3.

42. Ferrante, M., Villarino, NF., Andreeta A., Landoni MF., (2008). Impacto de la Remoción del Estrato Córneo sobre la Penetración de Diclofenac a Través de Piel Equina. Lat. Am. J. Pharm. 27 (2): 185-190

43. Firth E, Wensing T, Seuren F. (1987). An induced synovitis disease model in ponies. Cornell Vet. ;77 (2):107-118.

44. Franz T. (1975). Percutaneous absorption. On the relevance of in vitro data. Journal of Investigative Dermatology ;64 (3):190-195.

45. Franz T. (1978). The finite dose technique as a valid in vitro model for the study of percutaneous absorption in man. Current Problems in Dermatology ;7 :58-68.

46. Frean S, Lees P. (2000). Effect of polysulfated glycosaminaglycan and hyaluronan on prostaglandin E2 production by cultured equine synoviocytes. American Journal of Veterinary Research ;61 (5):473-596.

47. Frisbie DD, McIlwraith CW, Kawcak CE, Werpy NM, Pearce GL. (2009) Evaluation of topically administered diclofenac liposomal cream for treatment of horses with experimentally induced osteoarthritis. Am J Vet Res;70(2):210-5.

48. Fuchs S, Skwara A, Bloch M, Dankbar B. (2004). Differential induction and regulation of matrix metalloproteinases in osteoarthritic tissue and fluid synovial. Osteoarthritis and Cartilage. ;12 (5):409-418.

49. Fujihara M, Muroi M, Tanamoto K, Suzuki T, Azuma H, Ikeda H. (2003). Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. Pharmacology and therapeutics; ;100 (2):171-194.

50. Funke AP, Schiller R, Motzkus HW, Gunther C, Muller RH, Lipp R. (2002) Transdermal delivery of highly lipophilic drug: in vitro fluxes of antiestrogen permeation enhancers, and solvents from liquid formation. Pharm Res; 19: 661-668.

51. Galer S, Rowbotham M, Perander J, Denvers A, Friedman E. (2000). Topical diclofenac patch relieves minor sports injury pain. Journal of Pain and Symptom Management ;19 (4):287-294.

52. Geneser F. Piel. Histología. Tercera ed. Buenos Aires: Editorial Medica Panamericana, 2000: 445-464.

53. Giuliano F, Warner TD. (2002). Origins of prostaglandin E: involvements of cyclooxygenase(COX)-1 and COX-2 in human and rats systems. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. ;303 (3):1001-1006.

54. Gloor M, Fluhr J, Wasik B, Gehring W. (2001). Clinical effect of salicylic acid and high dose urea applied according to the standardized New German Formulary. Pharmazie ;56 (10):810 - 814.

55. Goodrich L, Nixon A. (2006). Medical treatment of osteoarthritis in the horse. The Veterinary Journal ;171 (1):51-69.

56. Guy R, Hadgraft J. (1988). Physicochemical aspects of percutaneous penetration and its enhancement. Pharmaceutical Research ;5 (12):753-758.

57. Hadgraft J. (1996). Recent developments in topical and transdermal delivery. European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics ;21 (2):165-173.

58. Hamm D, Goldman L, Jones E. (1984). Polysulphated glycosaminoglycan: a new intra-articular treatment for equine lameness. Vet. Med ;6 :811-816.

59. Hanson R, Smaley L, Huff G. (1997). Oral treatment with glucosamine-chondroitin sulfate compound for degenerative joint disease in horses; 25 cases. Equine Practice ;19 :16-22.

60. Hawken C. (2001). COX1 and COX2 inhibitors. Best Practice and Research Clinical Gastroenterology ;15 :801-820.

61. Hawkins D, MacKay R, Gum G, Colahan P, Meyer J. (1993). Effects of intra-articularly administered endotoxin on clinical signs of disease and synovial fluid tumor necrosis factor, interleukin 6 and prostaglandin E2 values in horses. American Journal of Veterinary Research ;54 (3):379-383.

62. Hemler M, Lands W. (1976). Purification of the cyclooxygenase that forms prostaglandins. Demonstration of two forms of iron in the holoenzyme. Journal of Biological Chemistry ;251 (18):5575-5579.

63. Hendradi E, Obata Y, Isowa K, Nagai T, Takayama K. (2003). Effect of Mixed Micelle Formulations Including Terpenes on the Transdermal Delivery of Diclofenac. Biol Phar Bull. ;26 (12):1739-1743.

64. Higaki K, Nakayama K, Suyama T, Amnuaikit C, Ogawara K, Kimura T. (2005). Enhancement of topical delivery of drugs via direct penetration

by reducing blood flow rate in skin. International Journal of Pharmaceutics ;288 (2):227-233.

65. Hinz B, Brun K. (2002). Cyclooxygenase-2 20 Years Later. Cyclo-oxygenase-2: pharmacology, physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics ;300 (3):337-367.

66. Insel P. Agentes analgésicos-antipiréticos y antiinflamatorios: Drogas empleadas en el tratamiento de la artritis reumatoidea y la gota. In: Goodman & Gilman G., ed. Las bases farmacológicas de la terapéutica: Editorial Panamericana, 1991: 624-666.

67. Iñiguez M, Pablos J, Carreira F, Cabré F, Gomez-Reino J. (1998). Detection of COX- 1 and COX-2 isoforms in synovial fluid cells from inflammatory joint disease. British Journal of Rheumatology ;37 (7):773-778.

68. Jacobi U, Taube H, Schafer UF, Sterry W, Lademann J. (2005). Comparison of four different in vitro systems to study the reservoir capacity of the stratum corneum. Journal of Controlled Release ;103 (1):61-71.

69. Jain AK, Thomas NS, Panchagnula R. (2002) Transdermal drug delivery of imipramine hydrochloride. I. Effect of terpenes. J Control Rel 79: 93-101.

70. Janicke H, Taylor P, Bryant C. (2003). Lipopolysaccharide and interferon gamma activate nuclear factor kappa B and induce cyclo-oxygenase-2 in equine vascular smooth muscle cells. Research in Veterinary Science ;75 (2):133-140.

71. Jiang SJ, Zhou XJ. (2003). Examination of the Mechanism of Oleic Acid-Induced Percutaneous Penetration Enhancement: an Ultrastructural Study. Biol. Pharm. Bull. ;26 (1):66-68.

72. Johnson M, Blankschtein D, Langer R. (1997). Evaluation of solute permeation through the stratum corneum: lateral bilayer diffusion as the primary transport mechanism. J Pharm Sci. ;86 (10):1162-72.

73. Kalia Y, Guy R. (2001). Transdermal drug release. Advanced Drug Delivery Reviews ;48 (2-3):159-172.

74. Kamal M, Limura N, Nabekura T, Kitagawa S. (2007). Enhanced Skin Permeation of Diclofenac by Ion-Pair Formation and Further Enhancement by Microemulsion. Chem. Pharm. Bull. ;55 (3):368-371.

75. Kandimalla, K. K. Singh, M. (1998) Effect of fatty alcohols on the permeation of melatonin through rat skin. AAPS Annual Meeting, San Francisco, CA.

76. Karande P, Mitragotri S. (2002). High throughput screening of transdermal formulations. Pharmaceutical Research. ;19 (5):655-660.

77. Kidd J, Fuller C, Barr A. (2001). Ostearthritis in the horse. Equine Veterinary Education :204-216.

78. Kim, C.K., Kim, J.J., Chi, S.C. and Shim, C.K. (1993). Effect of fatty acids and urea on the penetration of ketoprofen through rat skin. Int. J. Pharm. 99: 109–118.

79. Kim. M.; Hea-Jeong. D. (2008) Skin Permeation Enhancement of Diclofenac by Fatty Acids Drug Delivery. 15:303–309.

80. King JN. (1993). The use of intradermal carrageenan in calves to estimate the dose of oxindanac, a nonsteroidal anti-inflammatory drug. Can J Vet Res. ;57 (4):215-22.

81. Kligman A. The biology of the Stratum Corneum. In: Montagna W, Lobitz W, eds. The Epidermis. 1 ed. New york and London: Academy Press, 1964: 387-430.

82. Kreilgaard M. (2002). Assessment of cutaneous drug delivery using microdyalisis. Advance Drug Delivery Reviews ;54 (1):99-121.

83. Krishna D, Surja Kumar J. (1991). HPLC determination of diclofenac sodium in human plasma. Ind. J. Pham. Sci ;5 :212-214.

84. Ku E, Himanshu W, Kothari H, Scholer D. (1986). Effect of diclofenac sodium on the arachidonic acid cascade. The American Journal of Medicine ;80 (4):18-23.

85. Kühn K, D'Lima D, Hashimoto S, Lotz M. (2004). Cell death in cartilage. Osteoarthritis and Cartilage ;12 (1):1-16.

86. Kujubu D, Fletcher B, Varnum B, Lim R, Herschman H. (1991). TIS 10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from, Swiss 3T3 Cells, encodes a novel prostaglandin syntetase/cyclooxigenase homologue. Journal of Biological Chemestry ;266 (20):12866-12872.

87. Landoni M, Lees P. (1995). Comparison of the anti-inflammatory actions of flunixin and ketoprofen in horses applying PK/PD modelling. Equine Veterinary Journal. ;27 (4):247-256.

88. Landoni M, Soraci A. (2001). Pharmacology of chiral compounds: 2-arylpropionic acid derivatives. Current Drug Metabolism ;2 (1):37-51.

89. Landoni M. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of non-steroidal anti-inflammatory drugs in horses and calves. PhD: University of London, 1995.

90. Larrucea A, Arellano A, Santoyo S, Ygartua P. (2001). Combined effect of oleic acid and propylene glycol on the percutaneous penetration of tenoxicam and its retention in the skin. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. ;52 :113-119.

91. Larson D, Lombardino J. (1980). The topical anti-inflammatory effects of piroxicam in rodents. Inflammation Research ;10 (3):246-51.

92. Lees P, Giraudel J, Landoni M, Toutain P. (2004). Pk-PD integration and Pk-PD modelling of non-steroidal anti-inflammatory drugs: principles and applications in veterinary pharmacology. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics ;27 (6):491-502.

93. Lees P, Landoni M, Giraudel J, Toutain P. (2004). Pharmacodynamics and pharmacokinetics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in species of veterinary interest. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics ;27 (6):479-490.

94. Lees P. (1999). Pharmacology and therapeutics of joint disease. APD Veterinary Medicine ;2 (1):18-26.

95. Lees P. (2003). Pharmacology of drugs used to treat osteoarthritis in veterinary practice. Inflammopharmacology ;11 (4-6):385-399.

96. Lippold, B.C. and Hackemuller, D., 1990. , The influence of skin moisturizers on drug penetration in vivo. Int. J. Pharm. 61, pp. 205–211

97. Lloyd DH, Garthwaite G. (1982)Epidermal structure and surface topography of canine skin.Res Vet Sci. 33(1):99-104.

98. Magnusson B, Walters K, Roberts M. (2001). Veterinary Drug Delivery: potential for skin penetration enhancement. Advance Drug Delivery Reviews ;50 (3):205-227.

99. Majno G. (1975)The healing hand: man and wound in the ancient world. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press.

100. Malkinson F. (1964) Permeability of the stratum corneum. In: Montagna W, Lobitz W, eds. The Epidermis: Academic Press., Inc. 435-452.

101. Marr K, Marsh K, Hernandez L, Cunningham F, Lees P. (1998). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of fenleuton, a 5-lipoxygenase inhibitor, in ponies. Res Vet Sci. ;64 (2):111-7.

102. McConnico RS, Morgan TW, Williams CC, Hubert JD, Moore RM. (2008) Pathophysiologic effects of phenylbutazone on the right dorsal colon in horses.Am J Vet Res. 69(11):1496-505.

103. McDougal J, Pollard D, Weisman W, Garrett C, Miller T. (2000). Assessment of skin absorption and penetration of JP-8 jet fuel and its components. Toxicol Sci. ;55 (2):247-55.

104. McEwan, N.A., Lu, Y.F. and Nuttall, T. (2009). A two-dimensional morphological study of corneocytes from healthy dogs and cats and from dogs with atopic dermatitis. Veterinary Dermatology, 20(5-6), 360-368

105. McIlwraith CW. (2005). Use of synovial fluid and serum biomarkers in equine bone and joint disease: a review. Equine Vet J 37, 473-482.

106. McIlwraith W, Friesbie D, Kawcak CE.(2001) Current treatments for traumatic synovitis, capsulitis and osteoarthritis. Proceedings of the Annual Convention of the AAEP, 2001: 180-206.

107. McIlwraith W. Licensed Medications, “Generic” Medications, Compounding, and Nutraceuticals—What Has Been Scientifically Validated, Where Do We Encounter Scientific Mistruth, and Where Are

We Legally? Proceedings of the Annual Convention of the AAEP, 2004: 459-476.

108. Menon G, Ghadially R. (1997). Morphology of lipid alterations in the epidermis: a review. Morphology of lipid alterations in the epidermis: a review ;37 :180-192.

109. Menon G. (2002). New insights into skin structure: scratching the surface. Advanced Drug Delivery Reviews ;54 (1):S3-S17.

110. Menon,G.K., Lee, S.H. (1998) Ultrastructural effects of some solvents and vehicles on the stratum corneum and other skin components: evidence for an ‘‘extended mosaic-partitioning model of the skin barrier’’, in: M.S. Roberts, K.A. Walters (Eds.), Dermal Absorption and Toxicity Assessment, Marcel Dekker, New York, Chapter 29.

111. Mills P, Cross S. (2006). Regional differences in the in vitro penetration of methylsalicylate through equine skin. The Veterinary Journal ;29 (1):25-30.

112. Mills P. (2007). Vehicle Effects on the In Vitro Penetration of Testosterone through Equine Skin. Vet Res Commun. ;31 (2):227-33.

113. Mills PC, Cross SE. (2006). Transdermal drug delivery: Basic principles for the veterinarian. The Veterinary Journal ;172 (2):218-233.

114. Mitchell JA, Akarasereenont P, Thiemermann C, Flower R, Vane J. (1993). Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. Proceedings Of The

National Academy Of Sciences Of The United States Of America ;90 (24):11693-11697.

115. Mitragotri S. (2000). Synergistic effect of enhancers for transdermal drug delivery. Pharm Res. 17 (11):1354-9.

116. Miyamoto T, Ogino N, Yamamoto S, Hayaishi O. (1976). Purification of prostaglandin endoperoxide synthetase from bovine vesicular gland microsomes. Journal of Biological Chemistry ;251 :2629-2636.

117. Mohammed F. (2001). Topical permeation characteristics of diclofenac sodium from NaCMC gels in comparison with conventional gel formulations. Drug Development and Industrial Pharmacy. ;27 (10):1083-1097.

118. Monteiro-Riviere, N.A., Bristol, D.G., Manning, T.O., Rogers, R.A. and Riviere, J.E. (1990) Interspecies and interregional analysis of the comparative histological thickness and laser Doppler blood flow measurements at five cutaneous sites in nine species. Journal of Investigative Dermatology, 95(5), 582-586.;

119. Moretti M, Gavini E, Peana A. (2000). In vitro release and antiinflammatory activity of topical formulations of ketoprofen. Boll Chim Farm. ;139 (2):67-72.

120. Morgan C, Renwich A, Friedmann P. (2003). The role of stratum corneum and dermal microvascular perfusion, penetration and tissue

levels of water soluble drugs investigated by microdyalisis. British Journal of Dermatology ;148 (3):434-443.

121. Morimoto H, Woda Y, Seki T, Sugibayashi K. (2002) In vitro skin permeation of morphin hydrochloride during the finite application of penetration enhancing system containing water, ethanol and L-menthol. Biol Pharm Bull . 25: 134-136.

122. Morton A, Campbell N, Gayle J, Redding W, Blikslager A. (2005). Preferential and non-selective cyclooxygenase inhibitors reduce inflammation during lipopolysaccharide-induced synovitis. Research in Veterinary Science ;78 (2):189-192.

123. Mukherjee B, Mahapatra S, Gupta R, Patra B, Tiwari A, Arora P. (2005). A comparison between povidone-ethylcellulose and povidone-eudragit transdermal dexamethasone matrix patches based on in vitro skin permeation. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics ;59 (3):475-483.

124. Muller B, Kasper M, Surber C, Imanidis G. (2003). Permeation, metabolism and site of action concentration of nicotinic acid derivatives in human skin: Correlation with topical pharmacological effect. European Journal Pharmaceutical Science ;20 :181-185.

125. Müller M, Mascher H, Kikuta C, et al. (1997). Diclofenac concentrations in defined tissue layers after topical administration. Clinical Pharmacology and Therapeutics. ;62 (3):293-299.

126. Müller M, Rastelli C, Ferri P, Jansen B, Breiteneder H, Eichler HG. (1998). Transdermal penetration of diclofenac after multiple epicutaneous administration. Journal of Rheumatology ;25 (9):1833-1836.

127. Nagase H, Kashiwagi M. (2003). Aggrecanases and cartilage matrix degradation. Arthritis Research and Therapy ;5 (2):94-103.

128. Naik A, Kalia Y, Pirot F, Guy R. (1999) Characterization of molecular transport across human stratum corneum in vivo. 3rd ed. New York: Marcel Dekker.

129. Nair, B., Taylor-Gjevre, R., A (2010) Review of Topical Diclofenac Use in Musculoskeletal Disease. Pharmaceuticals . 3(6), 1892-1908;

130. Nakagawa S., Cuthill I.C., (2007). Effect size, confidence interval and statistical significance: a practical guide for biologists. Biological Reviews. 82:(4)591–605.

131. Narishetty S, Panchagnula R. (2004). Transdermal delivery of zidovudine: effect of terpenes and their mechanism of action. J Control Release. ;95 (3):367-379.

132. Niazy, E.M.(1991) Influence of oleic acid and other permeation promoters on transdermal delivery of dihydroergotamine through rabbit skin. Int. J. Pharm. 67: 97–100.

133. Nishihata T, Rytting JH, Kamada A, Matsumoto K, Takahashi K. (1990) Combined effect of alcohol and urea on the in vitro transport of indomethacin across rat dorsal skin.J Pharm Sci. 79(6):487-9.

134. Nokhodchi A, Nazemiyeh H, Ghafourianm T, Hassan-Zadeh D, Valizadeh H, Bahary L. (2002). The effect of glycyrrhizin on the release rate and skin penetration of diclofenac sodium from topical formulation. Il Farmaco 57 (11):883-888.

135. Nokhodchi A, Shokri J, Dashbolaghi A, Hassan-Zadeh D, Ghafourian T, Barzegar-Jalali M. (2003). The enhancement effect of surfactants on the penetration of lorazepam through rat skin. Int J Pharm. 250 (2):356-69.

136. Nokhodchi, A., Sharabiani, K., Rashidi, M.R., Ghafourian, T.(2007). The effect of terpene concentrations on the skin penetration of diclofenac sodium. Int. J. Pharm. 335 : 97-105.

137. Okabe, H., Takayama, K., Ogura, A., Nagai, T.(1989). Effect of limonene and related compounds on the percutaneous absorption of indomethacin. Drug Des. Deliv. 4 :313-321.

138. Ongpipattanakul B, Burnette RR, Potts RO, Francoeur ML.(1991) Evidence that oleic acid exists in a separate phase within stratum corneum lipids. Pharm Res. 8(3):350-4.

139. Ota Y, Hamada A, Nakano M, Saito H. (2003). Evaluation of percutaneous absorption of midazolam by terpenes. Drug Metab Pharmacokinet. ;18 (4):261-266.

140. Owens J, Kamerling S, Barker S. (1995). Pharmacokinetics of ketoprofen in healthy horses and horses with acute synovitis. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics 18 (3):187-195.

141. Özgüney ISg, Karasulu HYi, Kantarc G, Sözer S, Güneri T, Ertan G. (2006). Transdermal Delivery of Diclofenac Sodium Through Rat Skin From Various Formulations. AAPS PharmSciTech ;7 (4):Art 88.

142. Palmer J, Bertone A, Malemud C, Mansour J. (1996). Biochemical and biomechanical alterations in equine articular cartilage following an experimentally-induced synovitis. Osteoarthritis and Cartilage ;4 (2):127-137.

143. Palmer J, Bertone A, McClain H. (1995). Assessment of glycosaminoglycan concentration in equine synovial fluid as a marker of joint disease. Canadian Journal of Veterinary Research ;59 (3):205-212.

144. Palmoski M, Perricone E, Brandt K. (1979). Development and reversal of a proteoglycan aggregation defect in normal canine knee cartilage after immobilization. Arthritis Rheumatism ;22 (5):508-517.

145. Patel R, Leswell PF. (1996). Comparation of ketoprofen, piroxicam and diclofenac gels in the treatment of acute soft tissue injury. Clinical Therapeutics ;18 (3):497-597.

146. Platt, D. (2001). The role of oral disease-modifying agents glucosamine and chondroitin sulphate in the management of equine degenerative joint disease. Equine Veterinary Education :262-263.

147. Ponec M. (2002). Skin constructs for replacement of skin tissues for in vitro testing. Advances Drug Delivery Reviews ;54 (Supplement 1):S19-S30.

148. Potts R, Guy R. (1992). Predicting skin permeability. Pharmacology Research ;9 (5):663-669.

149. Pozzobon R., Brass, K.E., De La Corte, F.D., Silveira E.A., Abreu, H.C. (2008) Efeito clínico do uso do parecoxib em modelo de sinovite induzida em pôneis. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 60(4): 806-814.

150. Ramachandran C, Fleisher D. (2000). Transdermal delivery of drugs for the treatment of bone disease. Advance Drug Delivery Reviews ;42 (3):197-223.

151. Ritschel W A, Sprockel OM. (1988) Absorption promoters for topically applied substances. Drugs of today 24: 613-628.

152. Riviere J, Papich M. (2001). Potentials and problems of developing transdermal patches for veterinary applications. Advance Drug Delivery Reviews ;50 (3):175-203.

153. Rizwan M, Aqil M, Ahad A, Sultana Y, Ali MM. (2008) Transdermal delivery of valsartan: I. Effect of various terpenes. Drug Dev Ind Pharm. 34(6):618-26.

154. Roberts M, Cross S. (1999). A physiological pharmacokinetic model for solute disposition in tissues below a topical application site. Pharmacology Reseach ;16 (9):1392-1398.

155. Rougier A, Dupuis D, Lotte, Maibach H. (1999) Stripping Method for Measuring Percutaneous absorption In Vivo. 3rd ed. New York: Marcel Dekker, 1999.

156. Ruland ,A. Kreuter , J. , Rytting. J.H.(1994) Transdermal delivery of the tetrapeptide hisetal (melanotropin (6–9)). I. Effect of various penetration enhancers: in vitro study across hairless mouse skin. International Journal of Pharmaceutics Volume 101(1-2): 57-61

157. Sallamann A. (1986). The history of diclofenac. The American Journal of Medicine ;80 (4):29-33.

158. Santoyo S, Ygartua P.(2000) Effect of skin pretreatment with fatty acids on percutaneous absorption and skin retention of piroxicam after its topical application. Eur J Pharm Biopharm. 50(2):245-50.

159. Schaible H. (2004). Spinal mechanisms contributing to joint pain. Novartis Foundation Symposium. 260 (4-22):277-279.

160. Scheuplein R, Blank I. (1971). Permeability of the skin. Physiological Reviews 51 (4):702-747.

161. Scheuplein R. (1965). Mechanism of percutaneous absorption. I. Routes of penetration and the influence of solubility. Journal of investigative Dermatology. ;45 (5):334-346.

162. Seibl R, Birchler T, Loelinger S. (2003). Expression and regulation of Toll-like receptor 2 in rheumatoid arthritis synovium. American Journal of Pathology. 162 (4):1221-1227.

163. Shah S.N.H., Rabbani, M., Amir, F.M.,(2006.) Effect of urea on topical absorption of diclofenac diethylamine through hairless rabbit skin. Journal of Research Science, 17(3), 165-171.

164. Shin S, Cho C, Oh I. (2000). Enhanced efficacy by percutaneous absorption of piroxicam from the poloxamer gel in rats. Int J Pharm ;193 (2):213-8.

165. Shokri J, Nokhodchi A, Dashbolaghi A, Hassan-Zadeh D, Ghafourian T, Barzegar Jalali M. (2001) The effect of surfactants on the skin penetration of diazepam. Int J Pharm. 228(1-2):99-107.

166. Simmons D, Botting R, Hla T. (2004). Cyclooxygenase isozymes: The biology of prostaglandin synthesis and inhibition. Pharmacological Reviews 56 (3):387-437.

167. Smith G, Bertone A, Kaeding C, Simmons E, Apostoles S. (1998). Anti-inflammatory effects of topically applied dimethyl sulfoxide gel on endotoxin-induced synoviitis in horses. American Journal of Veterinary Research ;59 (9):1149-1152.

168. Smith, F., Scott. R., Foster. J. (1990). An interspecies comparison of skin structure (hair follicle area as determined by a novel technique) and skin permeability. In: Gall. CL, Hensby, C., Marinovich, M., (Eds.). Skin Parmacology and Toxicology. Plenam, NY, USA, pp. 299-305.

169. Snow DH, Douglas TA, Thompson H, Parkins JJ, Holmes PH. (1981) Phenylbutazone toxicosis in equidae: a biochemical and pathophysiological study. Am J Vet Res. 42(10):1754-9.

170. Sosa S, Balick M, Arvigo R. (2002). Screening of the topical anti-inflammatory activity of some Central American plants. Journal of Ethnopharmacology ;81 (2):211-215.

171. Souza S, Oliveira O, Scarpa M, Oliveira A. (2004). Study of the diclofenac/phospholipid interactions with liposomes and monolayers. Colloids Surf B, Biointerfaces ;36 (1):13-17.

172. Stashak T. (2004) Examen de las claudicaciones. In: Troy D, ed. Adams: Claudicación en el caballo. 5ta ed.: Editorial Intermédica Buenos Aires, 113-117.

173. Suominen M, Tulano R, Puupponen L, Sankari S. (1999). Effects on Intraarticular injections of bufexamac suspension on amphotericin B induced aseptic arthritis in horses. American Journal of Veterinary Research ;60 (12):1467-1473.

174. Takahashi K, Suzuki T, Sakano H, Mizuno N. (1995). Effect of Vehicles on Diclofenac Permeation across Excised Rat Skin. Biol. Pharm. Bull. ;18 (4):571-575.

175. Takahashi. K, Sakano. H, Numata. N, Kuroda. S, Mizuno. N. (2002). Effect of fatty acid diesters on permeation of anti-inflammatory drugs through rat skin. Drug Dev Ind Pharm ;28 (10):1285-94.

176. Tanojo, H., Bos-van Geest, A., Bouwstra, J.A., Junginger, H.E., Bodd´e, H.E. (1997). In vitro human skin barrier perturbation by oleic acid: Thermal analysis and freeze fracture electron microscope studies. Thermochim. Acta 293: 77–85.

177. Tarner I, Harle P, Muller-Ladner U, Gay R, Gay S. (2005). The different stages of synovitis: acute vs chronic, early vs late and non-erosive vs erosive. Best Pract Res Clin Rheumato, 19(1):19-35.

178. Tew W. (1982). Demonstration by synovial fluid analysis of efficacy in horses of an investigational drug (L-1016). Journal Equine Veterinary Sciences :42-50.

179. Theiler R, Gosh P, Brooks P. (1994). Clinical , biochemical and imaging methods of assessing ostheoarthritis and clinical trials with agents claiming `chondromodulating´ activity. Osteoarthritis and Cartilage ;2 (1):1-23.

180. Todhunter R, Fubini SL, Vernier-Singer M, et al. (1998). Acute synovitis and intra-articular methylprednisolone acetate in ponies. Osteoarthritis and Cartilage ;6 (2):94-105.

181. Trotter G, McIlwraith W. (1996) Clinical features and disease of equine joint disease. In: McIlwraith WaT, GT, ed. Joint Disease in the Horse. Philadephia.: W.B. Saunders Company, 120-145.

182. Van Pelt R. (1974). Interpretation of synovial findings in the horse. Journal of the American Veterinary Medical Association ;165 :192-195.

183. Verde C, Simpson M, Pereda R, Landoni M. (2001). Enantiospecific pharmacokinetics of ketoprofen in plasma and synovial fluid of horses with acute synovitis. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics ;24 (3):179-185.

184. Verde C, Simpson M, Villarino N, Frigoli A, Landoni M. (2006). Therapeutic and haematological effects of native and low molecular weight condroitin sulphate administered orally in horses with arthritis. Revista Electrónica de Veterinaria REDVET ISSN 1695-7504. Vol. V, Nº10 Art. 101004

185. Villarino N, Landoni MF. (2006). Transdermal drug delivery: A new frontier in the administration of therapeutic drugs to veterinary species. The Veterinary Journal 172 (2):200-201.

186. Villarino N, Vispo T, Ferrante M, Landoni F. (2006). Inefficacy of topical diclofenac in arthritic horses. American Journal of Animal and Veterinary Sciences ;1 :8-12.

187. Villarino N. (2006) Estudio comparativo de los efectos antiinflamatorios de condroitin sulfato y diclofenac administrados en forma tópica en equinos artríticos. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

188. Wallace J, Bak A, McKnight W, Asfaha S, Sharkey K, MacNaughton W. (1998). Cyclooxygenase 1 contributes to inflammatory responses in rats and mice: implications for gastrointestinal toxicity. Gastroenterology 115 (1):101-109.

189. Wallace J. (2005). Recent advances in gastric ulcer therapeutics. Current Opinion in Pharmacology ;5 (6):573-577.

190. Warner TD, Giuliano F, Vojnovic I, Bukasa A, Mitchell J, Vane J. (1999) Nonsteroidal drug selectivities for cyclooxigenase-1 rather than cyclooxigenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full in vitro analysis. Proc Natl Acad Sci U S A. 22; 96 (13):7563-8.

191. Welch RD, Watkins JP, DeBowes RM, Leipold HW. Effects of intra-articular administration of dimethylsulfoxide on chemically induced synovitis in immature horses. Am J Vet Res. 1991 Jun;52(6):934-9.

192. Wertz P, Downing D. (1991). Epidermal lipids, in: L.A. Goldsmith (Ed.), Physiology, Biochemistry and Molecular Biology of the Skin, Oxford University Press, New York, :205-236.

193. Wester R, Mainbach H. In Vivo Methods for Percutaneous Absorption Measurements. Third ed. New York: Marcel Dekker, 1999.

194. White G, Stites T, Jones W, Jordan S.(2004) Efficacy of intramuscular chondroitin sulfate and compounded acetyl-D-glucosamine in a positive controlled study of equine carpitis. Proceedings of the Annual American Association of Equine Practioners. Denver, Colorado. 254-269.

195. Williams AC, Barry BW. (2004). Penetration enhancers. Advanced Drug Delivery Reviews ;56 :603-618.

196. Williams, A.C. (1995) Urea and its derivatives as penetration enhancers, in: E.W. Smith, H.I. Maibach (Eds.), Percutaneous Penetration Enhancers, CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 289–296.

197. Williams, A.C., Barry, B.W.(1989) Urea analogues in propylene glycol as penetration enhancers in human skin. International Journal of Pharmaceutics 56(1): 43-50 .

198. Willoughby D, Moore A, Colville-Nash P. (2000). COX-1, COX-2, and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. The Lancet ;355 (9204):646-648.

199. Wohlrab W. (1984) The influence of urea on the penetration kinetics of topical applied glucocorticoids. Acta Dermatol Venerol. 64: 233-238

200. Wong,O., Rytting, J.H.(1995) Biodegradable unsaturated cyclic ureas as penetration enhancers, in: E.W. Smith, H.I. Maibach (Eds.), Percutaneous Penetration Enhancers, CRC Press, Boca Raton, pp. 297–307.

201. Xie W, Chipman J, Robertson D, Erikson R, Simmons D. (1991) Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin syntethase is regulated by m splicing RNA. Proc Natl Acad Sci USA; 88:2692-6.

202. Yamato K, Takahashi Y, Akiyama H, Tsuji K, Onishi H, Machida Y. (2009) Effect of penetration enhancers on transdermal delivery of propofol. Biol Pharm Bull. 32(4):677-83.

203. Zurier R. (2003). Prostaglandins: then, now and next. Seminars in Arthritis and Rheumatism 33 (39):3137-3139.