



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

**ESTUDI FARMACOLÒGIC DEL
CARPROFEN *EX VIVO* I *IN VIVO*
EN L'ESPÈCIE PORCINA**

Lídia Gómez Segura

2021

TESIS DOCTORAL

**ESTUDI FARMACOLÒGIC DEL
CARPROFEN *EX VIVO* I *IN VIVO*
EN L'ESPÈCIE PORCINA**

Autora:

Lidia Gómez Segura

2021

Directors:

Alvaro Gimeno Sandig i Alexander Parra Coca

Tutora:

Rafaela Cuenca Valera

Programa de Doctorat en Medicina i Sanitat Animal

Facultat de Veterinària

Universitat Autònoma de Barcelona



FACULTAT DE VETERINÀRIA

UAB
Universitat Autònoma
de Barcelona

*Als meus pares, l'Alba i el Julià,
per tota la paciència que han tingut
aquests anys, per animar-me
i ajudar-me sempre a acabar
tots els meus projectes.*



Universitat Autònoma de Barcelona

El Dr. Alvaro Gimeno Sandig, responsable de l'Estabulari Campus Bellvitge Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona.

El Dr. Alexander Parra Coca, professor a temps complet de l'àrea de Farmacologia i Toxicologia, programa de Medicina Veterinària i Zootecnia, de la Universitat de Ciències Aplicades i Ambientals de Bogotà, (Colòmbia).

CERTIFIQUEN:

Que la tesis doctoral amb títol: **“Estudi farmacològic del Carprofen *ex vivo* i *in vivo* en l'espècie porcina”** presentada per Lúdia Gómez Segura per optar per el títol de Doctora en Medicina i Sanitat Animal per la Universitat Autònoma de Barcelona s'ha realitzat sota la seva direcció i, considerant-la finalitzada, autoritzen la seva presentació per a ser jutjada per la Comissió corresponent.

Per a que consti oficialment firmen el següent document a Barcelona, 10 de maig de 2021.

Alvaro Gimeno Sandig

Alexander Parra Coca

Índex

Agraïments	1
Abreviatures.....	4
Llistat de taules	9
Llistat de figures.....	11
Resum	13
Summary.....	16
Justificació	19
ANTECEDENTS	22
La inflamació	23
Causes i símptomes.....	23
Antecedents de l'enzim COX.....	26
Generalitats dels enzims COX-1 i COX-2	27
Distribució tissular de l'enzim COX-1	28
Distribució tissular i funcions de l'enzim COX-2.....	29
El dolor.....	30
Fisiologia del dolor	32
Antiinflamatoris No Esteroïdals.....	34
Història dels AINEs	34
Generalitats dels AINEs	35
Mecanisme d'acció dels AINEs	36
Propietats farmacològiques dels AINEs	36
Classificació dels AINEs	37
Reaccions adverses dels AINEs	39
Carprofè.....	40
Estudis de farmacocinètica.....	42
Conceptes bàsics de la farmacocinètica	42
Models farmacocinètics	45
Nanopartícules	46
Desenvolupament de NPs.....	47
Ventatges de l'ús de NPs.....	48
Aplicació en medicina humana	48
Ús potencial en medicina veterinària	49
Eliminació de NPs.....	49
Aspectes toxicològics de les NPs.....	50
L'espècie porcina	50
Fisiologia de l'espècie porcina	51

Mucoses i teixits oculars	51
Benestar animal	55
El benestar animal investigació: principi de les 3Rs.....	55
El benestar animal en producció ramadera	56
Avaluació del benestar animal	57
El dolor en l'espècie porcina	58
HIPÒTESIS	61
OBJECTIUS.....	63
OBJECTIU GENERAL	64
OBJECTIUS PARTICULARS	65
ARTICLES	66
Article 1	68
Resum	69
Graphical Abstract	70
Article 2	88
Resum	89
Graphical Abstract	90
Article 3	107
Resum	108
Graphical Abstract	109
DISCUSIÓ.....	132
CONCLUSIÓ	143
BIBLIOGRAFIA	145

Agraïments

Després de 5 anys per fi ha arribat el moment d'escriure aquesta pàgina. Encara no em crec que ja no tonaré a utilitzar la frase "no puc quedar, he de fer doctorat...". Ha plogut molt des del dia que em van oferir començar aquesta tesis i jo, sense saber molt bé on em ficava, m'hi vaig llençar de cap. Aquest treball ha marcat una part molt important de la meva vida: els primers anys de vida laboral, d'independència i de molt creixement personal. Feia poc que havia començat a treballar com a veterinària a l'Estabulari Campus Bellvitge CCiT-UB i el Dr. Alvaro Gimeno em va presentar a la Dra. Ana Cristina Calpena i al Dr. Alexander Parra. Només puc agrair-los a tots tres l'enorme oportunitat i ajuda que m'han donat aquests anys.

L'Alvaro ha estat un mestre, no només en la tesis, sinó en molts altres aspectes de la meva vida professional. Sempre recordaré amb molt de carinyo les hores i hores al quiròfan fent cursos a l'estabulari i molts altres moments que donarien per escriure una altra tesis. No hi ha suficients paraules per agrair-li tot el que ha fet per mi i la confiança que va dipositar en mi.

L'Alexander va ser qui em va trasmetre tot l'entusiasme pel tema de la tesis i qui em va ajudar a ubicar-me a l'inici. Moltes gràcies per estar sempre quan he necessitat ajuda i per tot el teu coneixement. Espero que la vida ens torni a retrobar a la mateixa ciutat algun dia.

L'Ana ha estat una directora, una amiga i una de les millors persones que he conegut mai. Ella em va acollir en moltíssims sentits i només puc agrair-li la seva ajuda, la seva dedicació, opinions, ànims i consells. M'enduc molts moments juntes, però els meus preferits són els atacs de riure que ens entren quan portem hores i hores de feina i cansament a la facultat.

Gràcies a tots tres perquè sense vosaltres jo avui no estaria escrivint aquestes paraules.

Gràcies a totes les meves nenes de l'Estabulari Campus Bellvitge CCiT-UB: Natacha, Marta, Jessica, Loli, Puri, Sara, Laia, Cristina (espero no deixar-me a ningú). Us trobo a faltar molt i espero poder venir-vos a veure aviat.

Gràcies al Dr. Antoni De Padua Boix per la seva ajuda en tots els articles. I a la Dra. Beatriz Clares i el seu marit, el Dr. Soriano Ruiz, per l'ajuda en els darrers treballs.

Gràcies al Dr. Joan Blasi, a Immaculada Gómez de Aranda i David Bellido per la seva participació en els nostres estudis.

Gràcies a tots els companys de la Facultat de Farmàcia de la UB per tota l'ajuda que m'han ofert durant aquests anys.

Gràcies a tots els companys del Departament de Salut per la vostra paciència cada vegada que dic la frase: "ahir vaig estar tota la tarda fent doctorat i estic cansadíssima". Gràcies per animar-me a tancar aquesta etapa.

Gràcies a tots els porquets i porquetes que han participat i ajudat en aquesta tesis.

Gràcies als meus amics i amigues per entendre que no sempre podia apuntar-me a totes les quedades. Ara ja no tindrè excuses per no venir!

Gràcies als meus pares. Gràcies per donar-me l'oportunitat d'estudiar el que jo volia. Gràcies per animar-me sempre a perseguir el que em fa feliç. Gràcies per intentar fer-me veure el got mig ple i que la vida tot són oportunitats.

Gràcies a l'Alba, la meva germana. Per totes les vegades que m'has ajudat amb la informàtica! I per totes les xerrades que tenim. Ja saps que només t'ho puc explicar a tu.

I per últim, gràcies a tu, Julià, la meva parella i el meu millor amic. Gràcies per la teva paciència, els teus ànims, les teves paraules i les nostres mirades. Gràcies per entendre'm quan ni jo mateixa m'entenc. Gràcies per voler estar amb mi i compartir la nostra vida junts!

Abreviatures

5-HT: 5-hidroxitriptamina (Serotonina)

AA: Àcid araquidònic

AINES: Antiinflamatoris no esteroïdals

ANOVA: Anàlisi de la variança

Antagonistes d'H₂: Antagonistes dels receptors H₂

AO: Administració oral

APME: Astes posteriors de la medul·la espinal

ASA: Àcid acetilsalicílic

AUC: Àrea sota la corba

Bv: bovina

Ca²⁺: Calci

Cl: Clearence

COX: Ciclooxygenasas

COX-1: COX constitutiva

COX-2: COX induïble

CP: Carprofè

CP-NPs: Nanopartícules de Carprofè

CP-Sat: Carprofè en solució saturada

CP-Solució: Carprofè en solució

DAG: Diacilglicerol

EETs : Epoxieicosatrienoicos

EMA: Agència Europea del Medicament

FDA: Federal Drug Administration

FGF: Fibroblàstic

GI: Gastrointestinal

HL: Temps de vida mitja

IASP: Associació Mundial per a l'estudi del Dolor

IC50: Concentració del fàrmac necessària per inhibir el 50%

IL-1: Interleucina 1

IL-6 : Interleucina 6

IL-8 : Interleucina 8

IM: Via intramuscular

IP3: Inositol trifosfat

IV: Via intravenosa

Js: Flux

Kp: Constant de permeabilitat

LADME: Alliberació, absorció, distribució, metabolisme i excreció

LC/MS/MS: Espectrometria de masses

LOD: Límit de detecció

LOQ: límit de quantificació

LOX: Lipooxigenasas

LPS: Lipopolisacàrid

MAPA: Ministeri d'Agricultura, Pesca i Alimentació

MRT: Temps mig de retenció

NP: Nanopartícula

OMS: Organització Mundial per a la Salut

PAF: Factor Activador de Plaquetes

PAF-LL: Fosfatidilcolina rovellada

PAFR: Proteïna G

PBS : Tampó fosfat salí

PG: Prostaglandina

PGD2: Prostaglandina D2
PGE2: Prostaglandina E2
PGF2: Prostaglandina F2
PGG2: Prostaglandina G2
PGH2: Prostaglandina H2
PGI2: Prostaciclina
PIP2: Fosfatidil inositol 4,5-bisfosfat
PK: Farmacocinètica
PKC : Proteïna Kinasa C
PLA2: Fosfolipasa A2
PLC β : Fosfolipasa C
Qr: Quantitat retinguda
R²: Coeficient de correlació
SC: Via subcutània
SNC: Sistema nerviós central
Tl: Temps de retard
TNF: Factor de necrosi tumoral
TXA2: Tromboxà A2
UE: Unió Europea
Vdss: Volum de distribució

Llistat de taules

Tabla 1: Classificació química dels AINEs.	37
Tabla 2: Mecanisme d'inhibició de la COX.....	38
Tabla 3: Inhibició de l'isoenzim COX.....	38

Llistat de figures

Figura 1: Cascada de la inflamació.....	23
Figura 2: Esquema de síntesi de prostaglandines a partir de fosfolípids de membrana, incloses enzims, substrats i receptors.....	25
Figura 3: Classificació de tipus de dolor.	31
Figura 4: Vies implicades en la nocicepció.....	33
Figura 5: Estructura química del CP.....	40
Figura 6: Diagrama del procés d'alliberació, absorció, distribució, metabolisme i excreció (LADME) d'un fàrmac per diferents vies d'administració.....	43
Figura 7: Representació esquemàtica de el model monocompartimental.....	45
Figura 8: Representació esquemàtica de el model bicompartimental.....	46
Figura 9: Procés d'elaboració de les NPs.....	47
Figura 10: Imatge de la nanopartícula de CP [0.75] realitzada amb un microscopi electrònic de transmissió (Parra i cols., 2015).....	48
Figura 11: Producció de carn de porc a Espanya dels darrers anys (MAPA, 2019).	51
Figura 12: Imatge mascroscòpica dels teixits oculars (conjuntiva, cornea i esclera) i de les mucoses porcines estudiades (mucosa vaginal, bucal i sublingual).	52
Figura 13: Disposició de la mucosa bucal (adaptada de Washintong i cols., 2002).	53
Figura 14: Vista dorsal interna de la vagina porcina	54
Figura 15: Estructura del globus ocular.....	55
Figura 16: Posició inclinada degut a l'artritis del membre anterior en un porc (Egger i cols. (b), 2014).....	59
Figura 17: Objectius generals del present estudi.	64
Figura 18: Graphical abstract de l'article 1.....	70
Figura 19: Graphical abstract de l'article 2.....	90
Figura 20: Graphical abstract de l'article 3.....	109

Resum

El Carprofè, àcid propiòtic 2- (6-clorocarbazol), s'utilitza com a agent antiinflamatori, analgèsic i antipirètic. Pertany a la família de medicaments antiinflamatoris no esteroideus. El Carprofè s'utilitza en medicina veterinària en nombroses espècies, tot i així està molt poc estudiat el seu ús en l'espècie porcina. D'altra banda, alguns efectes indesitjables s'associen a la seva administració sistèmica. Les rutes locals alternatives són especialment útils per facilitar la seva administració en animals.

La hipòtesis d'aquest treball és trobar noves formes de dosificació del Carprofè per diverses vies en l'espècie porcina. Per això, ens plantegem diversos objectius: hem volgut conèixer la capacitat de permeació del Carprofè a través d'estudis *ex vivo* vehiculitzat en nanopartícules o en solució en mucoses i teixits oculars per aconseguir conèixer la seva possible eficàcia, tolerància i seguretat per aquestes vies i oferir alternatives terapèutiques. D'altra banda, volem conèixer el comportament farmacocinètic del Carprofè en l'espècie porcina i així, poder avaluar tots el paràmetres per la via intravenosa i intramuscular. Finalment, ens proposem validar diferents mètodes d'anàlisis per donar fiabilitat als resultats obtinguts.

En aquesta tesis hem realitzat tres treballs per donar resposta als nostres objectius:

- Gómez-Segura, L.; Parra, A.; Calpena, A.C.; Gimeno, Á.; Boix-Montañes, A. Carprofen Permeation Test through Porcine Ex Vivo Mucous Membranes and Ophthalmic Tissues for Tolerability Assessments: Validation and Histological Study. *Veterinary Sciences*. **2020**, 7, 152.
- Gómez-Segura, L.; Parra, A.; Calpena-Campmany, A.C.; Gimeno, Á.; Gómez de Aranda, I.; Boix-Montañes, A. Ex Vivo Permeation of Carprofen Vehiculated by PLGA Nanoparticles through Porcine Mucous Membranes and Ophthalmic Tissues. *Nanomaterials*. **2020**, 10, 355.
- Gómez-Segura, L.; Parra, A.; Gimeno, Á.; Calpena-Campmany, A.C.; Bellido, D.; Soriano-Ruiz J.L.; Boix-Montañes A. Application of liquid chromatography/mass spectrometry for bioanalysis of Carprofen in swine: pharmacokinetics and bioavailability. Pendent d'enviar.

L'objectiu principal del primer article és validar la idoneïtat dels experiments de permeació *ex vivo* de Carprofè en membranes mucoses porcines (bucals, sublinguals i vaginals) i teixits oftàlmics (còrnia, esclera i conjuntiva) destinats a ser representatius de condicions *in vivo*. Els resultats havien mostrat relacions lineals amb bons coeficients de correlació ($R^2 > 0.998$ i $R^2 > 0.999$) en el rang de 0,78

a 6,25 mg/mL i de 3,125 mg/mL a 100 mg/mL respectivament. Els límits baixos de quantificació al voltant de 0,40 µg/mL van permetre seguir nivells de permeació fins a un mínim del 0,40% de la dosi aplicada localment. Aquest mètode va mostrar una bona exactitud i precisió amb valors inferiors al 2%. Els nivells de recuperació de fàrmacs en mostres de teixit es van avaluar amb tampó aquós per preservar la integritat histològica. Es van assolir valors reproduïbles inferiors al 30% en tots els teixits, cosa que suggereix que és un mètode poc perjudicial però de baixa eficiència i per tant, es requereix l'ús de dissolvents addicionals per millorar els percentatges d'extracció. Com a prova de concepte, s'ha realitzat una sèrie de proves de permeació de Carprofè en cèl·lules de difusió vertical de Franz seguides d'un estudi histològic per a la seva avaluació crítica. A més, es van preparar mostres semblants a la retenció de teixits sintètics per verificar el valor d'aquest estudi experimental. No es van detectar interferències màximes rellevants.

L'objectiu principal del segon treball és la investigació de la permeació *ex vivo* de Carprofè mitjançant cèl·lules de Franz a través de diferents tipus de membranes mucoses porcines i teixits oftàlmics prèviament esmentats per comparar la formulació de nanopartícules de Carprofè i Carprofè en solució. A més, es van realitzar estudis *in vivo* per verificar que les formulacions no afectaven l'estructura cel·lular i establir la quantitat retinguda als teixits. Els resultat obtinguts van ser la permeabilitat de nanopartícules de Carprofè és més eficaç en termes de retenció de fàrmacs en gairebé tots els teixits (a excepció de l'esclera i sublingual). Els estudis *in vivo* demostren que cap de les dues formulacions afecta l'estructura del teixit, de manera que ambdues formulacions són segures.

El tercer treball es base en l'objectiu de proporcionar un estudi per primera vegada de la farmacocinètica del Carprofè en porcs Yorkshire-Landrace. A més, un nou mètode d'anàlisi mitjançant cromatografia de líquids per espectrometria de masses ens ha permès calcular les concentracions plasmàtiques, avaluar els paràmetres farmacocinètics i la biodisponibilitat (també hem validat aquest nou mètode analític). Tots els paràmetres s'han calculat utilitzant mètodes compartimentals i no compartimentals. A més, s'ha dut a terme un estudi farmacocinètic comparatiu amb altres espècies. Els resultats obtinguts van ser la desviació estàndard relativa va ser superior al 3%, la repetibilitat va ser bona. La precisió va ser del 80 al 120%. Límit de detecció 0,019ppb i límit de quantificació 0,060ppb. El model seleccionat per al tractament compartimental ens permet predir quin seria el perfil dels nivells plasmàtics de Carprofè obtinguts per la via intramuscular. Per tant, s'ha proposat aplicar un règim de dosificació en porcs.

Com a conclusions finals s'ha demostrat la idoneïtat d'aquest test per quantificar la distribució de Carprofè amb una bona tolerabilitat histològica en els teixits porcins estudiats. Tanmateix, es va concloure que les nanopartícules de Carprofè poden ser una eina útil per al tractament tòpic de la inflamació local en medicina veterinària i humana. Per finalitzar, s'ha descrit i validat un nou mètode per caracteritzar la

farmacocinètica del Carprofè en porcs i proposar un règim de dosificació en aquesta espècie.

Summary

Carprofen, propionic acid 2- (6-chlorocarbazole), is used as an anti-inflammatory, analgesic and antipyretic agent. It belongs to the family of non-steroidal anti-inflammatory drugs. Carprofen is used in veterinary medicine in many species, although its use in the porcine species is not studied. On the other hand, some side effects are associated with Carprofen systemic administration. Alternative local routes are especially useful for easy administration in animals.

The hypothesis of this work is to find new ways of dosing Carprofen in different routes in swines. Therefore, we we have raised some objectives: we wanted to know the permeation capacity of Carprofen through *ex vivo* studies carried in nanoparticles and solution in mucous membranes and eye tissues to get to know its possible efficacy, tolerance and safety by this route and offer therapeutic alternatives. On the other hand, we want to know the pharmacokinetic behavior of Carprofen in the porcine species and be able to evaluate all the parameters intravenously and intramuscularly. Finally, we propose to validate different methods of analysis to give sturdiness to the results obtained.

In this thesis we have carried out three works to respond to our objectives:

- Gómez-Segura, L .; Parra, A .; Calpena, A.C .; Gimeno, Á .; Boix-Montañes, A. Carprofen Permeation Test through Porcine Ex Vivo Mucous Membranes and Ophthalmic Tissues for Tolerability Assessments: Validation and Histological Study. *Veterinary Sciences*. 2020, 7, 152.
- Gómez-Segura, L .; Parra, A .; Calpena-Campmany, A.C .; Gimeno, Á .; Gómez de Aranda, I .; Boix-Montañes, A. Ex Vivo Permeation of Carprofen Vehiculated by PLGA Nanoparticles through Porcine Mucous Membranes and Ophthalmic Tissues. *Nanomaterials*. 2020, 10, 355.
- Gómez-Segura, L .; Parra, A .; Gimeno, Á; Calpena-Campmany, A.C .; Bellido, D .; Soriano-Ruiz J.L .; Boix-Montañes A. Application of liquid chromatography / mass spectrometry for bioanalysis of Carprofen in swine: pharmacokinetics and bioavailability. Pending submission.

The main objective of the first article is to validate the suitability of *ex vivo* permeation experiments of Carprofen in porcine mucous membranes (buccal, sublingual and vaginal) and ophthalmic tissues (cornea, sclera and conjunctiva) to be representative of *in vivo* conditions. The results had shown linear relationships with good correlation coefficients ($R^2 > 0.998$ and $R^2 > 0.999$) in the range of 0.78 to 6.25 mg/mL and 3.125 mg/mL to 100 mg/mL respectively. Low limits of quantification around 0.40 µg/mL allowed to follow permeation levels up to a minimum of 0.40% of the dose applied locally. This method showed good accuracy

and precision with values less than 2%. Drug recovery levels in tissue samples were assessed with aqueous buffer to preserve histological integrity. Reproducible values of less than 30% were achieved in all tissues, suggesting that it is a harmless but low-efficiency method and therefore the use of additional solvents is required to improve extraction percentages. As a proof of concept, a series of Carprofen permeation tests have been performed in Franz's vertically diffuse cells followed by a histological study for critical evaluation. In addition, samples similar to synthetic tissue retention were prepared to verify the value of this experimental study. No relevant maximum interferences were detected.

The main objective of the second work is to investigate the *ex vivo* permeation of Carprofen by Franz's vertically diffuse cells through different types of porcine mucous membranes and ophthalmic tissues previously mentioned to compare the formulation of Carprofen nanoparticles and Carprofen in solution. In addition, *in vivo* studies were performed to verify that the formulations did not affect the cell structure and to establish the retained amount in tissues. The results obtained were the permeability of Carprofen nanoparticles is more effective in terms of drug retention in almost all tissues (except sclera and sublingual mucous). *In vivo* studies show that neither formulation affects tissue structure, so both formulations are safe.

The third study is based on the aim of providing a study of the pharmacokinetics of Carprofen in Yorkshire-Landrace pigs. In addition, a new method of analysis by liquid chromatography by mass spectrometry has allowed us to calculate plasma concentrations, evaluate pharmacokinetic parameters and bioavailability (we have also validated this new analytical method). All parameters have been calculated using compartmental and non-compartmental methods. In addition, a comparative pharmacokinetic study was performed with other species. The results obtained were the relative standard deviation was higher than 3%, the repeatability was good. The accuracy was 80 to 120%. Detection limit 0.019ppb and quantification limit 0.060ppb. The model selected for the compartmental treatment allows us to predict what would be the profile of the plasma Carprofen levels obtained by the intramuscular route. Therefore, it has been proposed to apply a dosing regimen in swines.

As a final conclusions it has been shown the suitability of this test to quantify the distribution of Carprofen with good histological tolerability in the swines mucous and ophthalmic tissues. In addition, it was concluded that Carprofen nanoparticles may be a useful tool for the topical treatment of local inflammation in veterinary and human medicine. Finally, a new method has been described and validated to characterize the pharmacokinetics of Carprofen in swines and to propose a dosing regimen in this species.

Justificació

La necessitat d'investigació sobre el tema que ha motivat la realització d'aquesta tesis doctoral va sorgir principalment per la manca d'estudis sobre el Carprofè (CP) en l'espècie porcina. En concret ens vam adonar de la següent falta d'informació:

- Fins el moment d'aquest estudi eren parcialment desconeguts els paràmetres farmacocinètics del CP en l'espècie porcina i es feien servir per realitzar prediccions els valors de l'espècie humana (ja que és una de les espècies amb un comportament més semblant).
- Tanmateix, era desconeguda l'acció tòpica del CP en solució o en nanopartícules en diverses mucoses com a noves formes d'administració. La principal raó de l'estudi de nanopartícules en l'espècie porcina és que les nanopartícules permeten una pauta d'administració més llarga en el temps. A més, al ser una forma d'administració local, s'eviten efectes secundaris dels AINE's.
- D'altra banda, hem cercat i validat nous mètodes de bioanàlisis en mucoses i plasma. Ja que fins el moment, no s'havia descrit en la literatura aquest mètodes per aquesta espècie i fàrmac.

L'organització de la tesis s'ha dut a terme de la següent manera:

- Antecedents: On es tracta el coneixement sobre el tema estudiat fins a l'actualitat. Dins aquest apartat hem tractat diversos subtemes:
- La inflamació: En aquest apartat s'inclouen generalitats de la inflamació, les seves implicacions i definició de la COX. La inflamació és una patologia complexa i amb moltes particularitats que cal tenir en compte a l'hora de tractar-la.
- El dolor en l'espècie porcina: Generalitats del dolor i com s'avalua en l'espècie porcina.
- Els Antiinflamatoris No Esteroides (AINEs): En aquest apartat es tracten generalitats dels AINE's, la seva classificació i els seus possibles efectes secundaris. Aquest subtema és molt important ja que introdueix el grup de fàrmacs al que pertany el Carprofè.
- El Caprofè: En aquest apartat es parla sobre generalitats de la molècula, la importància de realitzar estudis de farmacocinètica en l'espècie porcina per diferents vies i estudis de biodisponibilitat.
- Farmacocinètica: expliquem en què consisteix i per què cal el seu estudi en cada espècie.
- Les nanopartícules: Què són, i quina és la seva importància en medicina humana i veterinària. És important explicar el concepte de nanopartícula, ja que representen una nova forma de dosificació.

- L'espècie porcina i els teixits estudiats que intervenen en diferents vies d'administració local. En aquest subtema descrivim l'espècie estudiada i expliquem les característiques morfològiques i farmacològiques dels teixits estudiats. Conèixer aquestes dades és important per entendre els posteriors estudis i resultats.
- Benestar animal: la seva importància tant en producció porcina com en investigació. Per garantir el benestar animal és important el tractament de malalties i patologies com la inflamació i el dolor associat.
- Hipòtesis inicial: conjectura que ens plantejem a l'inici de l'estudi i que intentem donar-li resposta.
- Objectius: La tesis té un objectiu general i diversos objectius específics.
- Articles: Aquesta tesis es basa en 3 articles (2 publicats i 1 pendent d'enviar) on presentem els resultats obtinguts dels nostres estudis en front a la hipòtesis i objectius plantejats.
- Discussió general: Resum comentat a partir dels resultats.

Conclusió: principals conclusions obtingudes dels experiments realitzats i que intenten donar resposta a la hipòtesis i objectius plantejats.

ANTECEDENTS

La inflamació

Causes i símptomes

La inflamació és una resposta fisiològica innata del cos de defensa inespecífica al dany tissular que forma part del nostre sistema immunitari. Les diferents condicions que poden produir inflamació són els patògens, irritants abrasius, químics, distorsió o alteració de cèl·lules, traumes i temperatures extremes (Tortora i Derrickson, 2010). L'objectiu d'aquesta resposta és reclutar en el lloc de la lesió elements humerals i cel·lulars de la immunitat per tal d'eradicar ràpidament l'agent infeccios, toxines o substàncies estranyes a fi de prevenir la seva disseminació a altres teixits, preparar el lloc per a la reparació tissular i restaurar l'homeòstasi (Fainboim i Geffner, 2011).

Els signes clínics associats a la inflamació es resumeixen usant l'acrònim DRIEC (Figura 1):

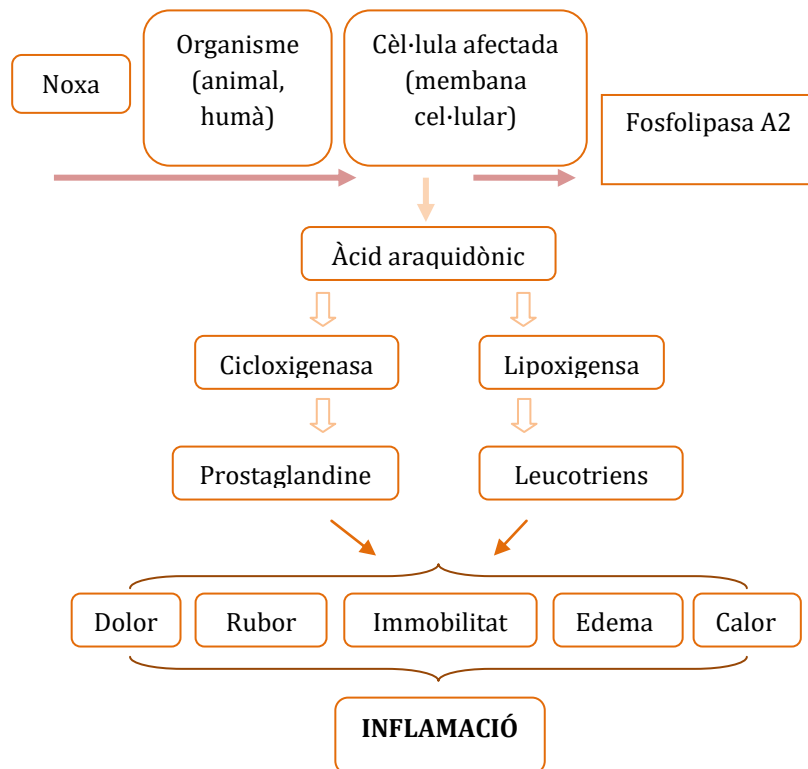


Figura 1: Cascada de la inflamació.

- D: dolor a causa de l'alliberament de certes substàncies químiques.
- R (vermell): enrogiment causat del major flux de sang cap a l'àrea afectada.
- I: immobilitat per pèrdua de funció en inflamacions greus.
- E: edema causat per l'acumulació de líquids.

-C: calor a causa del major flux de sang cap a l'àrea afectada.

La inflamació és un procés mediat per diversos tipus de mediadors cel·lulars solubles i cèl·lules presents o reclutades en el focus del dany. Les principals cèl·lules que produeixen aquests mediadors són plaquetes, neutròfils, monòcits/macròfags i mastòcits, però altres cèl·lules com fibroblasts endotelials de múscul llis també poden activar-se i produir-los. Mediadors plasmàtics com les proteïnes del complement, les cinines i proteïnes de fibrinòlisi es produeixen principalment en el fetge i són presents en la circulació com a precursors inactius que necessiten ser activats generalment per una sèrie de divisions proteolítiques (Riccardi i cols., 2018; Kritas i cols., 2020).

El procés d'inflamació es pot resumir en 3 etapes:

- Vasodilatació i augment de la permeabilitat vascular.
- Migració (moviment) de fagòcits des de la sang cap al líquid intersticial
- Reparació tissular.

Inicialment, tot comença amb l'alliberament de mediadors de la inflamació preexistents en els mastòcits, com la histamina i la serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT), que donen lloc a vasodilatació, dolor i edema per augment en la permeabilitat vascular (Riccardi i cols., 2018). A l'alliberar-se la serotonina té un efecte sobre els macròfags/monòcits i dona lloc a un increment en la producció de citocines proinflamàtiques com la Interleucina 1 (IL-1) i la Interleucina 6 (IL-6) (Durk i cols., 2005). Altres mediadors preformats que s'alliberen per la degranulació dels mastòcits són quimiocines, enzims i proteases. Entre les quimiocines es troba la Interleucina 8 (IL-8) responsable d'infiltració leucocitària en els teixits. En quan els enzims trobem kinogenasas que donen lloc a la síntesi de cinines vasodilatadores i la fosfolipasa, enzim que promouen la síntesi d'àcid araquidònic activant la cascada de síntesi de la família d'eicosanoides (Theoharides i cols., 2012; Jiao i cols., 2020).

Dins de la família d'eicosanoides, trobem 4 tipus en funció de la ruta de síntesi a partir de l'àcid araquidònic (AA) (Riccardi i cols., 2018):

- Àcids epoxieicosatrienoics (EETs): obtinguts per la via del Citocrom P450.
- Isoprostans: obtinguts per vies no enzimàtiques.
- Leucotriens i lipoxinas: sintetitzats via Lipooxigenasas (LOX).
- Prostanoids: sintetitzats via ciclooxigenasas (COX).

La síntesi de prostanoids per la via de COX es porta a terme per 2 isoformes que han estat caracteritzades d'aquest enzim, la COX constitutiva (COX-1), que s'expressa en la majoria dels teixits de mamífers, i la COX induïble (COX-2) (Kargman i cols., 1996). Tots dos catalitzen l'oxidació d'AA a prostaglandina G2 (PGG2), que condueix a la prostaglandina H2 (PGH2) per l'acció de la peroxidasa, després les prostaglandines sintases específiques de teixit condueixen a totes les

diferents prostaglandines, prostaglandina D2 (PGD₂), prostaglandina F2 (PGF₂), prostaglandina E2 (PGE₂), prostaciclina (PGI₂) i tromboxà A2 (TXA₂) (Fitzpatrick, 2004; Kamoun i cols, 2020). El procés s'esquemmatitza a la Figura 2.

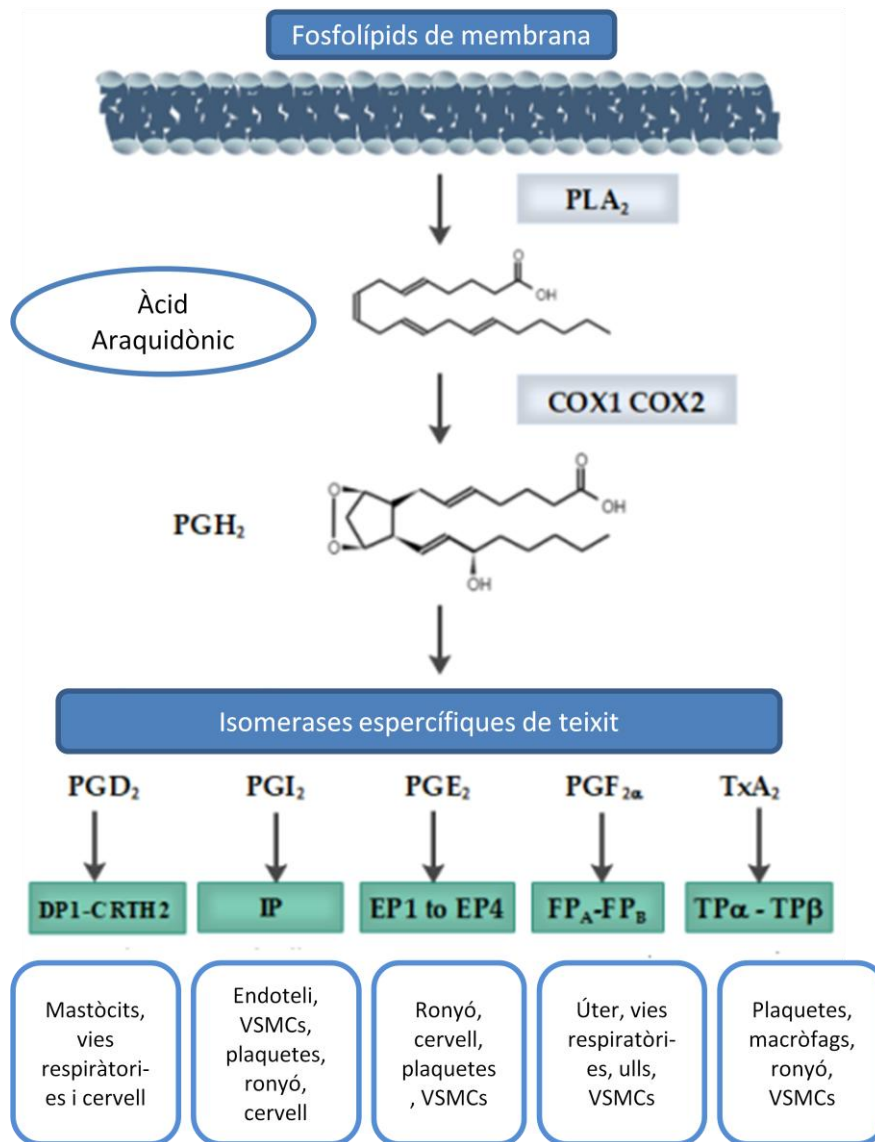


Figura 2: Esquema de síntesi de prostaglandines a partir de fosfolípids de membrana, inclosos enzims, substrats i receptors.

Un altre mediador de la inflamació és el Factor Activador de Plaquetes (PAF) (1-O-alkil-2-acetilsn-glicero-3-fosforilcolina). És un fosfolípid autocoide que es segrega a l'inici de la resposta inflamatòria, i és reconegut per un receptor receptor acoblat a proteïna G (PAFR) amb set dominis transmembrana. Aquest receptor present en nombrosos teixits i òrgans com ronyons, intestí prim, pulmons, cervell i fetge no és un receptor específic de PAF, ja que també reconeix i s'uneix a la Fosfatidilcolina rovellada (PAF-LL) i a compostos de la membrana bacteriana, com el lipopolisacàrid (LPS). L'activació de PAFR, dóna lloc a que la Fosfolipasa C (PLCβ) que hidrolitza el fosfatidil inositol 4,5-bisfosfat (PIP₂) per produir inositol trifosfat

(IP3) i diacilglicerol (DAG), que condueix a una elevació transitòria de calci (Ca^{2+}) citosòlic i a l'activació de la proteïna Kinasa C (PKC). L'augment del Ca^{2+} citoplasmàtic també activa la fosfolipasa A2 (PLA2) que pot conduir a la síntesi de més PAF i d'eicosanoides. Tot el procés condueix a un augment de la permeabilitat vascular, adhesió i infiltració de leucòcits, i també és responsable de l'estimulació de la contracció uterina (Riccardi i cols., 2018).

D'altra banda, hi ha un altre grup de mediadors cel·lulars de la inflamació i la resposta immune; les citocines. Són polipèptids produïts per diversos tipus de cèl·lules en resposta a diferents estímuls externs. Hi ha diferents tipus de citocines, incloses les interleucines i factor de necrosi tumoral (TNF), que intervenen directament en el procés inflamatori (Riccardi i cols., 2018). Les citocines es caracteritzen per ser proteïnes de baix pes molecular (15-25 kDa) secretades de forma transitòria i estrictament associades a la presència de material estrany o com a resposta a senyals endògenes de dany (Delves i cols., 2014).

- Les interleucines es classifiquen com a tal per ser proteïnes que exerceixen efectes funcionals sobre els leucòcits. S'han descrit al voltant de 34 interleucines (IL-1 a la IL-35) amb nombroses funcions efectores proinflamatòries (Delves i cols., 2014).
- El paper principal del TNF és de defensa amb una funció important en la resposta davant infeccions. Tot i que, una producció excessiva pot ser perillosa, ja que té efectes sobre l'endoteli vascular, augmenta la permeabilitat vascular i indueix l'expressió de proteïnes procoagulants que poden causar esdeveniments trombogènics intravasculars (Riccardi i cols., 2018).
- Existeix un altre tipus de citocines quimiotàctics, les quimiocines controlen la migració i residència de totes les cèl·lules immunes en els teixits. Tenen funcions homeostàtiques per al desenvolupament i manteniment dels teixits, controlen respostes d'immunitat innata i adaptativa. En la inflamació, la seva funció principal és guiar els leucòcits durant la seva reclutament a el focus inflamatori (Riccardi i cols., 2018).

Finalment, també hi ha un tipus de proteïnes plasmàtiques mediadores de la inflamació, el sistema del complement. Aquest té un paper fonamental en la resposta innata al reconèixer senyals de perill endògenes. A més, també contribueix a l'eliminació de patògens invasors actuant de pont entre la immunitat innata i adaptativa. Pel que fa a el control de la resposta inflamatòria s'uneix als complexos immunes i cèl·lules apoptòtiques, ajudant a la seva eliminació en el focus inflamatori (Riccardi i cols., 2018).

Antecedents de l'enzim COX

Els eicosanoides són crítics per a generar, mantenir i intervenir en la resposta inflamatòria, tot i que també tenen funcions homeostàtiques i rols importants en la

fisiologia cardiovascular i reproductiva entre d'altres (Riccardi i cols., 2018). Als 90 es va descobrir que l'expressió del gen de la COX-2 s'indueix en condicions d'inflamació (Xie i cols. 1991). D'altra banda la COX-1 va ser descrita com un protector de la mucosa gàstrica, entre d'altres teixits, ja que anys enrere diversos autors havien descrit que les prostaglandines PGE2 tenien efectes citoprotectors (Robert i cols., 1979), antiulcerosos (Wilson i cols., 1971; Main i Whittle, 1973) i es va trobar que la síntesi de PGE2 estava més relacionat amb la COX-1 que amb COX-2 (Jackson i cols., 2000). A mitjans dels 90, van reportar que la inhibició de COX-1 no causava dany gàstric espontani (Langenbach i cols., 1995; Langenbach i cols., 2002), i alguns anys després, noves troballes van associar l'expressió del gen COX-2 a la cicatrització de ferides (Karrasch i cols., 2006; Zhang i cols., 2020). Això va evidenciar que el concepte d'assignació de funcions homeostàtiques i patològiques a la COX-1 i COX-2 respectivament, era un enfocament massa pla o senzill, i no reflectia la realitat dels dos enzims.

Generalitats dels enzims COX-1 i COX-2

Aquests enzims són proteïnes globulars associades a la banda endoluminal de la membrana del reticle endoplasmàtic i del nucli. Sobre els anys 90 es va descobrir que la COX existeix en dues isoformes: COX-1 i COX-2. Estan presents en quantitats variables en determinats llocs de l'organisme desenvolupant diferents funcions fisiològiques. La COX és un compost intermedi altament reactiu que transforma una sèrie de productes terminals biològicament reactius que difonen passivament a l'ambient extracel·lular.

Les dues isoformes o isoenzims són COX-1 i COX-2 i desenvolupen la mateixa activitat catalítica. Actuen sobre el mateix substrat i són similars en la composició aminoacídica. La dosi necessària per inhibir cadascuna de les dues isoformes, proporciona un mètode per avaluar la seguretat i l'eficàcia de cada molècula, encara que sovint altes dosis terapèutiques poden determinar la inhibició de la COX alhora (Moses and Bertone, 2002). Un fàrmac que inhibeixi la COX-2 a concentracions més baixes respecte a aquelles necessàries per inhibir COX-1, és probablement més segur. Ja que amb més probabilitat la prostaglandina (PG) que deriva de la COX-2 serà majorment inhibida pel que fa a aquelles COX-1 dependents (Smith i cols., 2000).

La inhibició de la COX pot ser reversible o irreversible. *In vitro*, la selectivitat es basa en l'avaluació de la inhibició de la concentració-depenent de l'activitat de les dues isoformes de la COX i s'expressa per la relació de la concentració del fàrmac necessària per inhibir el 50% (IC50) de l'activitat de la COX-1 i de la COX-2 (IC50 ràtio COX-1/COX-2). Una ràtio COX-1/COX-2 més gran que la unitat indica que el fàrmac és selectiu per a la COX-2; una relació de la IC50 a prop de la unitat vol dir que el fàrmac és un inhibidor no selectiu de la COX; una ràtio per sota de la unitat és adient per fàrmacs inhibidors selectius de la COX-1 (Rang i cols., 2004; Streppa i cols., 2002).

A l'efecte inhibitori de la COX-2 s'han atribuït els efectes analgèsics, antipirètics i antiinflamatoris dels antiinflamatoris no esteroïdeus (AINEs), mentre la inhibició de la COX-1 està relacionada amb la toxicitat d'òrgans diana a nivell gàstric (Jackson i cols., 2000) o renal. Segons aquesta teoria, la toxicitat dels AINEs es correlaciona amb la manca de selectivitat a la inhibició de COX-1 i COX-2. L'esforç de la investigació ha estat enfocat a la síntesi de fàrmacs capaços d'inhibir selectivament la COX-2, sense que exerxeixin alguna influència sobre COX-1.

Distribució tissular de l'enzim COX-1

Aquesta isoforma constitutiva, fisiològicament és considerada la més important. El gen de la COX-1 forma part dels anomenats "house-keeping gens" o gens constitutius, s'expressa de manera constitutiva en gairebé totes les cèl·lules de l'organisme. La seva expressió és constant i també realitza funcions de manteniment.

Es localitza a nivell del reticle endoplasmàtic (Rang i cols., 2004). La COX-1 s'incrementa de dos a quatre vegades després d'un estímul inflamatori (citoquines, endotoxina, factors de creixement, etc.) (Donalisio i cols., 2013). És responsable de la biosíntesi immediata de la PG, la formació fisiològica de tals compostos que estan involucrats en funcions homeostàtiques i reguladores, amb la conseqüent protecció i integritat del tracte GI proximal, del flux sanguini renal, de la funcionalitat plaquetària i la comunicació intercel·lular (Hata and Breyer, 2004; Duz i cols., 2015).

La COX-1 es troba a nivell renal (porció medul·lar i cortical), en les artèries i arterioles, glomèruls i conductes col·lectors (Schneider i cols., 2004).

En el sistema nerviós central (SNC) es distribueix uniformement, expressada a nivell del proencèfal (Samad i cols., 2002). Es creu que les PGs produïdes en aquesta porció cerebral estan involucrades en la modulació de el sistema nerviós autònom i d'alguns processos sensorials (Kaufmann i cols., 1997).

A nivell cardiovascular es localitza en les plaquetes, on promou la síntesi de TXA₂; prostanoides implicat en la regulació del mecanisme d'activació de l'agregació plaquetària. A més, s'expressa en l'endoteli i el múscul llis vascular, encara que amb menor rellevància que la COX-2, on contribueix a la síntesi de la prostaciclina i a desenvolupar una activitat antiagregant plaquetària. Per finalitzar, promou la relaxació de la musculatura llisa (Morita, 2002).

En el tracte gastro intestinal (GI) s'expressa constitutivament en totes les regions, encara que no de manera homogènia. En resum els prostanoides produïts a partir de COX-1 estan involucrats en els mecanismes de protecció i regulació de la mucosa digestiva i la de les funcions secretora i motora (Fornai i cols., 2010). La

COX-1 inhibeix la secreció gàstrica àcida, estimula la secreció de moc i potencia el flux hemàtic de la mucosa.

En resum, el bloqueig tissular d'aquesta isoforma enzimàtica de la COX per part d'alguns fàrmacs (com per exemple els AINEs) contribueix de forma significativa a l'aparició de lesions ulceratives a la mucosa digestiva (Parente and Perretti, 2003).

Distribució tissular i funcions de l'enzim COX-2

La COX-2 és predominantment induïble i està associada a la inflamació. És produïda després d'una lesió i s'incrementa dramàticament amb la inflamació i la consegüent presència de mediadors inflamatoris com les citoquines (Dubois i cols., 1998). En condicions de flogosis pot augmentar de 10-20 vegades en macròfags, monòcits, sinoviocitos, condrocits, fibroblasts, osteoblasts i cèl·lules endotelials (Campbell i cols., 2002). Per tant, si un fàrmac pot tenir inhibició selectiva per COX-2 i no afectar fisiològicament la funció COX-1, els efectes secundaris com l'úlcera GI poden ser evitats.

La COX-2 intervé en la biosíntesi retardada dels prostanoids. La seva expressió és induïda per una notable varietat d'estímuls, com ara els factors de creixement, el fibroblàstic (FGF); les citoquines proinflamàtòries (IL-1, TNF); factors cancerogènics (Soslow i cols., 2000) i els lipopolisacàrids.

D'altra banda, en condicions basals o estat de repòs, s'expressa de manera constitutiva en teixits com el cervell, parets dels vasos, ronyó (Kömhoff i cols., 2000; Harris, 2002), en l'aparell reproductiu de la femella (úter i ovaris), en els illots pancreàtics (Mitchell i cols., 1993; Schwab i cols., 2000; Fosslie, 2000; Yasojima i cols., 1999), a la tràquea i en les gònades (Turini i Dubois, 2002). En canvi, en el tracte GI la seva expressió és baixa i insignificant.

En el SNC es distribueix sobretot en l'escorça cerebral, en l'hipocamp i en la medul·la espinal, on la seva expressió no és estable però pot ser regulada per canvis fisiològics o patològics donats per l'activitat neuronal (Schwab i cols., 2001). Això suggereix que les PGs contribueixen a la regulació de la transmissió nerviosa i a inhibir selectivament la COX-2, exercint efectes terapèutics, bloquejant l'activitat enzimàtica d'aquesta isoforma a nivell del SNC. A més, regula la funció del centre termoregulador hipotalàmic i facilita la transmissió del dolor a la medul·la espinal (Schwab i cols., 2000; Samad i cols., 2002). En pacients amb Alzheimer l'expressió de COX-2 resulta augmentada en zones cerebrals que controlen l'àrea cognitiva i de memòria com l'escorça i l'hipocamp (Pasinetti, 2001).

En el tracte GI, s'indueix ràpidament després processos inflamatoris o malalties neoplàsiques de la mucosa, com en *Helicobacter pylori*. Aquest fet incrementa

l'alliberament de PGE2 a partir de cèl·lules gàstriques *in vitro* i causa un augment de l'expressió de COX-2.

A nivell cardiovascular, la COX-2 es troba de manera constitutiva en les cèl·lules endotelials i musculars llises dels vasos. Per tant, la COX-2 està involucrada en els mecanismes de defensa de la paret vascular. La COX-2 contribueix a la regulació de la producció endotelial de PGs, que té activitat vasodilatadora i antitrombòtica.

A nivell de la pell la COX-2 es troba expressada en cèl·lules sanes (Leong i cols., 1996), així com també en cèl·lules de pell carcinogèniques induïdes mitjançant irradiació ultraviolada (Athar i cols., 2001; Buckman i cols., 1998). A la pell humana, s'expressa de manera induïble en presència de melanoma maligne (Pires i cols., 2010) i el mateix succeeix en la pell de ratolí (Park i cols., 2001). En la pell de canins amb inducció d'una ferida, la COX-2 va ser detectada entre els dies 1 i 7 (Hamamoto i cols., 2009), similarmet va ser detectada en conills després d'haver induït una ferida a la pell (Bai i cols., 2008).

Quan la COX-2 és induïda en resposta a un estímul, els nivells superen generalment els de la COX-1 (10-100 vegades) presents dins el mateix context cel·lular. Aquest fet s'associa a una producció de major quantitat de PG (fins a 1000 vegades més).

Darrerament, s'ha descobert una nova enzim, la COX-3 (Chandrasekharan i cols., 2002; Pradilla O. E., 2004). És una forma variant de la COX-1 i s'ha identificat al cervell caní. Aquesta isoforma s'ha reportat que és més sensible a la inhibició del paracetamol respecte a la COX-1 i la COX-2 *in vitro* (aquest efecte sembla ser dependent de la concentració d'AA exogen). La COX-3 Sembla estar codificada pel mateix gen que codifica la COX-1, però el mRNA resultant s'acobla de forma diferent. Fins al moment no es coneix prou informació respecte a la seva producció i al seu efecte biològic. A més, altres investigacions suggereixen l'existència de nombroses variants, tant de la COX-1, com de la COX-2. Arribar a comprendre el significat biològic d'aquesta variant podria donar noves llums en relació a nous aspectes de la fisiologia de certs teixits i per tant, obrir noves perspectives en la teràpia farmacològica (Dubois i cols., 1998; Luong i cols., 1996).

El dolor

Un dels signes clínics associats a la inflamació és el dolor. És difícil fer una bona descripció del dolor, però la més acceptada actualment és la de l'Associació Mundial per a l'estudi del Dolor (IASP), que el defineix com "una experiència sensitiva i emocional desagradable, associada a una lesió tissular real o potencial, o descrita en termes d'aquest dany "(Egger i cols (a), 2014).

Hi ha diverses classificacions de tipus de dolor en funció de la seva durada, patogènia, localització, curs, intensitat, factors pronòstic de control de el dolor i segons la seva farmacologia.

Una de les classificacions més acceptades (Clifford J. i col. 2004) descriuen 4 tipus primaris de dolor: Nociceptor, inflamatori, neuropàtic i funcional (Figura 3).

- Dolor nociceptiu: Dolor transitori en resposta a un estímul nociu.
- Dolor inflamatori: Dolor espontani i hipersensibilitat a el dolor en resposta a danys en els teixits i la inflamació.
- Dolor neuropàtic: Dolor espontani i hipersensibilitat a el dolor en associació amb dany o lesió de el sistema nerviós.
- Dolor disfuncional: Hipersensibilitat a el dolor com a resultat d'un processament anormal a nivell central d'un estímul normal.

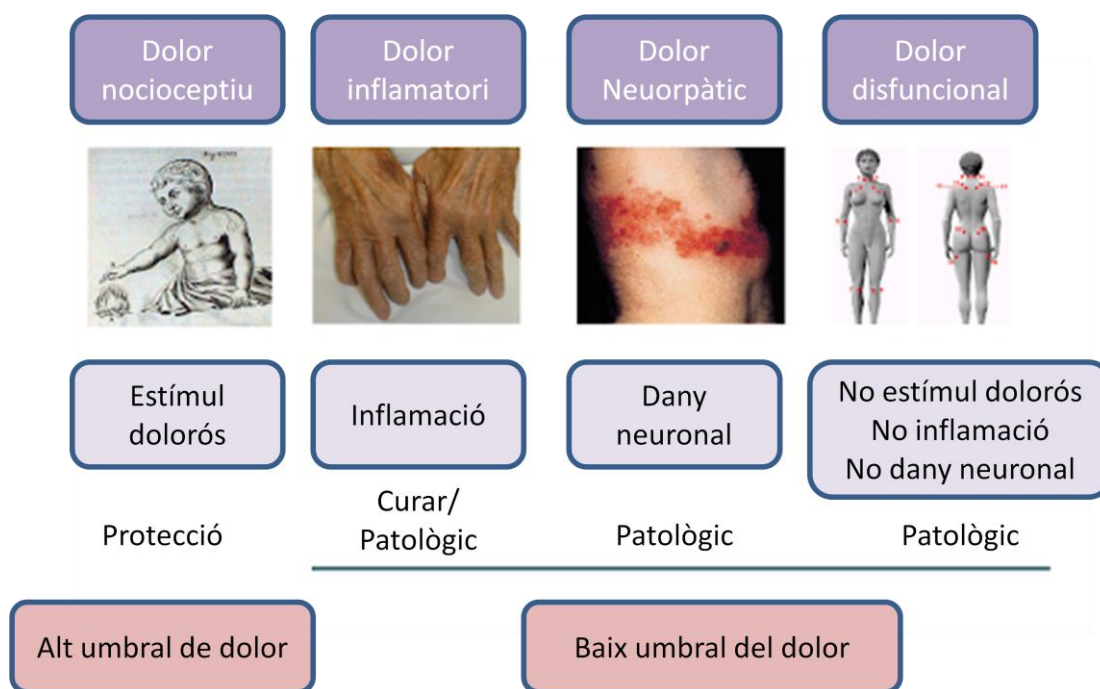


Figura 3: Classificació de tipus de dolor.

Hi ha hagut un progrés considerable des del començament de la dècada de 1990 en investigació del dolor en animals i en la nostra comprensió de la fisiologia i farmacologia, cosa que permet fer grans avenços en la seva gestió. Tot i així, el dolor continua sent un gran problema de benestar per als animals.

El dolor pot afectar la gana i els hàbits de son d'un animal (per exemple fatiga), el grooming (per exemple, l'automutilació), la capacitat d'experimentar plaers normals (per exemple joc reduït i interacció social), disfunció de personalitat, temperament i funció intestinal (per exemple restrenyiment) (Egger i cols (a), 2014; Ruel i cols. 2020).

Es sap molt sobre el reconeixement i la valoració del dolor a animals. No obstant, es necessita més treball per desenvolupar una informació vàlida i fiable per els sistemes de puntuació del dolor per a totes les espècies. La percepció del dolor animal afecta directament en l'ús d'analgèsics per part dels veterinaris, ramaders i

propietaris d'animals de companyia. Això es pot solucionar millorant l'educació de les persones implicades.

Fisiologia del dolor

El dolor en els animals s'ha definit com “una experiència aversiva sensorial i emocional que representa una presa de consciència o amenaça per a la integritat dels teixits; fa canviar la fisiologia de l'animal i el seu comportament per tal de reduir o evitar danys i promoure la recuperació” (Egger i cols (a), 2014).

El dolor és intrínsecament “desagradable” i posseeix una enorme capacitat per captar l'atenció, interferir en qualsevol activitat que es estigui realitzant i mobilitzar els recursos i les estratègies de defensa. A més, alguns ho consideren com la senyal d'un “estat de necessitat” corporal (com la set o la fam), que prepara per organitzar la reparació i la recuperació d'una possible lesió (Plaghki i cols. 2018).

Els sistemes sensorials informen el cervell sobre l'estat de l'entorn i del medi intern de l'organisme. La nocicepció i la seva expressió més elaborada en el pla cognitiu, el dolor, constitueixen una senyal d'alarma que protegeix l'organisme. La finalitat és disminuir la causa que les va produir i així limitar les conseqüències. Els estímuls «nociceptius» tenen en comú la propietat d'amenaçar la integritat de el cos i activar un discret conjunt d'òrgans sensorials, els nociceptors. Desencadenen una variada, però limitada, respostes reflexes i conductuals que poden associar-se a la percepció d'un dolor (Egger i cols (a), 2014; Ruel i cols. 2020).

El sistema nociceptiu pot ser activat per una gran varietat d'energies (mecànica, electromagnètica, elèctrica, tèrmica, química, etc.). Si aquests estímuls nociceptius desencadenen a més una percepció de dolor, es denominen algògens. Si són nocius, provoquen una lesió que es acompanya d'una reacció inflamatòria caracteritzada per els signes cardinals clàssics prèviament esmentats: dolor, rubor, calor, tumefacció i edema (Plaghki i cols. 2018).

La fisiologia del dolor es divideixen en 4 fases: transducció, transmissió, modulació i percepció (Figura 4).

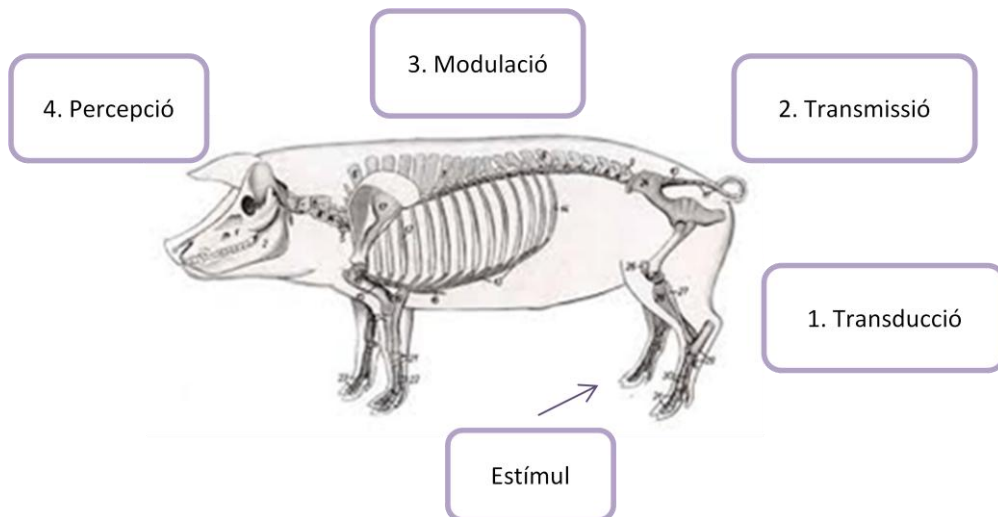


Figura 4: Vies implicades en la nocicepció.

Transducció

Les fibres perifèriques o nociceptors es classifiquen en tres categories (Plaghki i cols. 2018).:

- Les fibres A β , posseeixen una baina de mielina gruixuda (diàmetre: 6-20 μm) i condueixen ràpidament l'impuls nerviós.
- Es fibres A δ , poc mielinitzades (diàmetre: 1-5 μm), que condueixen l'impuls nerviós a una velocitat mitjana (4-30 m/s).
- Les fibres C, no mielinitzades (diàmetre: 0,3-1,5 μm), que condueixen lentament l'impuls nerviós (0,4-2 m/s).

Les fibres A β responen a dolor molt aguts i informacions tàctils (com per exemple una punxada o pessic). Els últims dos grups codifiquen i transmeten les informacions nociceptives i tèrmiques.

En els teixits lesionats o inflamats, la presència de substàncies com la bradicinina, histamina, prostaglandines, leucotriens o la serotonina provoquen que els nociceptors augmentin la seva sensibilitat, de manera que estímuls de molt poca intensitat (per exemple un lleu toc) són suficients per generar un senyal dolorosa. A aquest fenomen se li coneix com sensibilització i es produeix tant a nivell somàtic com visceral (Del Arco, 2015).

Transmissió

Les fibres perifèriques, a més de desencadenar el senyal, alliberen mediadors, com la substància P, que produeix vasodilatació, desgranulació de mastòcits i indueix la producció i alliberament de mediadors inflamatoris. Les fibres aferents penetren en la medulla espinal a través de les arrels dorsals i acaben en les astes posteriors

de la medul·la espinal (APME) fins a les astes posteriors de la substància grisa (Del Arco, 2015).

Modulació

Un cop les fibres aferents arriben a la substància grisa contacten amb neurones medul·lars que porten el senyal a les regions cerebrals encarregades de la percepció de dolor.

Les neurones medul·lars transporten la senyal al tàlem contralateral, des d'on és conduïda a l'escorça frontal i somatosensitiva. A més d'aquests, hi ha altres circuits neuronals que intervenen en la modulació de el dolor i que estan implicats en els seus factors afectius i emocionals (Plaghki i cols. 2018).

Percepció

Les neurones medul·lars porten el senyal a les regions cerebrals encarregades de la percepció del dolor. El resultat final és la modificació de la permeabilitat iònica i la gènesi d'impulsos nerviosos que viatgen al SNC i donen la sensació del dolor (Del Arco, 2015).

Antiinflamatoris No Esteroïdals

Història dels AINEs

L'origen dels antiinflamatoris es remunta a l'ús d'extractes d'escorça de salze (*Salix alba* i altres espècies *Salix*) que contenien salicilats per al tractament d'episodis inflamatoris i de dolor. Les primeres evidències de l'ús de l'escorça de salze són del 400 A.C. en l'època d'Hipòcrates. Va ser ja en segle XIX quan hi va haver un enorme augment en l'interès i desenvolupament terapèutic dels salicilats (Rainsford i Path, 1984).

Va haver-hi dos períodes importants en el descobriment de fàrmacs AINEs. El primer va ser després de la Segona Guerra Mundial, el període fins a la dècada de 1970. L'altre període va ser l'última part del segle passat en que l'efecte dels AINEs en la síntesi de prostaglandines va formar part del cribratge en el procés de desenvolupament de diferents fàrmacs. Els medicaments desenvolupats fins a la dècada de 1980-finals dels 90 es van descobrir en gran mesura empíricament a través de la detecció d'activitats antiinflamatòries, analgèsiques i antipirètiques en models d'animal de laboratori. En la dècada de 1990 es fa un important descobriment en el camp de la biologia cel·lular i molecular sobre l'enzim COX. Tal i com s'explica a la secció d'inflamació, es descobreix i es caracteritzen dues isoformes de la COX, COX-1 i COX-2, i es relaciona cadascuna d'elles amb diferents prostanoids (Kargman i cols., 1996).

En l'actualitat els AINEs suposen un grup de medicaments dels més consumits a nivell global, sent la pedra angular de l'ús del dolor tant en pacients que tenen dolor inflamatori agut (per exemple, mal de cap, dolor postoperatori i fractures ortopèdiques), com dolor crònic (per exemple, artritis reumatoide, osteoartritis i gota) (Castellsagué i cols., 2012; McCarberg i Gibofsky, 2012).

Generalitats dels AINEs

Els antiinflamatoris es classifiquen en dos grans grups, els antiinflamatoris esteroïdals (glucocorticoides) i els AINEs. Els esteroides són corticosteroides naturals (hormones produïdes per l'escorça suprarenal) o semi-sintètics amb característiques estructurals i farmacològiques similars als naturals, encara que generalment més potents. Els efectes antiinflamatoris i immunosupressors dels glucocorticoides depenen de diversos mecanismes moleculars. Els AINEs són un grup químicament molt heterogeni que inhibeix la COX, COX-1 i COX-2, i amb això la síntesi de prostaglandines (Wongrakpanich i cols., 2018; Duman i cols., 2020).

Els AINEs són molècules amb una estructura diversa. La major part són àcids orgànics febles i contenen una porció aromàtica no esteroidea que els confereix cert grau de liposolubilitat. Les seves principals propietats són a nivell antiinflamatori, analgèsic i antipirètic, sent la seva indicació principal el tractament de tots els tipus de dolor, tant de presentació aguda com crònica.

Els AINEs estan indicats en patologies d'origen múscul-esquelètic, condicions de dolor reumàtic extra-articular, estats posttraumàtics, dolor postoperatori, dismenorrea primària, dolor oncològic, dental, migranya, etc. (Larsen i cols., 2008).

En medicina veterinària els AINEs s'utilitzen per al tractament de les patologies més comunes en mamífers i altres espècies, per exemple en l'artrosi crònica en el gos i el gat i, en l'estudi de models animals en patologies articulars. Sovint són els fàrmacs d'elecció en tractaments crònics (Aragon i cols., 2007; Jiang i cols., 2010). Actualment existeixen molècules com el Carprofè (CP), pertanyents a el grup dels oxicams i a el grup dels coxib per a ús prolongat en canins i felins. En els últims anys s'han realitzat estudis en aquestes espècies a fi de valorar la seguretat i la tolerabilitat de determinades molècules pertanyents a aquesta classe farmacològica per a tractaments prolongats (per exemple 90 dies). Aquest estudis han demostrat una certa seguretat per a la seva administració com és el cas del CP, meloxicam, mavacoxib i ferocoxib (Payne-Johnson i cols., 2014; Cox i cols., 2011; Huskisson i cols., 1996).

A nivell tòpic i extern els AINES s'usen en diferents condicions patològiques que afecten la pell (Patel i Stockfleth, 2007; Sandelin i cols., 1997), mucoses (Singh i Roberts, 1994) i ulls (Kim i cols., 2010). Tanmateix, es poden utilitzar en processos

aguts per al tractament de dolor moderat o en règim d'analgèsia multimodal (Langford i Mehta, 2006).

Mecanisme d'acció dels AINEs

Els AINEs representen un grup heterogeni de fàrmacs químicament diferents entre ells que es caracteritzen per un mecanisme comú subjacent als seus efectes terapèutics. El seu mecanisme d'acció es basa en la inhibició de la producció de la PG, al seu torn derivada de l'AA, a través de la inhibició de la COX (Vane, 1971).

L'efecte dels AINEs és inhibir la síntesi de prostanoides; ja que tenen un paper important en la gènesi de la simptomatologia clínica de diversos tipus d'inflamació, actuant sobretot com amplificadors dels efectes d'altres mediadors comunament involucrats en el procés fisiològic.

Donada la seva acció farmacològica, col·lateralment, es presenta algun efecte GI i renal, a causa en gran part de la inhibició de la COX-1 (Rang i cols., 2004; Duman i cols., 2020).

Propietats farmacològiques dels AINEs

La inflamació es classifica en aguda o angioflogosis (inici immediat de minuts o dies), i inflamació crònica o histoflogosis (de durada variable: de dies a anys). La angioflogosis es resoldrà a l'eliminar l'agent nociu, o pot comportar a una altra conseqüència més greu, incloent la histoflogosis (Soehnlein i Lindbom, 2010).

Una lesió que implica una inflamació crònica, per naturalesa és infecciosa i alhora amb cossos estranys. Aquestes es poden classificar de la següent manera: malalties al·lèrgiques, autoimmunes, degeneratives i immunomediades (fracàs a l'eliminar la causa flogògena).

En els teixits afectats per la inflamació pot causar danys greus, tant pel dolor associat, com pel dany tissular provocat. Quan s'han afectat òrgans vitals o tot l'organisme, la inflamació pot posar en perill la vida del pacient (Zizzadoro i cols., 2011).

En els casos en que la temperatura augmenta, per exemple en animals entre els 39 i 40°C, per cada grau addicional s'obté una acceleració en la reacció bioquímica cel·lular del 13%. A més, s'accelera l'activitat de les enzims destructives del teixit que són molt actives en la fase aguda de la inflamació. En aquesta fase s'accelera el metabolisme cel·lular: les reaccions bioquímiques cel·lulars, enzimàtiques i metabòliques vénen accelerades, catalitzant la curació del teixit (Delavary i cols., 2011).

En relació a l'efecte analgèsic, els AINEs són eficaços en els tipus de dolor en el qual la PG sensibilitza les terminacions nociceptives, exercint una acció directa o reduint el llindar per a la despolarització neuronal (Langford i Mehta, 2006; Duman i cols., 2020).

Els receptors del dolor o nociceptors són les terminacions específiques de les neurones aferents que només s'activen per estímuls lesius. Existeixen diferents tipus de nociceptors distribuïts en la pell, en les estructures profundes i en les vísceres, que són estimulats per agents mecànics, tèrmics i químics (PGs, bradiquininas, histamina, serotonina, substància P, hidrogen, potassi) (Alloui i cols., 2006; Giordano, 2005).

Dins d'altres funcions que poden tenir els AINEs estan les següents:

- Efecte anti-pirètic: és degut a la inhibició de la síntesi de PG en les cèl·lules endotelials dels vasos sanguinis hipotalàmics en resposta a pirògens exògens i endògens (disminució de la temperatura només en cas de febre sense interferència de la temperatura corporal normal) (Blatteis i cols., 2005).
- Efecte anti-agregant: ve donat per la inhibició de la síntesi de la COX-1 intervinguda pel TXA2. Aquest efecte en clínica és utilitzat per al tractament de la laminitis equina, filariosi cardiopulmonar en el gos i miocardiopatia en el gat, pel fet que les plaquetes madures són incapaces de sintetitzar nova COX.
- Efecte antitumoral: el paper dels AINEs amb potencial efecte antitumoral s'està consolidant cada dia més, a causa de la inhibició de l'efecte facilitador dels prostanoids sobre el creixement del tumor. Aquests efectes consisteixen en la participació simultània de COX-1 i COX-2 (Sorenmo i cols. 2004). En diversos estudis s'ha demostrat a nivell *in vitro* l'efecte en diferents línies cel·lulars.

Classificació dels AINEs

Aquest grup de fàrmacs es pot classificar segons l'estructura química, el mecanisme d'inhibició de la COX i en base de l'isoenzim COX que inhibeixen (Praveen i Knaus, 2008; Frolich, 1997; Moses i Bertone, 2002). Des del punt de vista químic, són heterogenis però comparteixen un mecanisme d'acció comú que els agrupa en la mateixa classe farmacològica.

Químicament es divideixen en 13 grups (Taula 1).

Tabla 1: Classificació química dels AINEs.

Grup	Fàrmac
Salicilats	Àcid acetilsalicílic (ASA).

Salicilats no acetilats	Salicilat de colina, salicilat de sodi, salicil-salicilat.
Derivats de l'àcid propiònic	CP, ibuprofè, fenoprofè, ketoprofè, naproxè, flurbiprofè.
Derivats de l'àcid pirrol alcanòic	Tolemtamina
Derivats pirazòlics	Fenilbutazona
Derivats indòlics	Indometacina
Derivats de l'àcid fenilacètic	Diclofenac
Fenamats	Àcid meclofenàmic, tolfenàmic, flufenàmic, mefenàmic, nifúmic i etofenàmic
Aril-antiacilics	Flunexin meglumina.
Oxicams	Piroxicam, meloxicam, tenoxicam.
Alcanonis	Nabumetone
Sulfanilids	Nimesulida, flosulide, NS-398.
Diaril eterocíclics	Celecoxib, rofecoxib, valdecoxib, etoricoxib, parecoxib, SC-560, DUP 697.

Amb base al mecanisme d'inhibició de la COX es divideixen en tres classes (Taula 2).

Tabla 2: Mecanisme d'inhibició de la COX.

Classe	Mecanisme de inhibició (COX)	Fàrmac
Classe 1	Inhibició simple, competitiva, reversible	CP, paracetamol, indometacina, etodolac, diclofenac, ketorolac, ibuprofè, naproxè, flurbiprofè, ketoprofè, piroxicam, meloxicam, fenilbutazona, nabumetone, flunixin meglumina, celecoxib, rofecoxib, nimesulide.
Classe 2	Inhibició temps-depenent, competitiva, reversible	Grup dels fenamats com l'àcid meclofenàmic.
Classe 3	Inhibició temps-depenent, competitiva, irreversible	ASA

En base a la inhibició de l'isoenzim COX es divideixen en cinc classes (Taula 3).

Tabla 3: Inhibició de l'isoenzim COX.

Inhibició específica COX	Fàrmac
Inhibidor no específic de la COX	Ibuprofè, naproxè, flunixina meglumina, indometacina.

Inhibidor específic de la COX-1	SC-560, ASA a dosis baixa.
Inhibidor preferencial de la COX-1	Indometacina, flunixinina meglumina.
Inhibidor preferencial de la COX-2	CP, etodolac, meloxicam, nimesulide, diclofenac y fenamats.
Inhibidor específic de la COX-2	Celecoxib, rofecoxib, etoricoxib, valdecoxib, parecoxib, DUP-697, NS-398.

Reaccions adverses dels AINEs

Com és conegut, els AINEs a més de presentar diversos avantatges, també s'associen a certs efectes adversos en el que influeixen diversos factors (com per exemple l'ús crònic d'aquests). En medicina veterinària es requereix de certes prevencions segons l'espècie.

En el cas dels carnívors, a causa de l'ambient gàstric àcid (pH~2), els AINEs es presenten en la forma no dissociada soluble en lípids que permeten una separació ràpida de la membrana de la cèl·lula epitelial que revesteix la mucosa gàstrica. Amb la successiva dissociació del fàrmac a nivell cel·lular (pK 7.0-7.4) el fàrmac abandona lentament la cèl·lula per arribar a el torrent sanguini. Per tant, hi ha una acumulació intracel·lular progressiva (captura iònica) i consegüentment una inhibició completa de l'activitat COX en aquestes cèl·lules. Això explica la sensibilitat del carnívor a les accions lesives dels AINEs sobre l'estómac i en la porció proximal del duodè. Una solució parcial a això és administrar el fàrmac amb l'estómac ple. D'altra banda, la semivida presenta més variabilitat entre un fàrmac i un altre. Tanmateix es pot prolongar interiorment quan l'eliminació és per via biliar en el cas de la recirculació enterohepàtica. Això comporta una prolongació de l'exposició a la mucosa entèrica a el fàrmac i per tant, l'acció lesiva pot ser més gran.

En els episodis crònics, les reaccions adverses es succeeixen a nivell hepàtic, renal, cardio-circulatori i GI. En aquest últim, els AINEs poden provocar dispèpsia, lesió gàstrica generalment en pacients en situació de risc. Per exemple, es pot donar la presència d'úlceres i hemorràgies amb una incidència de quatre a cinc vegades superior respecte a les observades en subjectes que no utilitzen fàrmacs d'aquesta classe (Hernández-Díaz i García-Rodríguez, 2001).

En tractaments crònics, els pacients geriàtrics s'han de monitoritzar permanentment. En cas de qualsevol signe de toxicitat s'ha de suspendre la seva administració. De la mateixa manera, s'ha de valorar l'ús selectiu dels COX-2 en pacients amb patologia GI, renal, cardíaca i hipertensos GI (Rang i cols., 2004).

En certs casos les lesions dels AINEs són asimptomàtiques i d'un efecte lleu o inadvertit que desapareixen després de suspendre el tractament. El risc dels efectes GI derivats dels AINEs es pot reduir amb misoprostol, un anàleg de la PG.

També es pot utilitzar el sucralfalt com a protector de la mucosa gàstrica, estimulant la producció local de PG i l'angiogènesi. Per últim, es pot fer servir l'ús de fàrmacs secretolítics com els antagonistes dels receptors H_2 (antagonistes d' H_2). D'altra banda, per disminuir la incidència dels efectes renals s'ha de administrar una fluïdoteràpia adequada.

Un altre tipus de complicació que es pot presentar és en el gat. En aquesta espècie no es pot administrar el paracetamol degut als nivells baixos de l'enzim glucoronil transferasa per catalitzar la seva reacció.

Carprofè

Es tracta d'un AINE que pertany a la classe de l'àcid propiònic. Es compon d'una barreja racèmica de dos enantiòmers R(-) i S(+). S'utilitza com a analgèsic, antipirètic (Griswold i Adams, 1996) i antiinflamatori (Maire-Gauthier i cols., 1998). Sobre els anys 80 va ser usat en humans com analgèsic, posteriorment en la dècada dels 90 va ser retirat del mercat i en l'actualitat només s'utilitza en medicina veterinària (Kerr i cols., 2008), comercialitzat en forma oral i injectable.

El CP és un compost que posseeix poca solubilitat en aigua i una baixa biodisponibilitat (Chen i cols., 2003) (Figura 5).

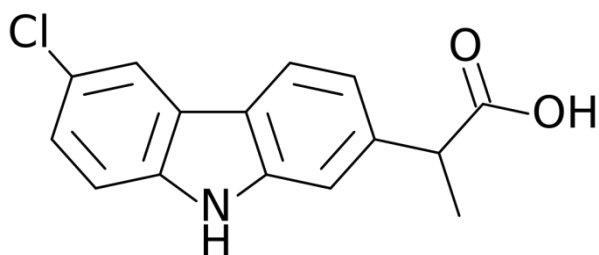


Figura 5: Estructura química del CP.

El mecanisme d'acció es basa principalment en la inhibició de l'isoenzim induïble COX-2 (Simmons i cols., 2004), però amb certes diferències en funció de l'espècie animal estudiada. Generalment té selectivitat per inhibir l'isòmer COX-2, la qual ha estat demostrada en gossos (Ricketts i cols., 1998; Streppa i cols., 2002). Estudis *in vitro* en plasma equí demostren que hi ha selectivitat per la COX-2 (Williams i cols., 1995), mentre que en gats pot ser potencialment selectiva (Brideau i cols., 2001). Aquest compost és utilitzat en el tractament simptomàtic i crònic de dolor en patologies osteoarticulares, com en l'osteoartritis, sense reconeguts efectes secundaris (Sanderson i cols., 2009). També és usat com a analgèsic a nivell perioperatori (Bergmann i cols., 2007; Sidler i cols., 2013). A nivell experimental i en clínica s'administra parenteralment en diverses patologies oculars en que disminueix la inflamació (Pinard i cols., 2011; Krohne i cols., 1998).

Aquest fàrmac té la capacitat de modificar el curs d'una malaltia, com en l'osteoartritis induïda, tant *in vitro* com *in vivo* en gossos (Sanderson i cols., 2009). En altres animals com l'espècie bovina (Bv) és usat com a coadjuvant en la teràpia per al control agut de la inflamació associada a malalties respiratòries (Elitok i Elitok, 2004). Tanmateix s'ha estudiat la seva eficàcia en el control de la mastitis Bv (Vangroenweghe i cols., 2005), demostrant que té una gran capacitat com a fàrmac antiinflamatori (Karol, 1996; Brentnall i cols., 2012a).

La farmacocinètica (PK) del CP, ha estat estudiada en diverses espècies com en humans (Ray i cols., 1979; Crevoisier, 1982), cavall (Armstrong i cols., 1999), vaca (Lohuis i cols., 1991), vedells (Delatour i cols., 1996; Brentnall i cols., 2012b), ovelles (Welsh i cols., 1992; Cheng i cols., 2003; Mealey et al., 2004), cabres (Yu i Perel, 1980), gos (Clark i cols., 2003; Messenger i cols., 2015), gat (Taylor i cols., 1996), conill (Hawkins i cols., 2008) i rata (Iwakawa i cols., 1991). Per la diversitat d'espècies, en conseqüència, hi ha una variabilitat interespècie, el qual dificulta l'enteniment en el mecanisme d'acció i la esteroespecificitat d'aquesta molècula. D'aquí la importància de realitzar estudis farmacocinètics i farmacodinàmics específics per a cada espècie. En aquesta tesis hem volgut estudiar més la farmacocinètica del CP en l'espècie porcina. Ja que fins l'actualitat, els estudis realitzats en aquesta espècie eren molt escassos.

Pel que fa als enantiòmers, l'administració intravenosa (IV) de CP racèmic en gats, conills, ovelles, vedells, i cavalls presenta una major àrea sota la corba (AUC) de l'enantiòmer R(-) en comparació a l'S(+). De la mateixa manera, l'administració per via subcutània (SC) en conills i gats presenta una major AUC l'enantiòmer R(-).

En plasma el nivell de l'enantiòmer S(+) és més gran després d'una administració IV del CP racèmic en rata i en gossos afectats d'osteoartritis. En cavalls, vaques, ovelles i gats la concentració plasmàtica de R(-) és major a l'administrar el CP racèmic IV, igual que en una administració SC en gats i vedells i en una administració oral (AO) en gossos. Tenint en compte tota aquesta informació es dedueix la gran variabilitat existent en la PK per els enantiòmers en les diferents espècies de mamífers, la qual cosa a nivell clínic pot derivar a certes diferències.

L'eliminació del CP per l'organisme es dona per glucuronidació. Aquest procés està catalitzat per enzims de la família uridin 5'-diphospho-glucuronosyltransferase (Court, 2014) que es troben predominantment en el fetge (Fang i cols., 2015; Kuehl i cols., 2005). El CP presenta també variabilitat per als enantiòmers en el procés de glucuronització (Maire-Gauthier i cols., 1998). Pel que fa al CP racèmic l'eliminació és menor en gats que en vedells i vaques. En rates i conills l'eliminació per R(-) és més gran que per a S(+) (Iwakawa i cols., 1991; Hawkins i cols., 2008). El temps mitjà de residència i la semivida d'eliminació per a R(-) és més gran que per a S(+) després de l'administració IV en vaques (Lohuis i cols., 1991), gats (Taylor i cols., 1996), cavalls (McKellar i cols., 2002) i ovelles (Cheng i cols., 2003). En humans la semivida és de 9.91 ± 0.79 hores després d'una administració IV (Crevoisier, 1982). En humans els glucurònids conjugats de tots dos enantiòmers s'excreten de manera similar en l'orina. En gossos l'enantiòmer R(-) és predominantment en el

plasma, mentre que S(+) és més gran en l'orina i en la bilis. En gossos R(-) i S(+) s'excreten com glucurònids conjugats en la bilis (Clark i cols., 2003).

Per últim, cal ressaltar que en presència de processos inflamatoris la concentració de CP és més gran en teixit afectat que en el plasma (McKellar i cols., 2002).

Estudis de farmacocinètica

Hi ha diferents definicions per a la farmacocinètica que pretenen delimitar el contingut científic i objectius d'aquesta disciplina. Una de les definicions més completa seria la ciència que s'encarrega de l'estudi dels processos als quals es sotmet un fàrmac mentre passa per l'organisme. Tracta d'estudiar i comprendre què és el que li passa des que s'administra fins a la seva eliminació de el cos. Una altra definició més completa és la que considera la farmacocinètica com la disciplina encarregada de l'estudi dels processos d'alliberació, absorció, distribució, metabolisme i excreció (LADME) dels fàrmacs, de les seves bases fisiopatològiques i de les seves implicacions tant en el disseny de nous fàrmacs i formes farmacèutiques com en l'optimització dels tractaments farmacològics (Doménech i cols., 2012).

Gràcies a l'estudi de la farmacocinètica es pretén resoldre problemes terapèutics com individualització de la posologia, detecció i control d'interaccions, problemes d'incompliment de la medicació (especialment en pacients crònics ambulatoris), alteracions en la biodisponibilitat per canvis en la forma farmacèutica o en la via d'administració, resistències a el tractament, resposta ineficaç o tòxica, problemes de toxicitat,...

Conceptes bàsics de la farmacocinètica

Quan s'administra un fàrmac per la via d'administració seleccionada, la resposta terapèutica de la mateixa es produeix quan, a través de la circulació sistèmica, el fàrmac arriba a la biofase o lloc d'acció (Doménech i cols., 2012).

El fàrmac s'administra a l'organisme mitjançant una determinada forma farmacèutica i, a excepció de l'administració intravenosa, perquè el fàrmac accedeixi a la circulació general haurà alliberar-se de la formulació que el conté, estar dissolt en els líquids biològics presents a la part anatòmica de l'organisme en la qual s'ha situat, travessar les membranes biològiques circumdants a la zona d'absorció fins a arribar al torrent circulatori (Carrillo i cols., 2013; Benet i cols., 2019). Per tant, quan s'estudia el trànsit d'un fàrmac a través de l'organisme, i en concret els processos que pateix el mateix, es resumeixen mitjançant l'anagrama LADME (Figura 6).

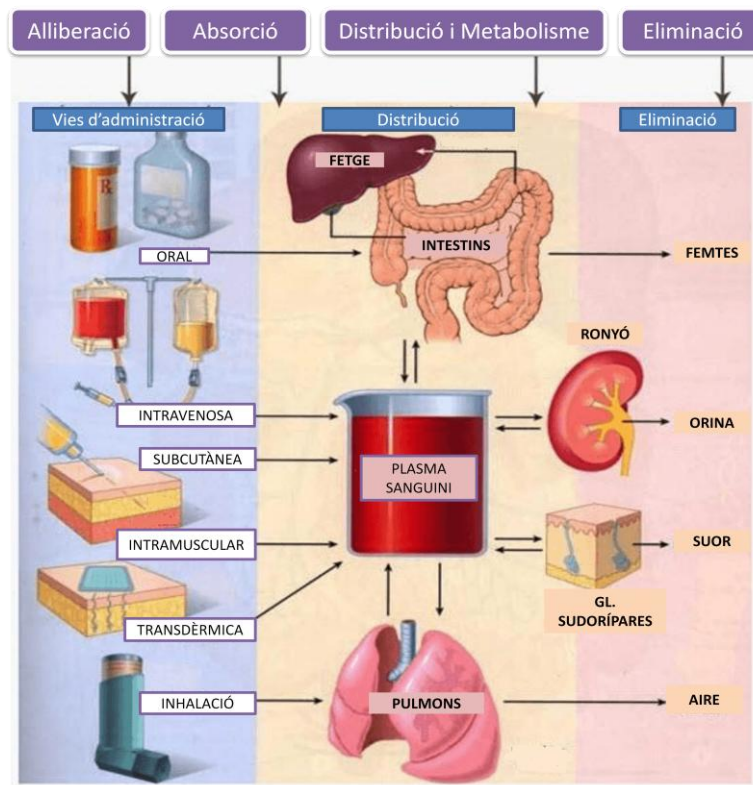


Figura 6: Diagrama del procés d'alliberació, absorció, distribució, metabolisme i excreció (LADME) d'un fàrmac per diferents vies d'administració.

Alliberació

Els processos d'alliberament i dissolució són consecutius i, a la pràctica, el que s'estudia i quantifica és la velocitat de dissolució del fàrmac a partir de la formulació que el conté. Cal tenir en compte una premissa bàsica: fàrmac dissolt, si no es produeix una degradació del mateix, equival a fàrmac absorbit. Aquesta assumpció és conseqüència del fet que la quantitat o concentració de fàrmac dissolt a la part exterior de la membrana absorbent és sempre superior a la present en el costat intern de la mateixa. El fàrmac dissolt travessa la membrana absorbent sempre a favor de gradient de concentració i, a aquesta situació, se li denomina "condicions sink" (Doménech i cols., 2012; Benet. i cols, 2019).

La velocitat de dissolució dels fàrmacs depèn de factors inherents al propi fàrmac, dels excipients emprats en la formulació i de la tecnologia utilitzada per obtenir la forma farmacèutica.

Absorció

Després d'administrar un fàrmac a l'organisme i que aquest estigui dissolt en la zona d'absorció, el fàrmac haurà permear a través de les membranes absorbents a més o menys velocitat, en general d'acord amb un procés de primer ordre; i majoritàriament en funció de la seva ionització en els líquids biològics i del seu coeficient de repartiment entre aquests líquids i els lípids components de la membrana (Escobar i cols., 2012).

És important considerar que, tot i que un fàrmac presenti un alt valor per el seu coeficient de permeabilitat, no és sinònim que tot el fàrmac permeat accedeixi a la circulació sistèmica i per extensió s'obtingui la resposta terapèutica esperada. Per exemple, un fàrmac administrat per via oral mitjançant quan arriba a l'estómac pot patir una alteració química en la seva molècula si no és àcid resistent, atès que el pH de l'estómac és àcid (pH \approx 1.2).

Per tant, el que veritablement interessa és avaluar la quantitat de principi actiu que arriba a la circulació general després de la seva administració extravasal a l'organisme, de la qual es pot esperar resposta terapèutica. El càlcul de la quantitat de fàrmac que arriba inalterat a la circulació sistèmica es porta a terme mitjançant els estudis de biodisponibilitat. Es defineix com la quantitat de fàrmac que accedeix inalterada a la circulació sistèmica i la velocitat a la qual es produeix el procés (Doménech i cols., 2012).

Distribució i metabolisme

És el procés o conjunt de processos mitjançant els quals el fàrmac s'incorpora des de la circulació sistèmica als diferents òrgans i teixits corporals. La capacitat de distribució dels fàrmacs és molt variable, estant controlada per factors propis d el fàrmac com pes molecular, grau d'ionització de la molècula i per factors de tipus fisiològic com a flux sanguini, capacitat de fixació a proteïnes plasmàtiques i titulars, permeabilitat de les membranes (Doménech i cols., 2012).

Des del punt de vista fisiològic la distribució dels fàrmacs pot ser simple o molt complexa. El fàrmac que accedeix a la circulació sistèmica pot inicialment fixar-se a proteïnes plasmàtiques, principalment a l'albumina o penetrar en els eritròcits. Des del punt de vista farmacocinètic, la distribució s'estableix com un equilibri reversible entre el fàrmac lliure i el unit a teixits o proteïnes que condiciona el comportament cinètic del fàrmac en l'organisme.

Eliminació

Els processos d'eliminació depuren el fàrmac de l'organisme, per biotransformació i excreció. El primer mecanisme condueix a la formació d'un o diversos productes, denominats metabòlits, generalment amb major polaritat i menor activitat terapèutica que el fàrmac original, i posteriorment són excretats. La biotransformació de fàrmacs es realitza fonamentalment en el fetge mitjançant diversos sistemes enzimàtics, entre els que pot destacar-se el sistema microsomal responsable de nombroses reaccions oxidatives. Òrgans i teixits com pulmó, ronyó o cervell, entre d'altres, localitzen així mateix, tot i que en menor proporció que el fetge (Escobar i cols., 2012).

Els processos d'excreció permeten l'eliminació del fàrmac inalterat a l'exterior o cap a aquells conductes que comuniquen amb el mateix. L'excreció renal constitueix la via d'excreció fonamental per a molts fàrmacs. Tot i que existeixen vies alternatives d'excreció com la biliar, la sudorípara, la salivar o la mamària, que

contribueixen generalment de manera secundària a l'eliminació dels fàrmacs de l'organisme (Doménech i cols., 2012).

Models farmacocinètics

Un cop obtinguda la informació sobre l'evolució de els nivells de fàrmac, habitualment concentracions en diferents fluids o teixits de l'organisme (plasma, orina, teixits,...), s'ha de plantejar el disseny d'un model matemàtic o d'un mètode d'anàlisi farmacocinètic apropiat que permeti interpretar els processos de LADME implicats (Doménech i cols., 2012).

És difícil classificar tots els models i mètodes d'anàlisi matemàtics utilitzats en el camp de la farmacocinètica. Tot i així, hi ha els models compartimentals (monocompartimental i bicompartimental) són els més utilitzats per ajustar les dades experimentals de concentracions de fàrmac davant el temps (Carrillo i cols., 2013).

Els models compartimentals són fàcils de dissenyar i es formulen matemàticament utilitzant equacions diferencials ordinàries, lineals i de primer ordre. Aquests models es basen en considerar l'organisme dividit en compartiments de distribució homogènia.

Segons el model monocompartimental l'organisme estaria compost per un únic compartiment, considerant la distribució del fàrmac en l'organisme instantània i uniforme, amb una eliminació des temps 0. La Figura 7 representa l'esquema de el model suposant l'administració intravenosa (IV).

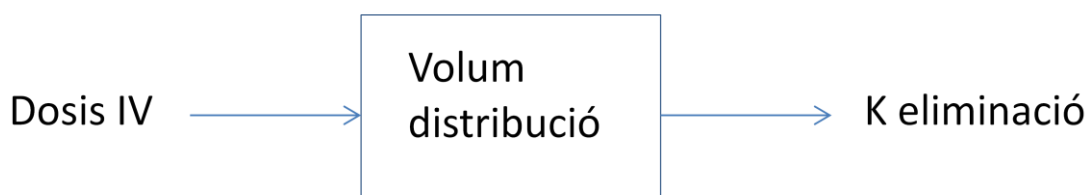


Figura 7: Representació esquemàtica de el model monocompartimental

A causa de la complexitat anatómico-fisiològica dels mamífers, gairebé cap fàrmac s'ajusta a un model monocompartimental, ja que la distribució habitualment no és instantània ni uniforme després de la seva administració. Per això, per descriure el comportament de la majoria dels fàrmacs acostuma a ser necessari un model més complex, el bicompartimental. El model cinètic bicompartimental assumeix que la distribució del fàrmac no és instantània i que els teixits que tenen un major flux o aport sanguini arriben més ràpidament a l'equilibri de distribució que els que tenen menor aportació. Partint d'aquesta premissa, es distingeixen el compartiment central; que el componen els teixits en els quals l'equilibri de

distribució es produeix ràpidament i el compartiment perifèric; que el componen els teixits en els que triga més temps en assolir l'equilibri de distribució (Doménech i cols., 2001). A la Figura 8 està representat l'esquema d'aquest model per a una administració IV.

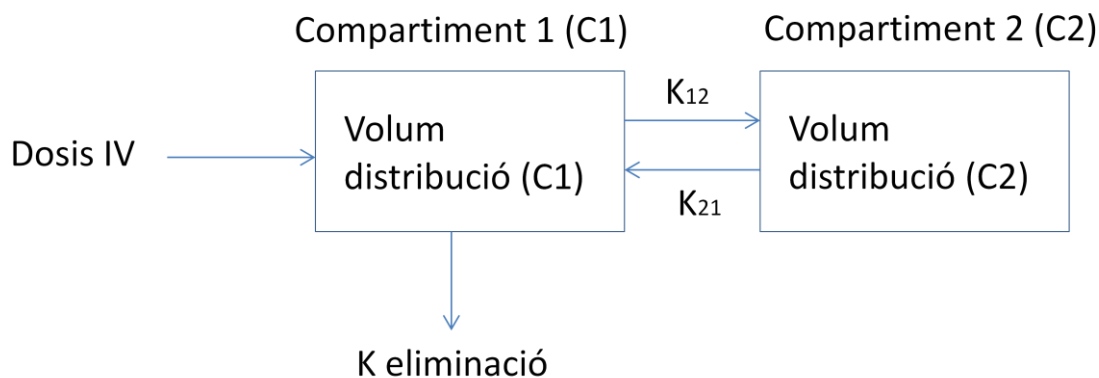


Figura 8: Representació esquemàtica de el model bicompartimental

Nanopartícules

El concepte de nanotecnologia va ser descrit en primer lloc per Feynman l'any 1959. Sobre la dècada dels 80' es va iniciar la investigació amb aplicació en diferents camps de la ciència i a partir de la dècada dels 90' fins a l'actualitat es continua investigant i aplicant de forma creixent.

La nanotecnologia és la ciència que estudia la matèria a nivell atòmic, molecular i supramolecular en l'ordre de la nano-escala. S'aplica a nivell químic, tecnològic, biològic i biomèdic. En medicina humana presenta enormes avantatges. En el sector veterinari, la seva rellevància cada vegada és major. Les característiques d'una nanopartícula (NP) venen definides per la seva composició, mida, forma i tipus de preparació. Han de tenir una mida inferior a 100 nm (1-100 nm), tot i que depenent de la seva aplicació hi ha que superen aquestes dimensions (Parra i cols., 2015).

Les característiques d'interès de les NPs i que es poden analitzar instrumentalment són: pH, osmolaritat, morfologia, mida mitjana de partícula, índex de polidispersitat, càrrega superficial i eficiència d'encapsulació.

Els avenços en nanotecnologia, en humana i veterinària, han de complir amb els criteris estipulats pels organismes oficials de cada regió o país com la Federal Drug Administration (FDA) i l'Agència Europea del Medicament (EMA). Els principals organismes reguladors han aprovat compostos nanoparticulats per a ús en medicina humana. La FDA, fins a l'actualitat ha aprovat al menys 51 compostos amb aplicació en nanomedicina, mentre que l'EMA ha aprovat almenys 12 compostos (FDA i EMA (a)).

D'altra banda, les NPs han de complir amb certs criteris d'aplicabilitat pràctica com una elaboració econòmica, fàcil i tecnològicament útil. En quant a l'ús, tant en medicina humana com veterinària, han de ser biocompatibles. El material ha de ser capaç d'entrar en contacte amb l'organisme hoste sense afectar el sistema immunitari i no induir toxicitat ni ser cancerígenes (Parra i cols., 2015).

Desenvolupament de NPs

Per a les NPs polimèriques, la seva elaboració consisteix en barrejar per separat una fase orgànica amb una altra d'aigua. Seguidament, la fase orgànica s'incorpora sota una agitació magnètica. Finalment es rota-evapora el compost orgànic d'acord amb els criteris de cada tècnica (Figura 9) (Parra i cols., 2015).

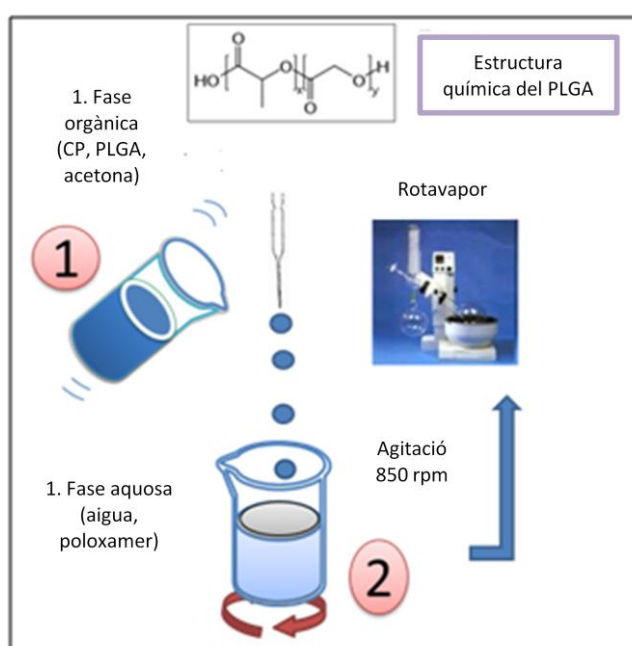


Figura 9: Procés d'elaboració de les NPs.

Per determinar el tamany i la morfologia de les NPs existeixen diferents tècniques com la microscòpia electrònica, microscòpia electrònica de transmissió, microscòpia de força atòmica, Zetasizer... Per a la caracterització fisicoquímica, s'utilitzen diferents tècniques instrumentals per determinar l'estat del fàrmac dins de la matriu: espectroscopia infrarroja, difracció amb rajos X... Tanmateix es poden realitzar estudis *in vitro*, *ex vivo* i/o *in vivo* per determinar la permeació, tolerància i eficàcia de les NPs (Figura 10) (Parra i cols., 2015). Basant-nos en aquestes estudis, en aquesta tesi hem realitzat diversos experiments *ex vivo* utilitzant CP en nanopartícules i en solució en diferents mucoses i teixits oculars d'origen porcí.

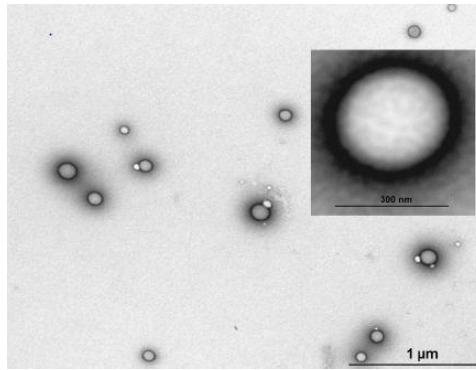


Figura 10: Imatge de la nanopartícula de CP [0.75] realitzada amb un microscopi electrònic de transmissió (Parra i cols., 2015).

Ventatges de l'ús de NPs

Les avantatges de produir NPs versus fàrmac solubles són (Parra i cols., 2015):

- Es poden vehiculitzar una gran varietat de components i fàrmacs.
- Es necessita menor quantitat de fàrmac a incorporar dintre de les NPs.
- Reducció de la citotoxicitat.
- Alliberament sostenible del fàrmac o compost.
- Millor l'especificitat.
- Major capacitat de penetració.
- Reducció de resistència bacteriana.

Aplicació en medicina humana

En medicina humana l'aplicació de les NPs cada vegada és major i està present en diferents camps. La indicació principal de les NPs en biomedicina és com a agent teragnòstic. S'apliquen principalment en la detecció precoç del càncer, el diagnòstic de malalties mitjançant sistemes fluorescents o magnètics utilitzats en imatge (emeten fluorescència per detectar les NPs en tumors en els primers estadis), ultrasons i marcadors genètics. En el camp terapèutic, s'utilitza principalment en l'àrea de l'oncologia per la seva selectivitat com a farmacoteràpia (Hassam i cols., 2020).

Tanmateix, es continua investigant l'ús de NPs en el tractament de diverses patologies. Un exemple serien les NPs de Zinc, s'ha demostrat que mata les cèl·lules canceroses sense afectar el sistema immune. En relació amb les NPs de Carbó, poden absorbir fàrmacs com a epirubicina i doxorubicina usats en la quimioteràpia limfàtica (Hassam i cols., 2020).

Altres aplicacions són en els biosensors de glucosa en sang que utilitzen NPs amb molècules com glucosa oxidasa, proteïnes d'unió a la glucosa o petites molècules d'unió a la glucosa. A més, les NPs han estat utilitzades en el tractament de cremades, proporcionant factors de creixement a la zona afectada (Hassam i cols., 2020).

En relació a les vies d'administració, s'ha demostrat que la via cutània és una ruta favorable per a l'administració de NPs polimèriques. Un exemple serien els hidrogels que contenen dexametasona per al tractament de la psoriasi (Hassam i cols., 2020).

Ús potencial en medicina veterinària

Una gran varietat de compostos, tècniques i aspectes relacionats amb la nanomedicina poden ser utilitzats i aplicats de forma molt similar a la medicina veterinària.

En clínica veterinària l'administració IV de NPs d'Or amb Goma Aràbica en porcs i canins ajuda en la detecció de teixits tumorals o dany cerebral (epilepsia). Altres nanomaterials son utilitzats en oncologia, així com per al tractament de la tripanosomiasi en animals i en malalties bucals (Hassam i cols., 2020).

En el camp de la producció i nutrició en diferents espècies també son de gran interès. Estudis recents han detectat que la suplementació de NPs d'òxid de zinc en l'aliment d'aus de corral millora l'estat immune, l'activitat reproductiva i ajuda a prevenir infeccions microbianes. Similarment en pollastres d'engreix s'ha demostrat que millora el creixement, producció i rendiment general. També la suplementació amb NPs de plata o en combinació amb aminoàcids millora l'estat immunològic (Hassam i cols., 2020).

A l'àrea reproductiva, l'ús de NPs millora la fertilitat i protegeix els espermatozoides. L'ús de nanobiosensors és útil en la detecció de l'estre en la femella, l'alliberament hormonal, la viabilitat en les funcions dels òrgans reproductius i del fetus.

Un altre aspecte interessant, és l'ús de NPs vehiculitzades que reemplacin els diluents convencionals dels antibiòtics en crioconservació. En porcs, les NPs micelars conjugades amb vitamina E millora l'estatus sanitari. Una altra forma d'aplicació és a nivell cutani, les NPs han estat utilitzades en el tractament de cremades aportant factors de creixement (Hassam i cols., 2020).

Eliminació de NPs

Les NPs polimèriques, en el cos humà i en general en els mamífers, utilitzen principalment dos processos per descompondre les molècules de gran dimensió: la hidròlisi i degradació enzimàtica. De manera que com més gran és la hidrofilitat del material, més elevada és la velocitat de descomposició. Factors com la temperatura, acceleren la cinètica de reacció i altres variables com la concentració d'aigua, de sals i el pH modifiquen la velocitat d'hidròlisi.

Les partícules amb mides d'entre 0.1 i 7 micres són retingudes pel sistema reticuloendotelial del fetge i la melsa. En el qual les cèl·lules de Kupffer o els macròfags a la melsa són els encarregats de la fagocitosi. En canvi, si les NPs són inferiors a 100 nm, solen quedar retingudes en les fenestracions de l'endoteli capil·lar. Altres NPs de menor grandària s'eliminen per filtració glomerular (Hassam i cols., 2020).

Aspectes toxicològics de les NPs

Els nanomaterials en medicina veterinària requereixen de més estudis per obtenir un major coneixement en les diferents espècies. Els nous productes farmacèutics que contenen nanomaterials han de ser testats. A més, si hi ha canvis en la seva formulació i disseny, les vies específiques d'administració cal que siguin de nou estudiades.

Tot i la legislació existent, s'ha de ser molt caut davant de l'ús i aplicació de NPs en medicina veterinària. Tenint en compte que a nivell veterinari existeix molta diversitat d'espècies amb enormes diferències. Qualsevol espècie pot tenir diferències i variables que poden influir en l'inici i durada de l'efecte terapèutic i també en la toxicitat del compost utilitzat (Hassam i cols., 2020).

L'espècie porcina

El porc domèstic s'usa en producció en el món de l'alimentació, en investigació biomèdica i darrerament com animals de companyia (porc Vietnamita).

El porc és usat com a model experimental, ja que presenta moltes similituds anatòmiques i fisiològiques amb l'espècie humana. Es tracta d'un mamífer monogàstric i omnívor, molt social i intel·ligent. S'empra amb freqüència en estudis cardiovasculars, del sistema gastrointestinal, en dermatologia, en trànsit transcutani de medicaments i en els mecanismes de cicatrització, entre d'altres. També s'utilitzen en l'aprenentatge i adquisició de destresa de tècniques quirúrgiques. Tot i que és una espècie que presenta molts avantatges per realitzar estudis i recerca, actualment el nombre de porcs que s'utilitzen en investigació és inferior a l'1% (Martín i Orellana, 2016).

Les dades provisionals de l'enquesta de sacrifici del Ministeri d'Agricultura, Pesca i Alimentació (MAPA) relatius a l'any 2019 situen la producció de carn de porc a Espanya, en xifres rècord, amb més de 52.900.000 d'animals sacrificats i uns 4,64 milions de tones de carn produïda, xifres que ens mantenen en la quarta posició mundial, tan sols per darrere de la Xina, Estats Units i Alemanya. Dins de la Unió Europea, Espanya es manté en segona posició, amb un 19,5% de la producció comunitària, i apropant progressivament a Alemanya, que es manté en primer lloc

amb un 22% de la producció de la Unió Europea (UE). Durant l'any 2019 la producció ha crescut al voltant d'un 1% en tones i un 2% en nombre de caps, mantenint la tendència alcista d'aquests darrers anys (Figura 11) (MAPA, 2019).

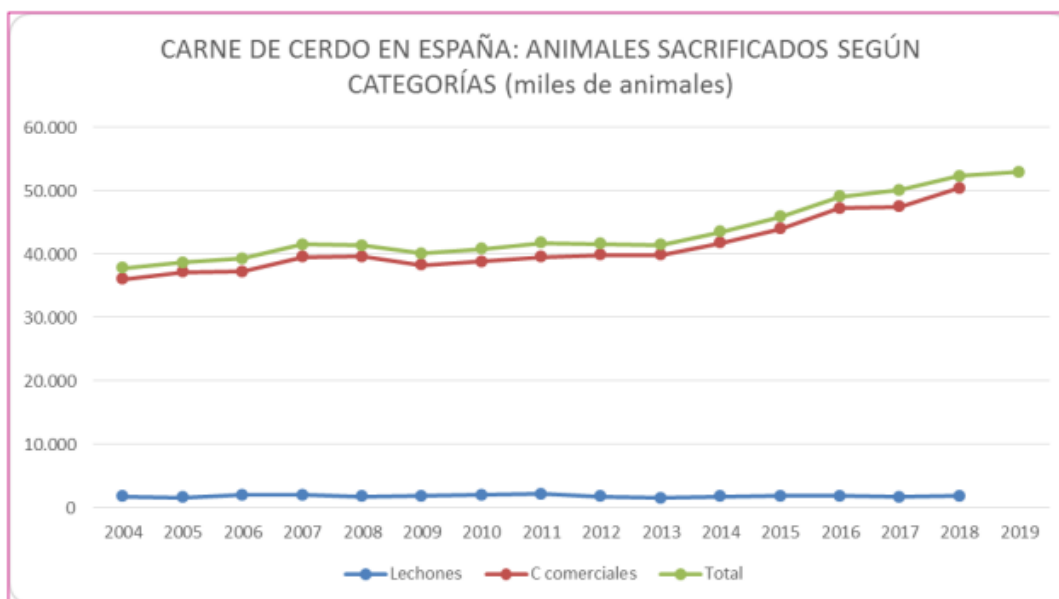


Figura 11: Producció de carn de porc a Espanya dels darrers anys (MAPA, 2019).

Fisiologia de l'espècie porcina

El porc és un animal molt social, que gaudeix de la companyia d'altres animals de la seva mateixa espècie. En llibertat té un marcat ordre jeràrquic, amb grups formats per diverses femelles i les seves cries, i liderats per la femella dominant. Els mascles adults o verros viuen separats, llevat que es trobin en el període d'aparellament. Els garrins joves són molt actius i els agrada jugar entre ells o amb objectes que troben al seu abast (Martín i Orellana, 2016).

Mucoses i teixits oculars

Com s'ha comentat prèviament, l'ús dels AINE's a nivell local s'ha demostrat molt efectiu. En aquesta tesi una de les línies de recerca s'ha centrat en tractar localment diferents mucoses i teixits oculars de l'espècie porcina amb diferents formulacions de CP (veure figura 12).



Figura 12: Imatge macroscòpica dels teixits oculars (conjuntiva, cornea i esclera) i de les mucoses porcines estudiades (mucosa vaginal, bucal i sublingual).

Mucosa bucal i sublingual

La cavitat bucal està dividida en 4 regions (Washington i cols., 2002):

- La zona bucal: correspon al recobriment de vestíbul exterior, galtes i llavis.
- La zona sublingual: correspon a la part inferior de la llengua
- La gingival: són les genives.
- La palatal: comprèn el vel de paladar i la llengua fonamentalment.

A nivell histològic, la mucosa bucal consta de:

- a) L'epiteli bucal.
- b) La membrana basal, que connecta l'epiteli bucal a la Làmina pròpia.
- c) La Làmina pròpia, formada per teixit conjuntiu lax.
- d) La capa submucosa amb teixit conjuntiu lax i teixit conjuntiu glandular amb la major part dels vasos sanguinis i els nervis.

Aquests elements estan disposats sobre una capa muscular o os (Figura 13).

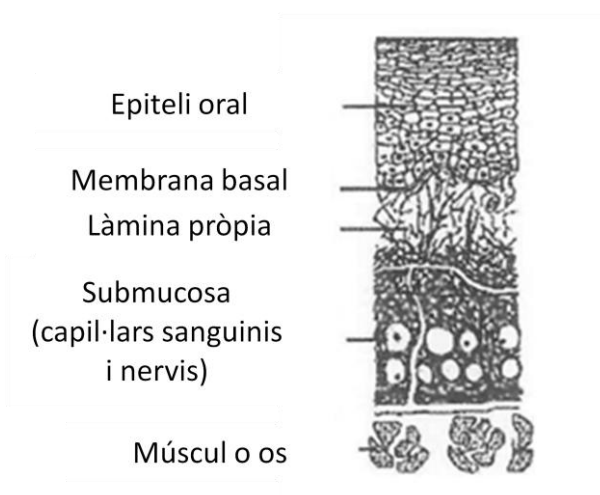


Figura 13: Disposició de la mucosa bucal (adaptada de Washintong i cols., 2002).

Una de les vies alternatives d'administració que ha merescut especial atenció, és la via bucal. Cal considerar que la cavitat bucal és una zona d'entrada per determinats fàrmacs formulats en formes d'alliberament apropiada que permeten posar el fàrmac en contacte amb la mucosa bucal. El sistema venós que irriga la cavitat bucal, permet que el fàrmac pugui accedir ràpidament a la circulació sistèmica a través de la vena jugular, evitant l'efecte de primer pas que puguin patir alguns fàrmacs administrats per via oral a l'arribar a el fetge (després de la seva absorció a través de la vena porta) (Calpena i cols., 2011). L'administració de fàrmacs a través de la cavitat bucal evita, en el primer cycle de circulació, el seu pas per la glàndula hepàtica. Aquest fet fa, per a molts fàrmacs, que augmenti la seva biodisponibilitat tant en magnitud com en velocitat i, com a conseqüència la seva activitat terapèutica. Tanmateix, s'eludeix l'acció del pH gàstric sobre les molècules que no són àcid resistents i l'acció dels enzims i microflora presents en el tracte intestinal (Calpena i cols., 2011).

Un altre punt de vital importància és el seu paper de secretor de saliva, ja que determina que la boca es trobi permanentment humida, i això repercuteix directament en la seva capacitat d'absorció. Pel que fa a el moc, és un altre component que pot afectar l'alliberament del fàrmac en la mucosa oral (Rodríguez i cols., 2000; Li T. i cols, 2020).

La permeabilitat mitjana de la mucosa bucal, considerada globalment, és intermèdia entre la percutània i la intestinal (Galey i cols., 1976). Evidentment, a causa de les estructures i funcions de les seves parts, hi ha diferències considerables en la seva permeabilitat. En principi, es podria establir el següent ordre decreixent: sublingual > bucal > palatal > gingival (Galan i Torres, 2012). La mucosa sublingual és la més prima, la bucal és més gruixuda i la palatal i gingival

es troben queratinitzades. Per aquest motiu, en els nostres estudis ens hem centrat en la mucosa sublingual i bucal.

Mucosa vaginal

La vagina forma part de l'òrgan reproductiu femení (Figura 14). L'estructura de la vagina es compon de diferents capes: epitelí estratificat no queratinitzat (que pot canviar la seva amplada en funció de l'etapa del cicle estral on es troba la femella), làmina pròpia (teixit connectiu), la capa *muscularis* i la túnica adventícia. La vagina és distensible, gràcies a que té diversos plecs en el seu epitelí que li permet augmentar la seva superfície. El recanvi cel·lular a la vagina és cada 10-15 capes cada setmana. La vagina no presenta glàndules secretores. Tot i així, el seu epitelí està cobert per un fluid que s'origina principalment de la seva trasudació i les glàndules cervicals (Katz i cols., 2013)



Figura 14: Vista dorsal interna de la vagina porcina

En quan a l'administració de fàrmacs, en medicina humana hi ha diversos fàrmacs que s'administren localment a la vagina. Un factor limitant dels fàrmacs en aquest teixit és la bioadhesió. Si els fàrmacs utilitzats no tenen una elevada bioadhesió a la mucosa, hi haurà una baixa retenció en el teixit i goteig. Per tant, és necessari que els fàrmacs utilitzats per aquesta via presentin elevada mucoadhesió. Les formulacions mucoadhesives proporcionen una interacció amb la mucosa i per tant, augmenta el temps de residència del fàrmac en el lloc d'acció (Machado i cols., 2015).

Teixits oculars

L'ull és una de les estructures que presenta major complexitat tant histològica com funcional. En mamífers les diferències són mínimes, es destaca el nombre de vegades en què es presenta el reflex palpebral i la presència o no de la tercera parpella (Williams i cols., 1995).

El globus ocular està constituït per tres estrats: l'estrat extern (escleròtica i còrnia), l'estrat intermedi (úvea) i l'estrat intern (retina). La escleròtica està formada de teixit fibrós que té la forma de segments de dues esferes, l'escleròtica i la còrnia. Rodejant el globus ocular es troba un teixit anomenat conjuntiva (veure figura 15).

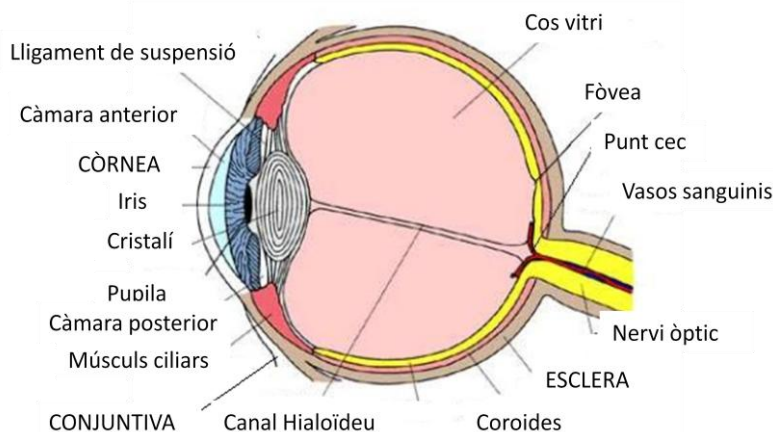


Figura 15: Estructura del globus ocular.

Comparativament, el teixit ocular porcí és un dels més semblants a l'home juntament amb els primats i conills. En aquest cas cal destacar l'absència del tapetum a l'ull porcí, el qual està present en altres animals com la vaca, ovella i conill. Altres similituds entre l'ull humà i porcí es centren en el pigment de l'epiteli retinal, els fotoreceptors cel·lulars, el gruix escleral i el contingut d'aigua. El teixit escleral en l'espècie humana i porcina té un gruix similar. Per a totes dues espècies, l'escleròtica tendeix a tenir un màxim espessor en el pol posterior, decreixent a un mínim prop de l'equador i després augmenta de nou en el limbus.

Des del punt de vista de la permeació dels fàrmacs les estructures anatòmiques que resulten involucrades són la còrnia, l'escleròtica i la conjuntiva, sent la primera la que revesteix més interès atès que la majoria de les malalties oculars comprometen principalment aquesta.

Benestar animal

La comprensió, el manteniment i la promoció del benestar dels animals són un component integral de tots els sistemes de producció ramadera i investigació animal. L'estudi de la inflamació, el dolor associat a ella i el seu tractament es basa en garantir el benestar animal de qualsevol espècie.

El benestar animal investigació: principi de les 3Rs

El Tractat de Funcionament de la Unió Europea reconeix que els animals són éssers sensibles i estableix que s'han de tenir plenament en compte les exigències de

benestar animal. Específicament es refereix al fet que el benestar dels animals s'ha de tenir en compte al formular i aplicar la política de recerca i desenvolupament tecnològic. El benestar animal es basa en un principi: el principi de les 3Rs descrit els anys 60 per dos biòlegs, Russel i Burch, en el seu llibre "The Principle of Humane Experimental Technique":

- Reemplaçament d'animals per altres opcions en les que aquests no s'utilitzin, com són, per exemple, els mitjans audiovisuals o les tècniques de realitat virtual.
- Reducció del seu nombre, gràcies a el desenvolupament i aplicació d'estudis estadístics, que permetin establir clarament quina és la quantitat mínima d'individus que permeten obtenir resultats científics satisfactoris, o de l'elecció de les espècies animals més adequades a l'estudi a realitzar.
- Refinament de les actuacions sobre els animals i la millora de les seves condicions de vida. Associats a aquesta idea s'impulsen conceptes com l'enriquiment ambiental, l'ús d'anestèsia i analgèsia, la classificació de severitat dels procediments o l'establiment de criteris de punt final primerencs.

El benestar animal en producció ramadera

El benestar animal és un tema que en les darreres dècades ha atret una atenció important per part del públic a mesura que s'intensifica el desig de saber on i com es produeixen els aliments. Amb el pas del temps, moltes definicions de benestar animal han sorgit dins i entre productors, investigadors, veterinaris, consumidors, envasadors i minoristes. Tots els sectors solen incloure alguna combinació de les següents àrees d'enfocament: funció biològica (funció immune, creixement, etc.), estats afectius (por, dolor, fam, etc.) i viure al medi natural (Zimmerman i cols., 2019). Per tant, el benestar dels animals no es pot avaluar només com a qüestió tècnica, sinó que ha d'incloure una consideració ètica.

Alguns sectors i especialistes es centren en el funcionament biològic dels animals com a indicador de benestar clau, que inclou paràmetres com l'èxit reproductiu, la funció immune, la presència de malalties i lesions (Zimmerman i cols., 2019). D'altra banda, l'avaluació d'estats afectius com la por, l'angoixa, el dolor i també els estats positius (com el plaer) s'utilitzen en part per mesurar i comprendre l'estat de benestar d'un animal.

El 1965 es va formar la Comissió Brambell per determinar quins components són essencials per garantir el benestar dels animals en les espècies ramaderes. Basant-se en una revisió de la literatura científica disponible en aquell moment, la comissió va proposar diverses condicions que es consideraven necessàries per garantir el benestar del bestiar. El 1979, el Consell de Benestar Animal de la Granja va revisar el Brambell. La Comissió va recomanar i va crear les "cinc llibertats". Les "cinc llibertats" serveixen de base per a molts dels programes i regulacions educatives, d'avaluació i d'auditoria a nivell mundial sobre el benestar ramader. Les cinc llibertats inclouen els aspectes crítics del funcionament biològic (salut i

nutrició), mesures basades en la naturalesa (expressió de comportament normal) i estats afectius (por i angoixa), tal com es va comentar anteriorment.

Aquestes llibertats són (Zimmerman i cols., 2019):

- Alliberament de la fam i la set gràcies a l'accés a l'aigua dolça i a una dieta per mantenir la salut i el vigor.
- Alliberament de les molèsties proporcionant un entorn adequat, inclòs refugi i una zona de descans còmoda.
- Alliberament del dolor, lesions i malalties mitjançant la prevenció o el diagnòstic i tractament ràpids.
- Llibertat d'expressar un comportament normal proporcionant suficient espai, instal·lacions adequades i companyia del tipus propi de l'animal.
- Alliberament de la por i l'angoixa garantint condicions i tractaments que evitin el patiment mental.

Darrerament, l'Organització Mundial per a la Salut (OMS) ha definit el benestar animal com "Com s'enfronta un animal a les condicions en què viu" i proporciona exemples que contribueixen al bon benestar animal que inclouen una combinació de funció biològica i estat afectiu i conceptes de vida natural. L'OMS és reconeguda per l'Organització Mundial del Comerç com l'organisme internacional de normalització per a la salut i el benestar dels animals. Per tant, aquesta definició sovint es fa referència a les discussions internacionals sobre el benestar dels animals.

Avaluació del benestar animal

Les mesures de benestar animal a la granja o estabularis normalment es divideixen en dues categories: mesures basades en recursos o basades en els animals.

Les mesures basades en recursos també s'anomenen mesures basades en l'entrada, la gestió o el disseny. Alguns exemples inclouen la quantitat d'espai, la densitat d'estoc, la quantitat i la qualitat de l'alimentació i de l'aigua, la freqüència de les inspeccions i la formació dels cuidadors. L'inconvenient de les mesures basades en els recursos és que són indicadors indirectes de benestar animal i, per tant, no proporcionen una avaluació real de la manera com l'animal afronta el seu entorn (MAPA, 2012). Tot i així, l'avantatge de les mesures basades en recursos és que poden identificar les causes potencials d'un mal maneig i es poden detectar abans que el benestar d'un animal es vegi afectat negativament.

Les mesures basades en animals també s'anomenen mesures basades en la producció o el resultat. Alguns exemples inclouen la mortalitat, la morbiditat, les taxes d'abatiment, coixesa, lesions, condició corporal, comportaments estereotípics, comportaments agressius i comportaments de por. Per tant, són indicadors directes del benestar animal i permeten variacions en el disseny i gestió del sistema (Zimmerman i cols., 2019). El desavantatge d'aquestes mesures és que

tendeixen a ser indicadors de “retard”, és a dir, que ja s’han produït en els animals i cal corregir-los el més ràpid possible.

Un programa robust d’avaluació del benestar animal hauria d’incloure tant mesures basades en animals, per identificar i entendre plenament el benestar real de l’animal, com mesures basades en recursos, per identificar les possibles causes de mal estat. L’estat del benestar d’un animal és dinàmic i pot ser influït per canvis subtils en la seva salut o en el medi ambient. Per tant, el control del benestar dels animals ha de ser un procés continu.

El dolor en l’espècie porcina

L’educació dels professionals i investigadors sobre la importància de reconèixer el dolor, proporcionar analgèsia és un pilar base en el benestar animal. Actualment, la informació disponible ajuda al reconeixement del dolor i en conseqüència, hi hagut un augment en l’ús d’analgèsics en petits mamífers, com l’espècie porcina. La gestió del dolor es pot millorar proporcionant analgèsics pre, intra i postoperatori, oferint analgèsia multimodal i augmentant l’ús dels AINEs (Coulter i cols., 2009, 2011).

El reconeixement del dolor en porcs pot ser un repte. Els porcs són animals estoics, però també són una espècie de presa inclinada a emmascarar els signes de malaltia, debilitat, dolor o vulnerabilitat fins que ja no puguin compensar-ho. Els signes de dolor poden ser subtils i reconèixer-los depèn d’una observació acurada, d’un coneixement bàsic de la normalitat del comportament porcí i sentit comú. Els estudis que documenten signes de el dolor en porcs s’han limitat principalment al dolor associat amb pràctiques habituals de gestió en porcs comercials (com ara la mossegades de cues, retallada de dents i castració). Tot i així, fa uns anys es va realitzar un estudi per establir una escala per avaluar el dolor i els efectes dels analgèsics en minipigs utilitzats en investigació (Egger i cols. (b), 2014). Aquesta escala es pot extrapolar al porc comercial amb certa precaució. És important reconèixer els primers canvis que experimenta un animal al sentir dolor. Un ramader o investigador observador serà el primer a reconèixer els subtils canvis de comportament que suggereixen que alguna cosa no funciona. Fins i tot petits canvis en el comportament poden indicar dolor o malestar.

Diversos indicadors del dolor, angoixa o malaltia en porcs són similars a les observades en altres espècies. Malgrat això, també cal recordar que cada porc és un individu i la sensibilitat al dolor pot variar en funció de l’edat, el gènere i la personalitat, així com la durada i la gravetat del dolor.

Un bon indicador del dolor en porcs és la disminució de la ingesta d’aliments, així com un menor temps dedicat a menjar (Egger i cols. (b), 2014; Luna i cols, 2020). La disminució de la ingesta d’aliments pot ser un signe subtil en els porcs comercials, ja que es troben en grups. No tots els porcs malalts o dolorosos deixen

de menjar, però és probable que tots els porcs que deixen de menjar pateixin algun tipus de dolor.

Un altre signe important de dolor o molèstia en un porc és la disminució de l'activitat. S'ha demostrat que els porcs malalts o amb dolor són menys actius (Holdcroft, A., 2005). Poden passar més temps reclinats i demostrar una reticència a moure's o canviar de posició. Tanmateix, canvis en la postura poden ser un signe important de dolor o angoixa. Porcs amb artritis del membre anterior sovint es mantenen en posició inclinada amb més pes a les extremitats caudals. Els porcs amb dolor també poden ser rígids, tremolar o aïllar-se dels altres porcs (Egger i cols. (b), 2014; Luna i cols, 2020). (Figura 16).



Figura 16: Posició inclinada degut a l'artritis del membre anterior en un porc (Egger i cols. (b), 2014).

Els canvis en la deambulació també poden ser suggeridors de dolor, i aquest és un signe particularment important quan es tracta de porcs envellits. L'artritis és una dels problemes més freqüents en porcs geriàtrics i està associat al dolor crònic.

L'augment de la irritabilitat i l'agressivitat pot ser un signe de dolor o molèsties en alguns porcs (Murison i cols., 2009).

D'altra banda, s'ha associat un augment de la freqüència cardíaca i respiratòria amb el dolor en la majoria de les espècies. Tot i que poden ser paràmetres indicadors del dolor en porcs, cal anar amb compte, ja que avaluar només aquests paràmetres per si sols es poden confondre amb estrés (Murison i cols., 2009).

Finalment, la vocalització pot ser útil per determinar si un porc està en dificultats o experimenta dolor o malestar. Els porcs són notòriament vocals i produeixen una àmplia i complexa gamma de sons. Es necessita molta experiència per saber si un porc té gana, por, agitació o dolor. La freqüència, amplitud, to i durada de les vocalitzacions del porc, inclosos els xiscles i crits, tendeixen a augmentar amb dolor o angoixa (Egger i cols. (b), 2014).

HIPÒTESIS

Els AINEs s'utilitzen sobretot com antiinflamatoris, antipirètics i analgèsics. El CP s'utilitza en nombroses espècies, ja que s'ha demostrat la seva eficàcia i tolerabilitat. La seva principal indicació és pel tractament del dolor, tant agut com crònic. Tot i així, fins l'actualitat, el CP no ha estat gaire estudiat en la espècie porcina, per aquest motiu s'aborda aquest estudi.

La hipòtesis principal d'aquesta investigació és trobar noves formes de dosificació del CP per diverses vies en l'espècie porcina.

OBJECTIUS

OBJECTIU GENERAL

Actualment els tractaments recomanats per tractar la inflamació i disminuir el dolor són els AINE'S , que presenten avantatges i algun efecte secundari advers. Per presentar alternatives terapèutiques que ajudin al tractament hem volgut conèixer la capacitat de permeació del CP a través d'estudis *ex vivo* vehiculitzat en nanopartícules o en solució per aconseguir conèixer la seva possible eficàcia, tolerància i seguretat mitjançant estudis biofarmacèutics.

Per aconseguir conèixer les possibles aplicacions veterinàries d'aquest fàrmac en aquesta espècie ens hem proposat realitzar un estudi farmacocinètic en la espècie porcina i així, poder avaluar tots el paràmetres per la via intravenosa i intramuscular. D'aquesta manera, aquestes dades ens permetran poder establir una possible pauta posològica a recomanar en aquesta espècie.

En la figura 17 es mostra de manera gràfica els objectius del present treball de recerca.

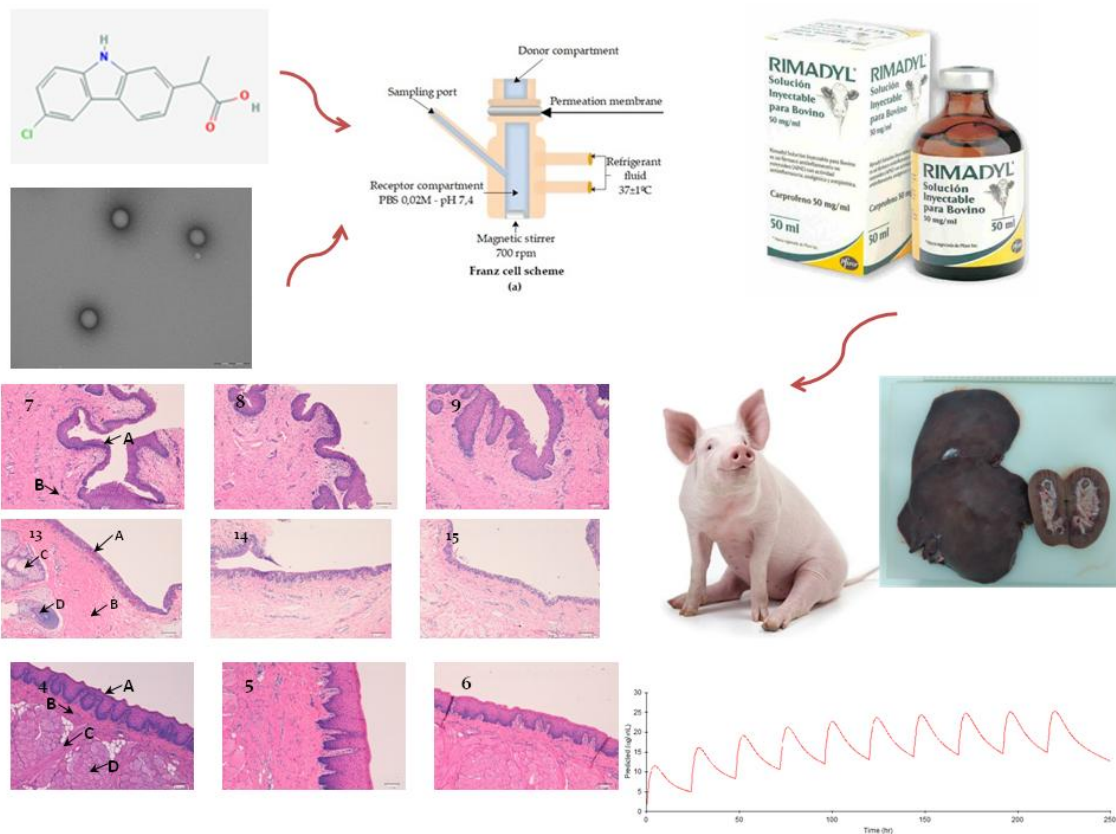


Figura 17: Objectius generals del present estudi.

OBJECTIUS PARTICULARS

1. Validar el mètode analític amb cromatografia líquida d'alta eficàcia (HPLC) per mostres biològiques d'origen porcí i estudis de permeació intrínseca del CP en mucoses i teixits oculars.
2. Determinar la capacitat de permeació en diferents teixits d'origen mucós i ocular de NPs de CP (CP-NPs) i del CP en solució (CP-Solució).
3. Analitzar la quantitat retinguda en els teixits estudiats susceptible de donar efecte terapèutic.
4. Determinar la seguretat estudiant la predicció del nivells plasmàtics que s'assolirien després d'administrar les NP.
5. Observar la integritat del teixit mitjançant estudis histològics.
6. Validació de mètode analític per cromatografia líquida d'alta resolució acoplada a l'espectrometria de masses (LC/MS/MS) en plasma de porc.
7. Determinar els paràmetres farmacocinètics mitjançant la farmacocinètica per via IV i IM en porc.
8. Establir la biodisponibilitat del CP en l'espècie porcina.
9. Cercar les quantitats retingudes en ronyó i fetge per estudiar si hi ha efecte acumulatiu en aquests teixits.
10. Establir un règim posològic del CP adient a l'espècie porcina.

ARTICLES

Els resultats derivats de la realització d'aquest treball de recerca han donat lloc a dos articles científics publicats en revistes d'àmbit internacional i una tercera pendent d'enviar, totes es presenten a continuació acompanyades d'un breu resum.

Article 1

Gómez-Segura, L.; Parra, A.; Calpena, A.C.; Gimeno, Á.; Boix-Montañes, A. Carprofen Permeation Test through Porcine Ex Vivo Mucous Membranes and Ophthalmic Tissues for Tolerability Assessments: Validation and Histological Study. *Veterinary Sciences*. **2020**, 7, 152. <https://doi.org/10.3390/vetsci7040152>

Article 2

Gómez-Segura, L.; Parra, A.; Calpena-Campmany, A.C.; Gimeno, Á.; Gómez de Aranda, I.; Boix-Montañes, A. Ex Vivo Permeation of Carprofen Vehiculated by PLGA Nanoparticles through Porcine Mucous Membranes and Ophthalmic Tissues. *Nanomaterials*. **2020**, 10, 355. <https://doi.org/10.3390/nano10020355>

Article 3

Gómez-Segura, L.; Parra, A.; Gimeno, Á.; Calpena-Campmany, A.C.; Bellido, D.; Soriano-Ruiz J.L.; Boix-Montañes A. Application of liquid chromatography/mass spectrometry for bioanalysis of Carprofen in swine: pharmacokinetics and bioavailability. Pendent d'enviar.

Article 1

Carprofen Permeation Test through Porcine Ex Vivo Mucous Membranes and Ophthalmic Tissues for Tolerability Assessments: Validation and Histological Study

(Prova de permeabilitat del Carprofen a través de membranes mucoses i teixits oftàlmics *Ex Vivo* pocins per a avaluacions de tolerabilitat: validació i estudi histològic)

Lidia Gómez-Segura, Alexander Parra, Ana C. Calpena, Álvaro Gimeno, Antonio Boix-Montañes.

Veterinary Sciences 2020 Oct 10;7(4):152

<https://doi.org/10.3390/vetsci7040152>

Índex d'impacte (Scimago Índex): 0.57

Categoria: Q1 (Scimago Institutions ranking)

Resum

El CP, un medicament antiinflamatori no esteroideu, s'utilitza sobretot en medicina veterinària per la seva activitat analgèsica i antiinflamatòria. Alguns efectes indesitjables s'associen a la seva administració sistèmica. Les rutes locals alternatives són especialment útils per facilitar la seva administració en animals.

L'objectiu principal d'aquest article és validar la idoneïtat dels experiments de permeació *ex vivo* de CP en membranes mucoses porcines (bucals, sublinguals i vaginals) i teixits oftàlmics (còrnia, esclera i conjuntiva) destinats a ser representatius de condicions *in vivo*. S'ha validat l'anàlisi cromatogràfic de mostres de membrana impregnades de CP i mostres de fàrmac retingut seguint les pautes bioanalítiques estàndard. Els resultats havien mostrat relacions lineals amb bons coeficients de correlació ($R^2 > 0.998$ i $R^2 > 0.999$) en el rang de 0,78 a 6,25 mg/mL i de 3,125 mg/mL a 100 mg/mL respectivament. Els límits baixos de quantificació al voltant de 0,40 µg/mL van permetre seguir nivells de permeació fins a un mínim del 0,40% de la dosi aplicada localment. Aquest mètode va mostrar una bona exactitud i precisió amb valors inferiors al 2%. Els nivells de recuperació de fàrmacs en mostres de teixit es van avaluar amb tampó aquós de PBS per preservar la integritat histològica. Es van assolir valors reproduïbles inferiors al 30% en tots els teixits, cosa que suggereix que és un mètode poc perjudicial però de baixa eficiència i per tant, es requereix l'ús de dissolvents addicionals per millorar els percentatges d'extracció.

Com a prova de concepte, s'ha realitzat una sèrie de proves de permeació de CP en cèl·lules de difusió vertical de Franz seguides d'un estudi histològic per a la seva avaluació crítica. A més, es van preparar mostres semblants a la retenció de teixits sintètics per verificar el valor d'aquest estudi experimental. No es van detectar interferències màximes rellevants.

En conclusió, els resultats demostren la idoneïtat d'aquest test per quantificar la distribució de CP amb una bona tolerabilitat histològica.

Graphical Abstract

En la figura 18 es mostra el graphical Abstract d'aquest article.

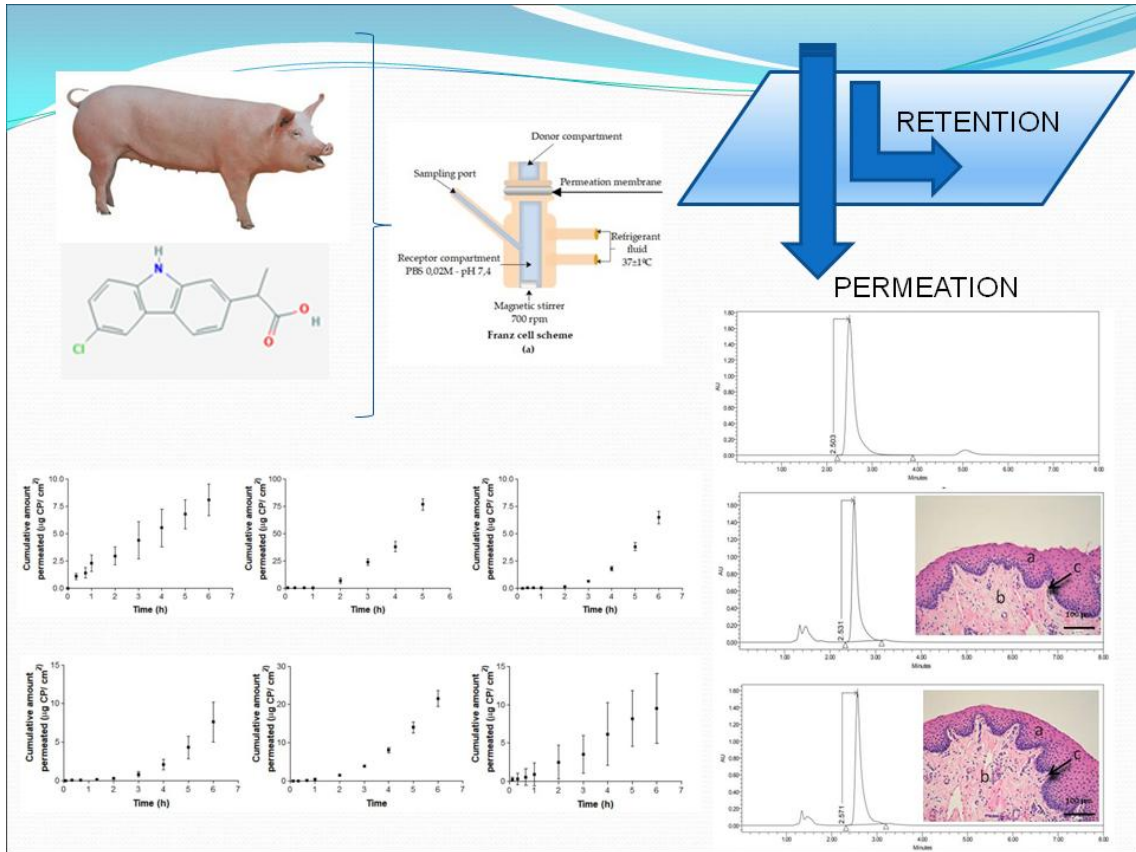





Figura 18: Graphical abstract de l'article 1.

Article

Carprofen Permeation Test through Porcine Ex Vivo Mucous Membranes and Ophthalmic Tissues for Tolerability Assessments: Validation and Histological Study

Lidia Gómez-Segura ¹, Alexander Parra ², Ana C. Calpena ^{3,4}, Álvaro Gimeno ⁵
and Antonio Boix-Montañes ^{3,4,*}

¹ Department of Medicine and Animal Health, Faculty of Veterinary, Autonomous University of Barcelona, Bellaterra, 08193 Barcelona, Spain; lidia.gose@gmail.com

² Department of Veterinary Medicine and Zootechnic, Faculty of Agricultural Sciences, University of Applied and Environmental Sciences, RX22+57 Bogota, Colombia; aleparra@udca.edu.co

³ Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology and Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; anacalpena@ub.edu

⁴ Institute of Nanoscience and Nanotechnology (IN2UB), University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

⁵ Department of Animal Research, Animal House of Bellvitge, University of Barcelona, CCIT-UB, Hospitalet de Llobregat, 08907 Barcelona, Spain; alvarogimeno@ub.edu

* Correspondence: antoniboix@ub.edu

Received: 24 August 2020; Accepted: 5 October 2020; Published: 10 October 2020



Abstract: Carprofen (CP), a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID), is profusely used in veterinary medicine for its analgesic and anti-inflammatory activity. Some undesirable effects are associated with its systemic administration. Alternative local routes are especially useful to facilitate its administration in animals. The main aim of this paper is to validate the suitability of ex vivo permeation experiments of CP with porcine mucous membranes (buccal, sublingual and vaginal) and ophthalmic tissues (cornea, sclera and conjunctiva) intended to be representative of naïve in vivo conditions. Chromatographic analysis of CP in membrane-permeated samples and drug-retained have been validated following standard bioanalytical guidelines. Then, recovery levels of drugs in tissue samples were assessed with aqueous phosphate buffered saline (PBS) buffer to preserve the histological integrity. Finally, as a proof of concept, a series of CP permeation tests in vertical Franz diffusion cells has been performed to evaluate permeation flux and permeability constants in all tissues, followed by a histological study for critical evaluation. Furthermore, synthetic tissue retention-like samples were prepared to verify the value of this experimental study. Results show linear relationships with good determination coefficient ($R^2 > 0.998$ and $R^2 > 0.999$) in the range of 0.78 to 6.25 mg/mL and 3.125 mg/mL to 100 mg/mL, respectively. Low limits of quantification around 0.40 µg/mL were allowed to follow permeation levels until a minimum of 0.40% of the locally-applied dose. This method showed a good accuracy and precision with values lower than 2%. After the recovery technique, reproducible values below 30% were achieved in all tissues, suggesting it is a non-damaging method with low efficiency that requires the use of further solvents to enhance the extraction percentages. After permeation and histology tests, no relevant peak interferences were detected, and no cell or tissue damage was found in any tissue. In conclusion, results demonstrate the suitability of this test to quantify the distribution of CP with good histological tolerability.

Keywords: carprofen; HPLC; permeation test; histological integrity; mucous tolerability; ophthalmic tolerability

1. Introduction

Carprofen (CP) is a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) that inhibits microsomal cyclooxygenases (COX), which catalyze the oxygenation of arachidonic acid to prostaglandin H₂ (PGH₂) [1]. Type 2 cyclooxygenase (COX-2) is the inducible form of the enzyme and is related with inflammation processes.

Currently, CP is not used in humans due to episodic adverse effects such as photoallergic cases after mishandling on an industrial scale [2]. However, it is a drug widely used in veterinary medicine as an anti-inflammatory. There is variety of veterinary therapeutic indications: osteoarthritis [3,4], bovine mastitis [5], analgesic [6,7] and respiratory diseases requiring antibiotics [8,9]. Its absorption kinetics have been investigated in numerous species of animals (horse [10,11], dog [12–14], cat [15], broiler chicken [16] or rat [17]). However, to the extent of our knowledge, there are no studies in pigs. Its chronic administration is not preferable for its chirality [18] and its systemic distribution is associated with gastric ulcers, abdominal pain, vomiting and nephrotoxicity [19]. If administered systemically and over a long period of time, it has been reported to cause occasional liver toxicity [20–22].

This hepatotoxicity, detectable with histopathologic documentation of hepatic necrosis and also renal tubular disease, requires its discontinuation [23]. Additionally, episodes of NSAID phototoxicity [24] can be avoided if systemic distribution is precluded. For these reasons, it is expectable that its local administration would provide a better tolerability for both humans and animals as with other NSAIDs [25], although its pharmacokinetics is still not well known. A successful local administration ensures adequate drug amounts at the site of action at a suitable rate. Therefore, the evaluation of its transmembrane permeability and retention with *ex vivo* membranes demands its analytical quantification in the target tissues to assure drug level profiles in these series of tissues, for example, mucosal or ophthalmic tissues.

Thus, the objective of this investigation was to validate a quantification method of CP in permeation and/or membrane retention samples following standard bioanalytical and permeation test guidelines [26–29], and using different porcine membranes, obtained *ex vivo*, available for local administration such as cornea, conjunctiva and sclera and also sublingual buccal and vaginal mucous membranes.

As a proof of concept of this preliminary validation, the intrinsic permeation of CP through these tissues was investigated to evaluate the adequacy of this *ex vivo* test to estimate the corresponding parameters of drug permeation–penetration. In addition, we confirm there is no damage to cell structure with a histological examination.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals and Reagents

CP was supplied by Capot Chemical (Hangzhou, China), deionized water (18.2 MΩ.cm) was generated with a MilliQ System (Waters corp.). Potassium dihydrogen phosphate (H₂KPO₄), disodium phosphate (HNa₂PO₄) and methanol analytical grade were supplied by Panreac Quimica (Barcelona, Spain) and dimethyl sulfoxide (DMSO) was acquired from Fisher Scientific (Fisher Scientific, Leicestershire, UK). All other chemicals and reagents had suitable analytical grades (Fisher Scientific, Leicestershire, UK).

2.2. Biological Materials

Specimens of mucosal and ocular tissues were obtained *ex vivo* from female pigs (Landrace x Large White cross, 40–45 kg), resulting from surplus of surgical studies following the study protocol of the Animal Experimentation Ethics Committee of the University of Barcelona with ethic code 514/18. Animals were anesthetized with intramuscular (i.m.) ketamine (3 mg/kg), xylazine (2.5 mg/kg), and midazolam (0.17 mg/kg) and, after the surgery practices, pigs received an intravenous (i.v.) overdose of sodium thiopental. Immediately, mucous membranes, buccal, sublingual and vagina, and eye balls,

were excised, debrided in the laboratory to obtain the corresponding sclera, cornea and conjunctiva and frozen by placing them in containers with a phosphate buffered saline (PBS) mixture containing 4% albumin and 10% DMSO (as cryoprotective agents) and stored at -80°C in a mechanical freezer until their use (see Figure 1). The day before their use, specimens were cut in $700\ \mu\text{m}$ parallel slices with a mucotome GA 630 (Aesculap, Tuttlingen, Germany) [30–32] (see Figures 1 and 2) and mounted in vertical Franz-type cells of diffusion (Vidra Foc, Barcelona, Spain) to perform the ex vivo experiment. In addition, other untreated samples were also saved to perform the histological study later.

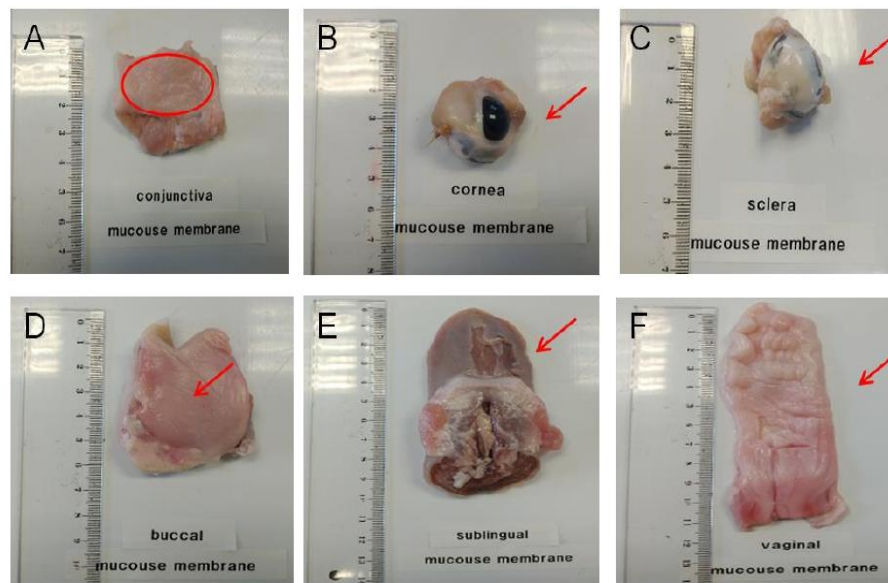


Figure 1. Ex vivo porcine ophthalmic and porcine mucous used as permeation membranes. (A): conjunctiva; (B): cornea; (C): sclera; (D): buccal mucous; (E): sublingual mucous and (F): vaginal mucous.



Figure 2. Tools used in permeation tests. (A): $0.64\ \text{cm}^2$ Franz diffusion cell; (B): $2.54\ \text{cm}^2$ Franz diffusion cell and (C): mucotome.

In these experiments of diffusion (described later in the text), two kinds of samples were expected to be obtained: permeation samples consisting of CP solutions in buffer saline, and penetration samples, consisting of samples of each tissue that imbibed CP (drug retention), which required an additional extraction procedure prior to the HPLC analysis.

2.3. Buffers and Solutions

Phosphate buffered saline (PBS) was formulated dissolving HNa_2PO_4 (11.88 g) and H_2KPO_4 (9.08 g) in 1 L deionized water (20 mM). pH was adjusted to pH = 7.4 using a pH meter (Crison Instruments S.A., Alella, Spain) correcting the osmolality to 300 mOsm/L aided with a Fiske 3320 osmometer (Advanced Instruments, Norwood, MA, USA) and stored at 5 °C for a maximum of three months.

Mobile phase for ultra-violet high-performance liquid chromatography (HPLC-UV) analysis was prepared by dissolving H_2NaPO_4 (1.36 g) in 1 L of deionized water, adjusting to pH = 3.0 using a pH-Meter (Crison Instruments S.A., Alella, Spain) and diluting 25:75 with methanol.

pH 7.4 buffer phosphates saturated with tissue (PBSm: PBS saturated with mucous and PBSo: saturated with ophthalmic tissue) were made by immersing freshly made PBS in minced mucous or ophthalmic tissue specimens (1:100, *w/w*) during 6 h continuous agitation. They were used to prepare the dilutions of calibrator curve standards for mucous membranes (PBSm) or ophthalmic tissues (PBSo).

CP saturated solution 1500 µg/mL (CP-Sat) was prepared adding to a glass beaker 100 mL PBS and small aliquots of CP towards 150 mg (near saturation) under stirring. After 10 min repose, solution was filtered through a 0.45 µm nylon filter (Teknokroma, Barcelona, Spain) and stored at 20 °C.

2.4. Calibration Curve Standards (CCS), Quality Control Standards (QCS) and Fortified Samples (FS)

Two series of calibration standards were prepared with respective PBSm or PBSo imitating the samples of mucosal or ophthalmic permeation tests. Two calibration ranges were established, depending on the expectable experimental concentrations: 0.78 to 6.25 and 3.125 to 100 µg/mL. Mother solution was prepared daily as a 1000 µg/mL stock solution. Dilutions were prepared diluting the corresponding aliquots in PBSm or PBSo in 10 mL volumetric flasks and stored at 5 °C.

For the analytical runs of real samples, quality controls (100, 6.25 and 0.78 µg/mL) were prepared and stored at 5 °C (for no more than ten days) to be used as interleave samples in each run: initial, middle, final of each sequence. Sample run was considered acceptable if relative errors of QCS were lower than ±5%.

Tissue samples fortified with CP [29] were prepared for the evaluation of drug retention recovery: 1 mL CCS-100 (100 µg/mL) was added to accurately weighed samples of each tissue (in duplicate). Each vial remained at 37 °C/6 h to simulate the membranes during a permeation experiment. Afterwards, the liquid was removed, the membranes rinsed, and each series of liquids were stored in vials to analyze the residual amount of carprofen. The difference with the initial amount of carprofen was considered to be the amount of drug charged inside these fortified samples.

2.5. Carprofen Solubility

Aliquots of 10 mg CP were iteratively incorporated in 100 mL fresh PBS with continuous stirring until transparency disappeared (true saturation). Subsequently, the vial was stored for 24 h/20 °C in darkness to become limpid. The supernatant was filtered through nylon 0.45 µm and diluted 1:1000. Finally, it was analyzed with HPLC-UV and interpolated in a calibration line yielding a CP solubility of 1781.92 µg/mL.

2.6. HPLC-UV

Chromatographic analysis (Waters LCM1 plus; Waters Co., Milford, Maryland, USA) was performed with a C18 reversed-phase column (Symmetry 5 µm 3.9 × 150 mm[®], Waters Co., Dublin, Ireland). The mobile phase was filtered through a 0.45 µm nylon membrane (Technokroma, Barcelona, Spain) and degassed by sonication. Calibration standards and permeation samples were stored at 5 °C in closed vials that contained a minimum of 50 µL of each sample. Drug was eluted with a flow rate of

1.0 mL/min, detected at 235 nm inside the range of 2 to 3 min and integrated with serial Millenium® software (Waters Co., Milford, MA, USA).

2.7. Analytical Method Validation

Validation of the analytical procedure consisted of the evaluation of linearity, range, accuracy, recovery and precision following the concerned indications from the guidelines of European Medicines Agency [26], Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria [27], Conference on Harmonization guidelines (ICH) [28] and the Scientific Working Group for Forensic Toxicology [29]. Results were treated considering two calibration ranges: from 100 to 3.125 µg/mL in a high concentration level and from 6.25 to 0.78 µg/mL in a lower concentration level.

2.7.1. Specificity–Selectivity

It was assessed using actual samples from preliminary mucous or ophthalmic tissues permeation experiments generated as described in Section 2.2. Samples were blanks of PBSm or PBSo ($n = 3$) and blanks of PBSm or PBSo spiked with CP at 6.25 µg/mL ($n = 3$) stored in closed vials and exposed to 37 °C for 6 h prior to quantification. In addition, three last-time samples of tissue permeation tests (mucous samples and ophthalmic tissues) were also analyzed.

Resolution between CP and the first adjacent peak was estimated as described in previous studies [33]: peaks of mobile phase or sample baseline should not interfere with active peak. The peak of CP is pure (purity threshold > purity angle) and the resolution between adjacent peaks is greater than 1.5.

Assuming that a source of unspecificity could be associated with any alteration of the histology, membranes used in the tissue permeation test were inspected with the microscope as described in Section 2.8.4.

2.7.2. Linearity and Range

Linearity was verified from the assessment of precision and accuracy (see Section 2.7.4) and calculated with calibration standards prepared with PBSm (from CCS 0.78 to CCS 100) in three interday runs. The least square linear regression analysis and mathematical calculations were performed with Prism 5.0 software (GraphPad software Inc., San Diego, CA, USA). The slopes between the instrumental signal and the nominal drug concentration were estimated and differences as a function of the concentration level were evaluated with a one-way ANOVA. Differences were considered statistically significant if $p < 0.05$.

The working range between the lower and upper concentrations [28] was assumed if determination coefficients were significant ($p < 0.05$) and precision and accuracy were considered adequate as described in Section 2.7.4.

2.7.3. Determination Limits

Limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were calculated ($n = 3$) based on the standard deviation of the response and the slope of the calibration curve, used as described formerly [27,33].

2.7.4. Accuracy and Precision

Precision and accuracy values were calculated at the concentration levels of: CCS-100, CCS-6.25 and CCS-0.78. The interday values were calculated after analyzing the samples of 3 different days.

Precision was expressed as the relative standard derivation (RSD, %). The accuracy, being the closeness between the interpolated value and the nominal concentration of the standard [34], was expressed as the maximum values of the relative error (RE, %). Both were calculated as described in documents cited under Section 2.7.

2.7.5. Stability of Standards

Samples obtained during the permeation experiments were stored at 5 °C and daily analyzed without intermediate freezing. No sample stability for permeation experiments was investigated. Stability of CCS and QCS standards was verified by storing samples at 5 °C and comparing results of area/concentration ratios at the beginning and at the end of the intended storage times with an ANOVA analysis.

2.8. Applicability of the Method

In addition to the proper validation of the chromatographic quantification of CP in both types of samples, a series of permeation experiments [35] was run as a proof of concept of the experimental setup. Main premises to be fulfilled were sink conditions across the transmembrane flux; likelihood of the drug retention levels and histological integrity of the membranes after the experiment.

2.8.1. Permeation Test with Diffusion Cells

Ex vivo CP permeation test was run with vertical Franz diffusion cells (Vidra Foc, Barcelona, Spain). Surface area was 0.64 cm² and receptor chamber capacity was 4.5 mL for all the mucous membranes except for buccal mucous membranes (2.54 cm² and 12 mL of receptor chamber capacity) (see Figure 2).

Membrane specimens (mucosal or ophthalmic) were placed with the external side in contact with the donor compartment and the proximal side facing the receptor side. Then, 300 µL of CP-Sat were shown in the donor compartment. PBS was used as receptor medium under continuous stirring (200 rpm) for homogenization and kept at 37 ± 0.5 °C, except for cornea (32 ± 0.5 °C).

After slowly defrosting, mucous membranes were placed in respective Franz diffusion cells. Then, 300 µL CP-Sat was placed in the donor compartment and covered with Parafilm[®] to avoid evaporation. Samples of receptor compartment (300 µL) were withdrawn at pre-defined times during the 6 h and replaced with an equivalent volume of fresh PBS at the same temperature. CP in samples was quantitated as described in Section 2.6.

The cumulative CP permeated amounts (µg) at each time (min) were calculated from the concentration of CP in the receptor medium.

2.8.2. Recovery from Porcine Mucous Membranes or Ophthalmic Tissues

Quantification of CP retained inside the membranes required an extraction prior to analysis.

The sample series of fortified samples (FS*) were submitted to extraction as follows. Firstly, they were superficially cleaned with gauze soaked in a 0.05% solution of dodecyl sulphate followed by distilled water. Mucous or ophthalmic tissues were perforated using a 30 G needle (BD Ultra Fine™, Beckton Dickinson, Fraga, Spain), minced carefully and weighed accurately. The CP content was extracted with PBS under sonication (20 min) in an ultrasonic bath. The resulting extracted solutions were measured by HPLC, yielding the amount of CP extracted with PBS.

This kind of recovery with PBS (%) in each extracted specimen was expressed as the ratio between the experimental content of the drug and the expectable value estimated from the preparations of fortified samples.

After the permeation test, membrane specimens were similarly submitted to drug extraction. The calculation of the actual retained amount of drug in each membrane took in account the percentage of recovery obtained in the corresponding preliminary validation.

2.8.3. Drug Retention inside the Permeation Membrane

At the end of the experiment, membranes were removed and carefully cleaned with gauze soaked in a 0.05% solution of sodium lauryl sulphate, washed with distilled water and blotted dry with filter paper. The permeation area was excised and weighted and submitted to extraction as described in

Section 2.8.2. The amount of CP retained in each permeation membrane (Q_t , $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{g}$) was estimated by correcting the experimental result with the mean value of recovery percentage previously obtained during the validation with fortified standards.

2.8.4. Transmembrane Flux under Sink Conditions

The stationary flux values (J_s , $\mu\text{g}/\text{h}$) across the permeation membrane, the permeability coefficient (K_p , $\text{cm}\cdot\text{h}$) and the lag time (T_l , h) were calculated at a steady state by linear regression [36].

Results were compared with one-way ANOVA. Differences were considered significant at p -value < 0.05 .

2.8.5. Histological Integrity of the Permeation Membranes

Associated with the *in sensu stricto* analytical validation, the integrity of the tissues after the permeation experiment and untreated tissues were investigated with selective staining and optical microscopy. For this, we used ophthalmic and mucous tissue membranes used in diffusion cell permeation tests to investigate the CP recovery (intra-run replicates). In addition, samples of the same size from each untreated tissue (blank histological study) were analyzed to be able to compare treated and untreated samples ($n = 6$ for each biological membrane and $n = 1$ for untreated tissues). Untreated and treated studied tissues were collected and fixed overnight by immersion in 4% paraformaldehyde (PFA) in phosphate buffer (PBS pH 7.4, 20 mM) and further processed for paraffin embedding. Vertical histological sections were placed on a coverslip and stained with hematoxylin and eosin. Subsequently, they were observed and photographed with a Leica DMD 108 light microscope at 400 \times .

3. Results

3.1. Analytical Method Validation

Specificity–selectivity: Comparative chromatograms of the matrix effect for vaginal tissue are shown in Figure 3 in association with the microscope photograph of the corresponding membrane specimen. The chromatograms of the other tissues are available as Supplementary Materials.

Linearity and range: Based on the expectable experimental concentrations in the different permeation experiments, two ranges of carprofen concentrations were pre-defined to evaluate linearity (from 100 to 3.125 mg/mL and from 6.25 to 0.78 mg/mL).

Results of detection limit, quantification limit, accuracy and precision from CP calibration curves are summarized in Table 1.

Table 1. Linearity test of the concentration range of both curves, accuracy and precision of minimum, medium and maximum concentration value and detection and quantification limits of the chromatographic quantification of carprofen.

Carprofen	Linearity Test	
Range	p -Value	
100–3.125 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.404	
6.25–0.7813 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.0783	
Min., Medium and Max. Concentrations	Accuracy RE (%)	Precision RSD (%)
100 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.21	0.60
12.5 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.96	1.77
0.7813 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.87	1.95
	Mean	Desvest.
Detection limit ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.17	0.13
Quantification limit ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.51	0.40

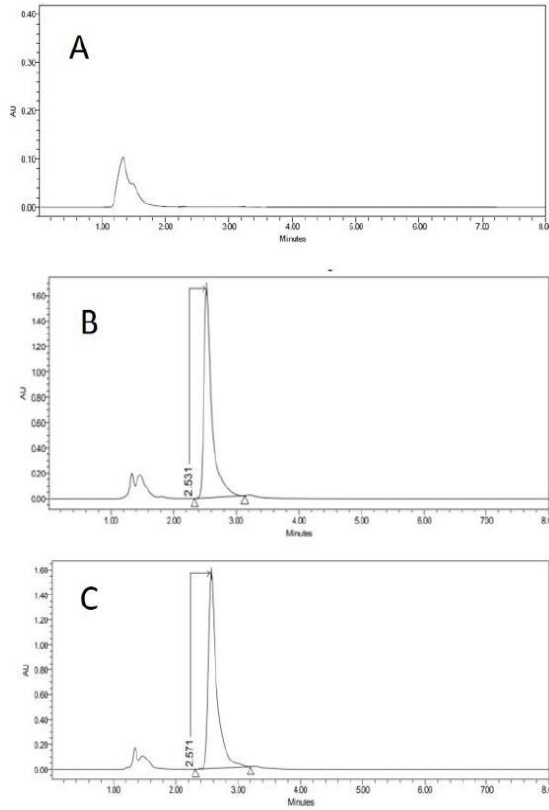


Figure 3. HPLC chromatograms of blank of PBSm (A), PBSm spiked with carprofen (B) and receptor solution after 6 h of vagina permeation (C). Y-axis in the figure is expressed in arbitrary units (AU).

3.2. Method Applicability

3.2.1. Permeation Experiment

Figures 4 and 5 show the permeation curves of CP through the ophthalmic and mucous membranes, respectively.

Figure 5 represents permeation curves of CP through buccal, sublingual and vagina mucous membranes.

Permeation parameters for ophthalmic membranes are summarized in Table 2.

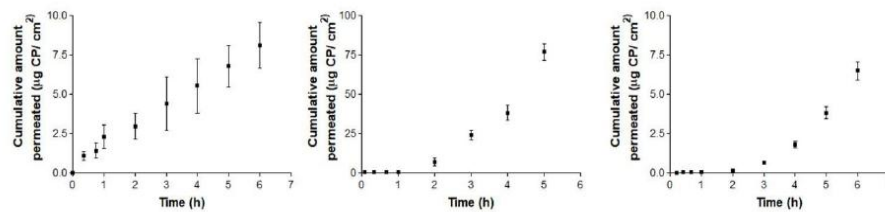


Figure 4. Ex vivo conjunctiva permeation (left), cornea (center) and sclera permeation (right) profiles of carprofen (CP) over 6 h, expressed by mean \pm SD of six replicates ($n = 6$).

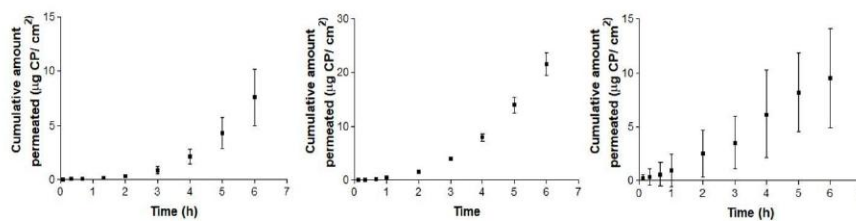


Figure 5. Ex vivo conjunctiva buccal (left), sublingual (center) and vagina permeation (right) profiles of CP over 6 h, expressed by mean \pm SD of six replicates ($n = 6$).

Table 2. Median, maximum and minimum values of flux (J_s), lag time (Tl) and permeability coefficient (Kp) of CP at 6 h from CP saturated solution (CP-Sat) through ophthalmic tissues (conjunctiva, cornea and sclera).

Carprofen	Conjunctiva (CJ)	Sclera (SC)	Cornea (CO)	<i>p</i> -Value
J_s ($\mu\text{g}/\text{h}$)	0.22 (0.09–0.34)	26.54 (15.52–37.56)	1.85 (0.14–2.34)	SC vs. CO ** SC vs. CJ ***
Tl (h)	0.91 (0.58–1.23)	1.57 (1.52–1.61)	3.29 (2.17–3.34)	NS
$K_p \times 10^2$ (cm·h)	0.045 (0.019–0.071)	5.53 (3.23–7.82)	0.39 (0.03–0.49)	SC vs. CO * SC vs. CJ ***

* *p*-value < 0.05; ** *p*-value < 0.01; *** *p*-value < 0.00.

Permeation parameters for buccal, sublingual and vaginal mucous membranes are summarized in Table 3.

Table 3. Median, maximum and minimum values of flux (J_s), lag time (Tl) and permeability coefficient (Kp) of CP at 6 h from CP-Sat through mucous membranes (buccal, sublingual and vaginal).

Carprofen	Buccal (B)	Sublingual (SB)	Vagina (V)	<i>p</i> -Value
J_s ($\mu\text{g}/\text{h}$)	1.61 (0.46–2.77)	5.1 (2.38–6.76)	7.59 (1.68–13.51)	NS
Tl (h)	3.27 (3.22–3.31)	2.83 (0.86–3.47)	0.13 (0.02–0.23)	B vs. V *** SB vs. V *
$K_p \times 10^2$ (cm·h)	0.085 (0.024–0.45)	1.0625 (0.5–1.14)	1.58 (0.35–2.81)	NS

* *p*-value < 0.05 and *** *p*-value < 0.001 and NS: Not significant.

3.2.2. Drug Recovery and Retention in Membranes

Individual CP amounts recovered with PBS from the different membranes are summarized in Table 4.

Table 5 summarizes the mean amounts of CP retained (Q_r) in each of the six membranes.

Table 4. Results of the carprofen recovery with phosphate buffered saline (PBS) of the battery of fortified samples expressed by amount before and after penetration; extracted amount of tissues and final recovery % with relative standard derivation (RSD).

Membrane	Sample	Amount in Solution, before (µg)	Amount in Solution, after (µg)	Charge (µg)	Extracted Amount (µg)	Recovery (%)	RSD (%)
Conjunctiva	FSCN-1	91.67	0.79	90.88	16.14	17.8%	15.93
	FSCN-2	91.67	0.73	90.94	12.88	14.2%	
Sclera	FSSC-1	91.67	47.70	43.97	1.05	2.4%	7.07
	FSSC-2	91.67	51.51	40.16	1.06	2.6%	
Cornea	FSCR-1	91.67	51.51	40.16	1.22	3.0%	14.17
	FSCR-2	91.67	49.13	42.54	1.58	3.7%	
Buccal	FSBC-1	98.54	0.35	98.19	1.44	1.5%	15.44
	FSBC-2	98.54	0.90	97.64	1.15	1.2%	
Sublingual	FSSL-1	98.54	56.44	42.1	1.12	2.7%	20.06
	FSSL-2	98.54	45.02	53.52	1.07	2.0%	
Vaginal	FSVG-1	98.54	1.28	97.26	23.55	24.2%	5.56
	FSVG-2	98.54	0.85	97.69	25.59	26.2%	

Table 5. Median, maximum and minimum values of retained amount (Qr) of carprofen at 6 h from CP-Sat through ophthalmic tissues (conjunctiva, cornea and sclera) and mucous membranes (buccal, sublingual and vaginal).

Carprofen	Conjunctiva (CJ)	Cornea (CO)	Sclera (SC)	p-Value
Qr (µg/cm ² /g)	22.74 (19.04–26.45)	14.21 (12.38–16.05)	48.94 (41.71–56.17)	SC vs. CO **
Carprofen	Buccal (B)	Sublingual (SB)	Vagina (V)	p-Value
Qr (µg/cm ² /g)	10.41 (9.22–11.6)	18.58 (18.25–18.91)	26.3 (26.01–26.59)	B vs. V **

** p-value < 0.01.

3.2.3. Histological Integrity of the Permeation Membranes

Histological studies of all the studied tissues have been carried out in order to verify the integrity of studied tissues after the permeation experiment. In all tissues, a blank histological study (without drug) and CP-Sat histological study have been performed.

As we can see in the following histological images of each tissue (Figures 6–11), the different layers of the untreated membrane and treated membranes are justified. The mucous membranes are composed of two parts: epithelium (a) and connective tissue (b). Inside the epithelium, the outermost part is the stratified flat keratinized epithelium (a) and the connective tissue is own laminate (b). These two parts are separated by the basal layer. This is the basic structure of the mucous membranes and each tissue presents its own particularities as detailed in the images.

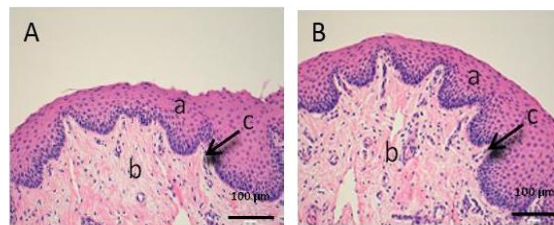


Figure 6. Histological images of vaginal mucous. (A): Untreated vaginal mucous observed at 400× and (B): Vaginal mucous treated with CP-Sat observed at 400×. a: stratified flat keratinized epithelium; b: own laminate and c: basal layer.

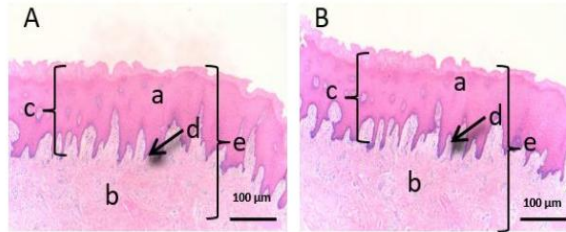


Figure 7. Histological images of buccal mucous. (A): Untreated buccal mucous observed at 400x and (B): Buccal mucous treated with CP-Sat observed at 400x. a: stratified flat keratinized epithelium; b: own laminae; c: dermal papilla; d: basal layer and e: buccal mucous.

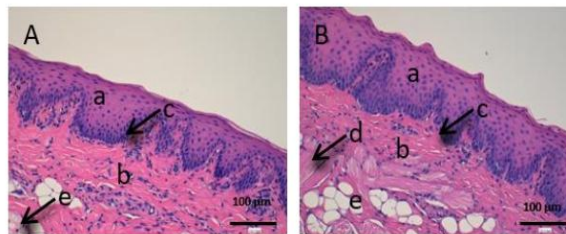


Figure 8. Histological images of sublingual mucous. (A): Untreated sublingual mucous observed at 400x and (B): Sublingual mucous treated with CP-Sat observed at 400x; a: stratified flat keratinized epithelium; b: own laminae; c: basal layer; d: muscle and e: collagen fibers.

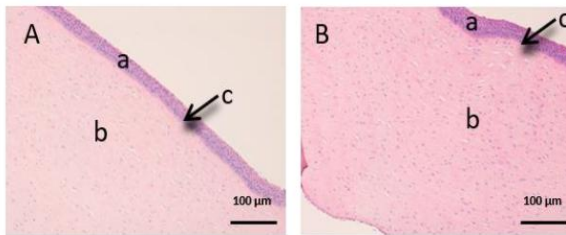


Figure 9. Histological images of cornea. (A): Untreated cornea observed at 400x and (B): Cornea treated with CP-Sat observed at 400x. a: stratified flat keratinized epithelium; b: own laminae. c: Bowman's membrane.

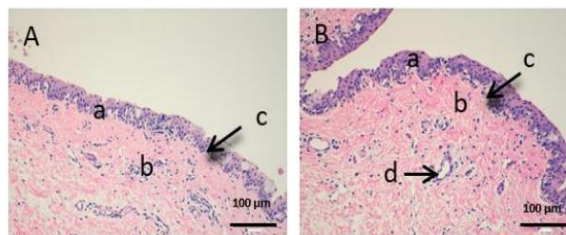


Figure 10. Histological images of conjunctive mucous. (A): Untreated conjunctive mucous observed at 400x and (B): Conjunctive mucous treated with CP-Sat observed at 400x. a: stratified flat keratinized epithelium; b: own laminae and c: hair follicle.

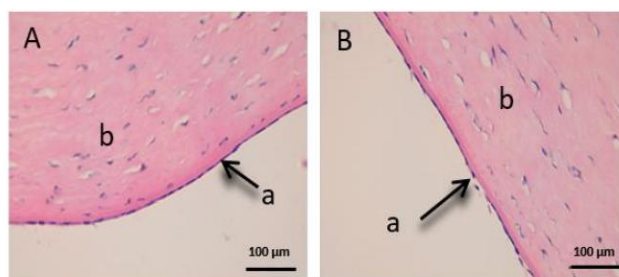


Figure 11. Histological images of sclera. (A): Untreated sclera observed at 400× and (B): Sclera treated with CP-Sat observed at 400×. a: stratified flat keratinized episclera and b: stroma (collagen fibers).

The vaginal mucous tissue has the peculiarity of having many undulations (Figure 6). This shape is to facilitate mounting with the swine male. Another peculiarity of this tissue is that the epithelium (a) may have different thickness depending on the phase of the oestrous cycle.

We can see that the buccal mucosa (Figure 7) presents a very thick epithelium that forms the dermal papilla (c).

The sublingual mucous tissue (Figure 8) presents some peculiarities since it is a more muscular tissue (c) and with collagen fibers (d).

In Figure 9, we can see the cornea. It is a very fragile and fine fabric. The epithelium (a) and the lamina propria (b) are separated by a thin layer called Bowman’s membrane (c).

Figure 10 shows the images of the conjunctiva. It is a highly vascular tissue and we can see hair follicles that belong to the eyelashes (d).

Finally, we can see the structure of the sclera (Figure 11). This tissue is also very fine, fragile and delicate. The episclera (a) is the outermost layer and the stroma (b) is made up of collagen fibers.

4. Discussion

4.1. Analytical Method Validation

Specificity–selectivity: peaks detected regularly before the first 2 min in all samples were attributed to the sample injection because it appeared regularly in all tested samples (both CCS and also permeation samples). The CP peak appeared between 2–3 min. Resolution calculated for any detected minor peak revealed this method to be acceptably selective for CP [26,27].

Linearity and range: all determination coefficients indicate (statistically) significant differences ($p < 0.05$) of the linear relationships between CP concentration and the chromatographic areas. Satisfactory linearity within the tested concentrations was demonstrated because no statistical differences were found ($p > 0.05$).

Detection limit and quantification limit: predictions from both calibration ranges are similar. Assuming a cell volume of 4.5 mL, and considering that 300 µL × 1500 µg/mL have been used as donor solution, the minimum value of LOQ assures the adequate measurement of up to a minimum of 0.4% of the dose applied in the permeation experiment.

Accuracy and precision from CP calibration curves: both parameters were lower than the 15% limit values suggested in European Medicines Agency (EMA) guidelines [26] and statistical differences ($p < 0.05$) in the ANOVA test were not found between CCS replicates at the same concentration level. These results suggest that the proposed method used is adequately accurate and precise for the entire interval (0.78–100 µg/mL).

4.2. Method Applicability

4.2.1. Permeation Experiments

According to the permeation experiments, sink conditions [37] were accomplished in the receptor compartment (receptor volume \geq three times the saturation volume) as a premise for this validation. Sink compliance was verified considering the experimental solubility of CP in PBS and the maximum permeation levels achieved in each case.

Conjunctiva membrane permeation (Figure 4: left) exhibits a typical stationary permeation (linear) since time zero. Conversely, sclera and cornea membranes curves (Figure 4: center and 4: right) are concave, suggesting the existence of a relevant lag time until the second hour (in cornea) and third hour (in sclera). Maximum permeated amount occurred in the case of corneal permeation, and its equivalent concentration did not reach the limit of sink conditions, which is proven by the shape of the curve. Consequently, in the ophthalmic tissues, corneal permeation has the maximum value (49.06 μg), which represents a concentration rounding about 220.78 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Concerning mucosal membranes, the buccal and sublingual profiles (Figure 5: left and 5: center) are concave, suggesting an increase in the permeation flux after the third hour in both tissues. However, vagina mucous membrane permeation (Figure 5: right) shows linear permeation since the beginning, without a lag time. In this case, the levels at 6 h of the three cases are quite similar, rounding the maximum value at 18.24 μg for the buccal permeation, which represents a concentration of about 218.89 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Summarizing, the maximum permeated amount with ophthalmic tissues is 49.06 μg , which represents 2.80% of the CP saturation value. Relating to the mucosal membranes, the maximum amount permeated is 18.24 μg , which represents 1.02% of the CP saturation value. In both series, the maximum permeated amounts represent less than 20% of the CP solubility, estimated in Section 2.5, which fulfill this experimental premise.

Concerning the likelihood of drug retention values, actual results fall near what has been achieved by other authors with similar drugs. Corneal permeation of NSAIDs is known to be higher than through other ophthalmic structures [38]. The adequacy of ophthalmic tissues of the specifications of variability given by the bioanalysis guidance can be corroborated based on some published comparisons between experimental values and incurred samples, seeming to fall below 20% [39].

After the permeation test, statistical differences between ophthalmic tissues were observed for flux and permeability coefficients. CP flux (J_s) is significantly faster through sclera than in conjunctiva and cornea. These results may be due to their different anatomical structures and the product formulation [40–42]. In addition, several studies support that, although cornea and sclera have a similar thickness (900 μm), the sclera is ten times more permeable [42,43]. No previous studies of the conjunctiva have been found. On the other hand, K_p is significantly higher in sclera than in conjunctiva and cornea. Therefore, conjunctiva and cornea have a lower permeability, CP stays longer in the tissue and this is a beneficial factor for future studies of locally-acting anti-inflammatory treatments with a low number of drug administrations.

On the other hand, flux (J_s) is quite low and very similar in the three mucous membranes. Lag time is the time required to reach the steady state [35], suggesting a rapid absorption of CP through buccal and sublingual mucous membranes and more slowly in vagina mucous membrane. These differences can be explained due to the structure of the tissues [44]. No significant differences in K_p values are observed. In summary, permeabilities are lower than in ophthalmic tissues and an acceptable histological innocuousness is expectable.

4.2.2. Drug Recovery and Drug Retention in Membranes

The maximal recovery has been achieved with the vaginal mucous membrane (26.2%) and the lowest with buccal mucous membrane (1.2%).

The use of organic solvents instead of PBS would achieve a higher recovery but would compromise the histological integrity of the membranes, which is the main intention of this experiment. This distortion prevents the performing of the subsequent histological analysis. In fact, previous validation studies [45] prove that CP can be degraded by using alcoholic or halogenated organic solvents, further reinforcing the use of aqueous PBS for extraction testing.

As we can see in Table 5, the retained amount (Qr) in conjunctiva and sclera (22.74 and 48.94 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{g}$, respectively) is higher than in cornea (14.21 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{g}$). The high retention of CP in the cornea favors a prolonged release. A similar study [46] with pig cornea and CP nanoparticles showed about 50.43 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{g}$. Those results are not directly comparable with this experiment due to differences in formulation and methodology, but the similarity of achieved values confirms its suitability.

In studied mucous membranes (see Table 5) Qr is very similar in the vagina and sublingual mucous membranes, with vagina mucous being the highest (26.3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{g}$) in proportional relationship with the transmembrane flux. In contrast, the minor Qr belongs to buccal mucous membrane (10.41 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{g}$). These differences between buccal and sublingual mucous may be due to structural tissue differences [44]. In this case, the high Qr in the sublingual mucous makes CP a very interesting candidate drug to be administered locally in this tissue [47].

Similar levels of drug retention in ophthalmic membranes have been obtained with pranoprofen, another NSAID with similar physico-chemical properties [33]. These results confirm that, although the percentage of recovery is pitifully low, the correction calculated on the basis of the validation can be used to estimate the expected total amount of drug retained in each specific tissue.

4.2.3. Histological Integrity of the Permeation Membranes

In order to evaluate the histological images, it is necessary to observe and compare some parameters. The most important part to assess whether a tissue has suffered any damage is the outermost part (in this case the stratified flat keratinized epithelium), since it is the part that has more direct contact with the drug. Furthermore, it is also important to observe that the rest of the cellular structures do not present any type of alteration [48,49]. Therefore, we will analyze the images of each studied tissue separately.

Figures 6–8 represent vaginal, buccal and sublingual mucous, respectively. Figure 6 shows the untreated vaginal mucous tissue (Figure 6A) and treated with CP-Sat (Figure 6B). If we compare two figures, we can see no differences are observed and we can say that the outermost part is not damaged in the treated tissue. Figure 7 shows the buccal mucous. As can be seen, part of the epithelium (the outermost part) does not show alterations or cellular changes. The sublingual mucous tissue is represented in Figure 8. It can be seen that both photos (Figure 8A: untreated tissue and Figure 8B: treated tissue) show no damage and therefore that the treated tissue with CP-Sat has not suffered any alteration.

Figures 9–11 represent the ocular tissues: cornea, conjunctiva and sclera, respectively. If we look at Figure 9B (cornea treated with CP-Sat), we can see that neither the cell structure nor the epithelium (a) show alterations. Then, we can see Figure 10 (conjunctiva), Figure 10B (conjunctiva treated with CP-Sat) does not present any difference with Figure 10A (untreated fabric). Therefore, no structure has been affected. Finally, as we can see in Figure 11B, no structural part of the sclera is affected.

In summary, we did not observe histopathological damage between the control samples (untreated) and samples treated with CP-Sat. The cellular structure in all the tissues studied shows a normal morphology and distribution. Therefore, we can say that the method used does not affect the cellular structure of the studied tissues.

5. Conclusions

In this study, a specific *ex vivo* procedure and a simple high-performance liquid chromatographic method to quantify CP in permeation and retention samples obtained in porcine mucous membranes or ophthalmic tissues has been set-up and validated. The results demonstrate an adequately selective,

accurate and precise method. The validity of the experimental procedure can be confirmed based on the compliance of sink conditions, likelihood of results and histological integrity of the membranes, ensuring its predictability. Results confirm that this experimental set-up is an acceptable procedure to test local distribution of NSAIDs, which is a desirable alternative to circumvent the adverse effects of CP when administered systemically.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2306-7381/7/4/152/s1>, Figure S1: PBSo spiked with Carprofen (top) and receptor solution after 6 h of conjunctiva permeation (bottom). Y-axis in the figure is expressed in arbitrary units (AU); Figure S2: PBSo spiked with Carprofen (top) and receptor solution after 6 h of cornea permeation (bottom); Figure S3: PBSo spiked with Carprofen (top) and receptor solution after 6 h of sclera permeation (bottom); Figure S4: PBSo spiked with Carprofen (top) and receptor solution after 6 h of sclera permeation (bottom); Figure S5: PBSm spiked with Carprofen (top) and receptor solution after 6 h of sublingual permeation (bottom); Table S1: Six calibration curves of Carprofen (high range) expressed by concentration ($\mu\text{g/mL}$) versus arbitrary units (AU). Linearity test about ratios of AU/Concentration. ANOVA test and P Value; Table S2: Six calibration curves of Carprofen (low range) expressed by concentration ($\mu\text{g/mL}$) versus arbitrary units (AU). Linearity test about ratios of AU/Concentration. ANOVA test and P Value; Table S3: Slopes and standard deviation (desvest.) of Y-intercept about six Carprofen calibration curves (low range) needed to calculate Determination Limit and Quantification Limit (expressed by mean and desvest.); Table S4: Experimental concentrations of six Carprofen calibration curves (high range in $\mu\text{g/mL}$) and its corresponding mean, standard deviation (desvest.), relative error (RE %) and relative standard derivation (RSD %); Table S5: Experimental concentrations of six Carprofen calibration curves (low range in $\mu\text{g/mL}$) and its corresponding mean, standard deviation (desvest.), relative error (RE %) and relative standard derivation (RSD %).

Author Contributions: Conceptualization, A.C.C. and Á.G.; data curation, L.G.-S., A.P. and A.C.C.; formal analysis, L.G.-S., A.P. and A.C.C.; investigation, L.G.-S. and A.P.; methodology, L.G.-S. and A.P.; project administration, A.B.-M., A.C.C. and Á.G.; resources, L.G.-S., A.P. and Á.G.; software L.G.-S. and A.C.C.; supervision, A.B.-M., A.C.C. and Á.G.; validation, L.G.-S., A.P. and A.C.C.; visualization, L.G.-S., A.B.-M. and A.C.C.; roles/writing—original draft, L.G.-S.; writing—review and editing, A.B.-M. and A.C.C. All authors contributed to the article. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: We thank Alba Gómez-Segura for their technical assistance in the preparation of the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Kujubu, D.A.; Fletcher, B.S.; Varnum, B.C.; Lim, R.W.; Herschman, H.R. TIS10, a phorbol ester tumor promoter inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 12866–12872.
2. Kerr, A.C.; Muller, F.; Ferguson, J.; Dawe, R.S. Occupational carprofen photoallergic contact dermatitis. *Br. J. Dermatol.* **2008**, *159*, 1303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Sanderson, R.O.; Beata, C.; Flipo, R.M.; Genevois, J.P.; Macias, C.; Tacke, S.; Vezzoni, A.; Innes, J.F. Systematic review of the management of canine osteoarthritis. *Vet. Rec.* **2009**, *164*, 418–424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Vasseur, P.B.; Johnson, A.L.; Budsberg, S.C.; Lincoln, J.D.; Toombs, J.P.; Whitehair, J.G.; Lentz, E.L. Randomized, controlled trial of the efficacy of carprofen, a nonsteroidal anti-inflammatory drug, in the treatment of osteoarthritis in dogs. *J. Am. Vet. Med. A* **1995**, *206*, 807–811.
5. Vangroenweghe, F.; Duchateau, L.; Boutet, P.; Lekeux, P.; Rainard, P.; Paape, M.J.; Burvenich, C. Effect of carprofen treatment following experimentally induced *Escherichia coli* mastitis in primiparous cows. *J. Dairy Sci.* **2005**, *88*, 2361–2376. [[CrossRef](#)]
6. Bergmann, H.M.; Nolte, I.; Kramer, S. Comparison of analgesic efficacy of preoperative or postoperative carprofen with or without preincisional mepivacaine epidural anesthesia in canine pelvic or femoral fracture repair. *Vet. Surg.* **2007**, *36*, 623–632. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Sidler, M.; Fouché, N.; Meth, I.; Von Hahn, F.; Von Rechenberg, B.; Kronen, P.W. Transcutaneous treatment with vetdrop sustains the adjacent cartilage in a microfracturing joint defect model in sheep. *Open Orthop. J.* **2013**, *7*, 57–66. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Elitok, B.; Elitok, Ö.M. Clinical efficacy of carprofen as an adjunct to the antibacterial treatment of bovine respiratory disease. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* **2004**, *27*, 317–320. [[CrossRef](#)]

9. Lockwood, P.W.; Johnson, J.C.; Katz, T.L. Clinical efficacy of flunixin, carprofen and ketoprofen as adjuncts to the antibacterial treatment of bovine respiratory disease. *Vet. Rec.* **2003**, *152*, 392–394. [[CrossRef](#)]
10. Armstrong, S.; Tricklebank, S.; Lake, A.; Frean, S.; Lees, P. Pharmacokinetics of carprofen enantiomers in equine plasma and synovial fluid—A comparison with ketoprofen. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* **1999**, *22*, 196–201. [[CrossRef](#)]
11. Lees, P.; Landoni, M.F.; Giraudel, J.; Toutain, P.L. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in species of veterinary interest. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* **2004**, *27*, 479–490. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Lascelles BD, X.; Cripps, P.J.; Jones, A.; Waterman-Pearson, A.E. Efficacy and kinetics of carprofen, administered preoperatively or postoperatively, for the prevention of pain in dogs undergoing ovariohysterectomy. *Vet. Surg.* **1998**, *27*, 568–582. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Grisneaux, E.; Pibarot, P.; Dupuis, J.; Biais, D. Comparison of ketoprofen and carprofen administered prior to orthopedic surgery for control of postoperative pain in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **1999**, *215*, 1105–1110. [[PubMed](#)]
14. Slingsby, L.S.; Waterman-Pearson, A.E. Analgesic effects in dogs of carprofen and pethidine together compared with the effects of either drug alone. *Vet. Rec.* **2001**, *148*, 441–444. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Slingsby, L.S.; Waterman-Pearson, A.E. Comparison between meloxicam and carprofen for postoperative analgesia after feline ovariohysterectomy. *J. Small Anim. Pract.* **2002**, *43*, 286–289. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. McGeown, D.; Danbury, T.C.; Waterman-Pearson, A.E.; Kestin, S.C. Effect of carprofen on lameness in broiler chickens. *Vet. Rec.* **1999**, *144*, 668–671. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Roughan, J.V.; Flecknell, P.A. Behaviour-based assessment of the duration of laparotomy-induced abdominal pain and the analgesic effects of carprofen and buprenorphine in rats. *Behav. Pharmacol.* **2004**, *15*, 461–472. [[CrossRef](#)]
18. Hawkins, M.G.; Taylor, I.T.; Craigmill, A.L.; Tell, L.A. Enantioselective pharmacokinetics of racemic carprofen in New Zealand white rabbits. *J. vet. Pharmacol. Therap.* **2008**, *31*, 423–430.
19. Simmons, D.L.; Regina, M.B.; Hla, T. Cyclooxygenase isozymes: The biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol. Rev.* **2004**, *56*, 387–437. [[CrossRef](#)]
20. MacPhail, C.M.; Lappin, M.R.; Meyer, D.J.; Smith, S.G.; Webster, C.R.; Armstrong, P.J. Hepatocellular Toxicosis Associated with Administration of Carprofen in 21 Dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **1998**, *212*, 1895–1901.
21. Chumbler, N.S.; Schildt, J.C.; Mawby, D.I.; Papich, M.G. Use of intravenous lipid therapy in a cat with carprofen overdose. *Clin. Case Rep.* **2020**, *8*, 653–657. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Trepanier, L.A. Idiosyncratic Drug Toxicity Affecting the Liver, Skin, and Bone Marrow in Dogs and Cats. *Vet. Clin. Small Anim.* **2013**, *43*, 1055–1066. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Mealey, K.L.; Matthews, N.S.; Peck, K.E.; Burchfield, M.L.; Bennett, B.S.; Taylor, T.S. Pharmacokinetics of R(−) and S(+) carprofen after administration of racemic carprofen in donkeys and horses. *Am. J. Vet. Res.* **2004**, *65*, 1479–1482. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Becker, L.; Eberlein-König, B.; Przybilla, B. Phototoxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs: In vitro studies with visible light. *Acta Derm. Venereol.* **1996**, *76*, 337–340. [[PubMed](#)]
25. McPherson, M.L.; Cimino, N.M. Topical NSAID formulations. *Pain Med.* **2013**, *14*, S35–S39. [[CrossRef](#)]
26. European Medicines Agency (EMA). Guideline on Bioanalytical Method Validation-2011. Available online: <http://www.ema.europa.eu/docs/enGB/documentlibrary/Scientificguideline/2011/08/WC500109686.pdf> (accessed on 15 February 2020).
27. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI). Validación de métodos analíticos- 2001 Version [homepage on the Internet]. Available online: <https://www.aefi.org/venta-publicaciones/78-validacion-de-metodos-analiticos/> (accessed on 15 February 2020).
28. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. Harmonised Guideline Bioanalytical Method Validation m10. Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-m10-bioanalytical-method-validation/> (accessed on 15 February 2020).
29. Scientific Working Group for Forensic Toxicology. Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. *J. Anal. Toxicol.* **2013**, *37*, 452–474. [[CrossRef](#)]

30. Brugués, A.P.; Naveros, B.C.; Calpena Campmany, A.C.; Pastor, P.H.; Saladrigas, R.F.; Lizandra, C.R. Developing cutaneous applications of paromomycin entrapped in stimuli-sensitive block copolymer nanogel dispersions. *Nanomedicine* **2015**, *10*, 227–240. [CrossRef]
31. Netzlaff, F.; Schaefer, U.F.; Lehr, C.M.; Meiers, P.; Stahl, J.; Kietzmann, M.; Niedorf, F. Comparison of bovine udder skin with human and porcine skin in percutaneous permeation experiments. *Altern. Lab. Anim.* **2006**, *34*, 499–513.
32. Seto, J.E.; Polat, B.E.; Lopez RF, V.; Blankschtein, D.; Langer, R. Effects of ultrasound and sodium lauryl sulfate on the transdermal delivery of hydrophilic permeants: Comparative in vitro studies with full-thickness and split-thickness pig and human skin. *J. Control. Release* **2010**, *145*, 26–32. [CrossRef]
33. Cañadas-Enrich, C.; Abrego, G.; Alvarado, H.L.; Calpena-Campmany, A.C.; Boix-Montañes, A. Pranoprofen quantification in ex vivo corneal and scleral permeation samples: Analytical validation. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* **2018**, *160*, 109–118. [CrossRef]
34. Sanz, R.; Clares, B.; Mallandrich, M.; Casals, I.; Bellido, D.; Calpena, A.C. Validation of doxepin quantitative determination methods for their application to in vitro, ex vivo and in vivo studies. *Curr. Pharm. Anal.* **2015**, *11*, 269–277. [CrossRef]
35. OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Skin Absorption: In Vitro Method-2018. Available online: <https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oced/ocedtg428-508.pdf/> (accessed on 15 February 2020).
36. Gómez-Segura, L.; Parra, A.; Gimeno, A.; Calpena, A.C.; Gómez de Aranda, I.; Boix-Montañes, A. Ex Vivo Permeation of Carprofen Vehiculated by PLGA Nanoparticles through porcine Mucous Membranes and Ophthalmic Tissues. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 355. [CrossRef] [PubMed]
37. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare: Recommendations on Dissolution Testing-2018 Version. Available online: <https://www.edqm.eu/sites/default/files/institutional-brochure-edqm.pdf/> (accessed on 15 February 2020).
38. Lindstrom, R.; Kim, T. Ocular permeation and inhibition of retinal inflammation: An examination of data and expert opinion on the clinical utility of nepafenac. *Curr. Med. Res. Opin.* **2006**, *22*, 397–404. [CrossRef]
39. Gabani, B.B.; Kiran, V. Incurred sample reanalysis of cefuroxime in rabbit ocular tissues—A case study. *Biomed. Chromatogr.* **2020**, *34*, e4737. [CrossRef] [PubMed]
40. Olsen, T.W.; Sanderson, S.; Feng, X.; Hubbard, W.C. Porcine Sclera: Thickness and surface area. *Inv. Ophthalm. Vis. Sci.* **2002**, *43*, 2529–2532.
41. Menduni, F.; Davies, L.N.; Madrid-Costa, D.; Fratini, A.; Wolffsohn, J.S. Characterisation of the porcine eyeball as an in-vitro model for dry eye. *Contact Lens Anterior.* **2018**, *41*, 13–17. [CrossRef] [PubMed]
42. Sanchez, I.; Martin, R.; Ussa, F.; Fernandez-Bueno, I. The parameters of the porcine eyeball. *Graefes Arch. Exper. Ophthalm.* **2011**, *249*, 475–482. [CrossRef]
43. Ahmed, I.; Gokhale, R.; Shah, M.V.; Patton, T.F. Physicochemical determinants of drug diffusion across the conjunctiva, sclera and Cornea. *J. Pharm. Sci.* **1987**, *76*, 583–586. [CrossRef]
44. Domínguez-Villegas, V.; Clares-Naveros, B.; García-López, M.L.; Calpena-Campmany, A.C.; Bustos-Zagal, P.; Garduño-Ramírez, M.L. Development and characterization of two nanostructured systems for topical application of flavanones isolated from *Eysenhardtia platycarpa*. *Colloids Surf. B* **2014**, *116*, 183–192. [CrossRef]
45. Wu, A.B.; Chen, C.Y.; Chu, S.D.; Tsai, Y.C.; Chen, F.A. Stability-Indicating High-Performance Liquid Chromatographic Assay Method and Photostability of Carprofen. *J. Chromatogr. Sci.* **2001**, *39*, 7–11. [CrossRef]
46. Parra, A.; Mallandrich, M.; Clares, B.; Egea, M.A.; Espina, M.; García, M.L.; Calpena, A.C. Design and elaboration of freeze-dried PLGA nanoparticles for the transcorneal permeation of carprofen: Ocular anti-inflammatory applications. *Colloids Surf. B* **2015**, *136*, 935–943. [CrossRef] [PubMed]
47. Lam, J.K.W.; Xu, Y.; Xu, Y.; Worsley, A.; Wong, I.C.K. Oral transmucosal drug delivery for pediatric use. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, *73*, 50–62. [CrossRef] [PubMed]
48. Bacha, W.J., Jr.; Bacha, L.M. *Color Atlas of Veterinary Histology*, 3rd ed.; Wiley & BlackWell: New York, NY, USA, 2012; pp. 102–149.
49. Zimmerman, J.J.; Karriker, L.A.; Ramirez, A.; Schwartz, K.J.; Stevenson, G.W.; Zhang, J. *Diseases of Swine*, 11th ed.; Wiley & BlackWell: New York, NY, USA, 2019; pp. 292–392.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Article 2

Ex Vivo Permeation of Carprofen Vehiculated by PLGA Nanoparticles through Porcine Mucous Membranes and Ophthalmic Tissues

(Permeació *Ex Vivo* de Carprofèn Vehiculat a Nanopartícules PLGA a través de Membranes Mucoses i Teixits Oftàlmics Porcins)

Lidia Gómez-Segura, Alexander Parra, Ana Cristina Calpena-Campmany, Álvaro Gimeno, Immaculada Gómez de Aranda and Antonio Boix-Montañés

Nanomaterials 2020, 10(2), 355

<https://doi.org/10.3390/nano10020355>

Índex d'impacte: 4.324

Categoria: Q1 (Scimago Institutions ranking)

Resum

El CP, àcid propiòtic 2- (6-clorocarbazol), s'utilitza com a agent antiinflamatori, analgèsic i antipirètic i pertany a la família de medicaments antiinflamatoris no esteroideus. La CP té algunes reaccions adverses en l'administració sistèmica; per aquest motiu, l'administració tòpica amb nanopartícules de CP (CP-NPs) pot ser una alternativa òptima. L'objectiu principal d'aquest treball és la investigació de la permeació *ex vivo* de CP a través de diferents tipus de membranes mucoses porcines (bucals, sublingual i vaginal) i teixits oftàlmics (còrnea, esclera i conjuntiva) per comparar la formulació de CP-NPs sobre un Solució CP (CP-Solució). Mètode: es van avaluar els perfils de permeació *ex vivo* mitjançant cèl·lules de difusió de Franz. A més, es van realitzar estudis *in vivo* per verificar que les formulacions no afectaven l'estructura cel·lular i establir la quantitat retinguda (Q_r) als teixits. Resultats: la permeabilitat de CP-NPs és més eficaç en termes de retenció de fàrmacs en gairebé tots els teixits (a excepció de l'esclera i sublingual). Els estudis *in vivo* demostren que cap de les dues formulacions afecta l'estructura del teixit, de manera que ambdues formulacions són segures. Conclusions: Es va concloure que les CP-NPs poden ser una eina útil per al tractament tòpic de la inflamació local en medicina veterinària i humana.

Graphical Abstract

En la figura 19 es mostra el graphical Abstract d'aquest article.

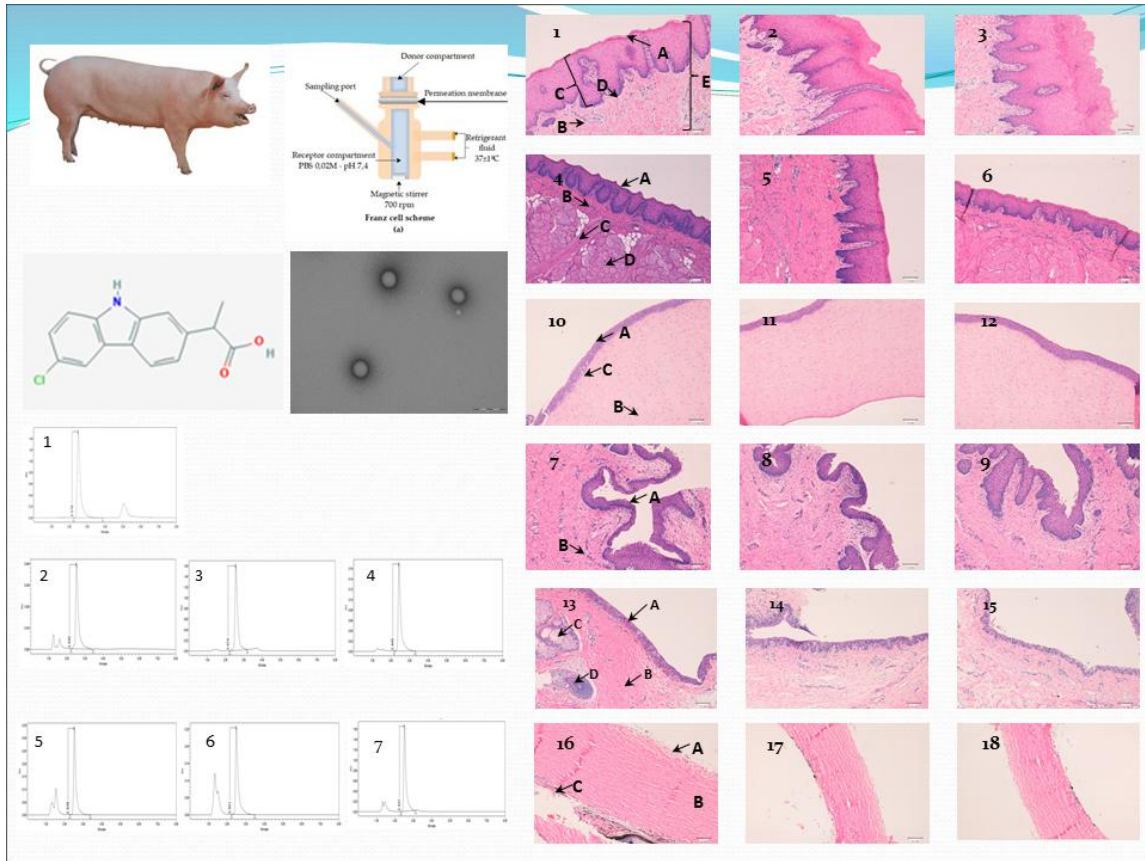





Figura 19: Graphical abstract de l'article 2.

Article

Ex Vivo Permeation of Carprofen Vehiculated by PLGA Nanoparticles through Porcine Mucous Membranes and Ophthalmic Tissues

Lidia Gómez-Segura ^{1,2} , Alexander Parra ³, Ana Cristina Calpena-Campmany ^{1,4} ,
Álvaro Gimeno ⁵, Immaculada Gómez de Aranda ⁶ and Antonio Boix-Montañes ^{1,4,*} 

¹ Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology and Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; lidia.gose@gmail.com (L.G.-S.); anacalpena@ub.edu (A.C.C.-C.)

² Department of Medicine and Animal Health, Autonomous University of Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

³ Department of Veterinary Medicine and Zootechnic, Faculty of Agricultural Sciences, University of Applied and Environmental Sciences, Bogota RX22+57, Colombia; aleparra@udca.edu.co

⁴ Institute of Nanoscience and Nanotechnology (IN2UB), University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

⁵ Department of Animal Research, Animal House of Bellvitge, University of Barcelona, CCiT-UB, 08907 Hospital del Llobregat, Spain; alvarogimeno@ub.edu

⁶ Department of Pathology and Experimental Therapeutics, Faculty of Medicine and Health Sciences, Bellvitge Campus, University of Barcelona, 08907 Hospitalet del Llobregat, Spain; igomezdearanda@ub.edu

* Correspondence: antoniboix@ub.edu; Tel.: +34-934-024-560

Received: 7 January 2020; Accepted: 10 February 2020; Published: 18 February 2020



Abstract: (1) Background: Carprofen (CP), 2-(6-chlorocarbazole) propionic acid, is used as an anti-inflammatory, analgesic and anti-pyretic agent and it belongs to the family of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). CP has some adverse reactions in systemic administration; for this reason, topical administration with CP nanoparticles (CP-NPs) can be an optimal alternative. The main objective of this work is the investigation of ex vivo permeation of CP through different types of porcine mucous membranes (buccal, sublingual and vaginal) and ophthalmic tissues (cornea, sclera and conjunctiva) to compare the influence of CP-NPs formulation over a CP solution (CP-Solution). (2) Methods: The ex vivo permeation profiles were evaluated using Franz diffusion cells. Furthermore, in vivo studies were performed to verify that the formulations did not affect the cell structure and to establish the amount retained (Q_r) in the tissues. (3) Results: Permeation of CP-NPs is more effective in terms of drug retention in almost all tissues (with the exception of sclera and sublingual). In vivo studies show that neither of the two formulations affects tissue structure, so both formulations are safe. (4) Conclusions: It was concluded that CP-NPs may be a useful tool for the topical treatment of local inflammation in veterinary and human medicine.

Keywords: nanoparticles; carprofen; solution; drug delivery system; anti-inflammatory; veterinary diseases; NSAIDs

1. Introduction

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are some of the most commonly used medications in human and veterinary medicine. Carprofen (CP), 2-(6-chlorocarbazole) propionic acid, is used as an anti-inflammatory, analgesic and anti-pyretic agent [1,2]. CP was licensed for systemic human use in several countries in the 1980s and for veterinary use in the 1990s. However, it was withdrawn for human use in the early 1990s for commercial reasons [3,4]. In veterinary medicine, it is still a reference anti-inflammatory and one of the most used in multiple species. The use of CP

has been studied in numerous animal species (horse [5,6]; dog [7–9]; cat [10]; broiler chicken [11] and rat [12]) however there are no studies in pigs.

The main effect of CP is the inhibition of cyclooxygenase (COX), an important enzyme in the arachidonic acid cascade. This process generates other mediators involved in the inflammatory response, such as prostaglandins and thromboxanes [13]. In veterinary, it is prescribed as a solution for injection or oral tablets for the relief of pain and inflammation associated with osteoarthritis and for the control of postoperative pain associated with soft tissue and orthopedic surgeries in dogs [14]. In addition to osteoarthritis [15,16] and analgesia [17,18] it has been used against respiratory diseases and other pathologies in conjunction with antibiotics [19,20] and as anti-inflammatory after systemic administration [21]. However, some adverse reactions [3] are associated with its systemic administration, and there is no topical formulation commercially available [14]. For this reason, topical administration intended for local action can be an optimal alternative in both veterinary and human medicine [22], majorly concerning mucous tissues where drug permeation is easily suitable [23].

Numerous localized pathologies in pigs could be treated topically such as ophthalmic diseases that occur with inflammation: entropion, distichiasis, trichiasis, lagophthalmia, foreign bodies, wounds, dry keratoconjunctivitis, infections, blepharitis and conjunctivitis [24,25]. Many diseases related to buccal mucous inflammation can be also treated topically: irritations, stomatitis, infectious diseases, autoimmune diseases and fights [26]. Additionally, CP can also treat diseases that cause vaginal inflammation: microbial and parasitic infections, neoplasms, cervicitis, mucometer and subinvolution of placental sites [27,28].

The investigation of most of those pathologies in pigs is reasonably predictive of results in humans. Therefore, the study of anti-inflammatories in this species can provide much information for both veterinary and human medicine.

The suitability of a drug to penetrate through the mucous membrane is correlated with its physicochemical properties, as well as, the pharmaceutical formulation [29–31]. On the other hand, it is absolutely necessary the understanding of the processes, pathways and driving forces affecting the transmucosal permeation of the drug [32]. Following these premises, the best way to investigate the dosage of new drugs is in vivo studies. However, in early stages of drug development, in vivo studies are not easy to perform since there are specific ethical and regulatory considerations. Instead, ex vivo studies are an alternative for the investigation of formulations with topical action [33]. Although variations in the experimental setup of diffusion cells could affect the results, some factors (temperature, receptor medium, diffusion area, etc.) can be standardized to obtain consistent and predictive results. Similarly, the availability and acceptability of the mucosal formulations are directly related to the properties of the vehicle/vehicle used [34]. Therefore, characteristics of an ex vivo model to evaluate a new therapeutic agent with localized action on mucous membranes can be very much informative. For example, the comparison of different mucous membranes for the same drug and formulation enhances the robustness of a new animal model to predict topical absorption in humans [35]. Thus, the main goals of this work were the screening of different types of porcine mucous membranes in ex vivo permeation studies of CP, as well as the evaluation of the anti-inflammatory efficacy.

Another aspect to consider when treating a localized topical inflammation concerns formulation effect. It must be ensured that the drug reaches the site of action at therapeutic concentrations and, in addition, these concentrations are maintained for a prolonged time to reduce inflammation. In this sense, the use of nanoparticles (NPs) can be a good alternative to conventional drugs. They represent promising drug carriers for topical applications [36]. For topical treatments in swine, it is necessary to develop drug delivery systems that allow and facilitate the handling of the animal. The slow release nanoparticles such as those consisting of poly D, L-lactide-co-glycolide acid (PLGA) have the advantage that they are more durable over time and therefore do not require as many administrations as systemic conventional solution or tablets.

The main objectives of this work are the investigation of *ex vivo* permeation of CP through different types of porcine mucous membranes or commonly involved ophthalmic tissues to compare the influence of a PLGA NP formulation [32,36] over a mere drug solution.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

CP was obtained from Capot Chemical (Hangzhou, China) and NPs of CP were prepared as described before [32,36]. Deionized water was obtained from a MilliQ1 Plus System lab. Ketamine (Imalgene[®]) of Merial-Boehringer Ingelheim (Sant Cugat del Vallés, Spain); Xylazine (Rompun[®]) of Bayer Hispania (Sant Joan Despi, Spain); Midazolam Gen[®] (Midazolam); Propofol Lipuro 1%[®] (Propofol); Forane[®] (Isoflurane), Pentothal[®] (Sodium thiopental) all of them from Centauro Veterinary (Barcelona, Spain). Endotracheal tubes with a low-pressure balloon, number 7 of Centauro Veterinary. All other chemicals were of analytical grade and used without further purification.

2.2. NPs of Carprofen

Polymeric NPs of CP were transferred by the team of Parra et al. [36]. Resultant NPs of the study of Parra et al. [36] were freeze-dried and sterilized for more studies. In our investigation, freeze-dried NPs were rehydrated by slow injection of purified water ensuring proper wetting. Then, the vial was gently shaken for 2 min until complete disintegration and dissolution of the content.

2.2.1. Materials of NPs

As explained in the study by Parra et al. [36], the materials used in that study were poly (D,L-lactic-co-glycolic) acid 75:25 (Resomer[®]RG753S, Mw 36,510 Da) and purchased from Evonik Industries (Essen, Germany). Poloxamer 188 (Lutrol[®]F68) was from BASF (Barcelona, Spain). HP-CD was obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA) and CP from Capot Chemical (Hangzhou, P.R. China). Double distilled water was obtained from a MilliQ[®] Plus System, lab supplied. All other chemicals were of analytical grade and used without further purification.

2.2.2. Preparation of NPs

As detailed in the study of Parra et al. [36], NPs of matrixial structure (nanospheres) containing CP were elaborated by the solvent displacement technique under the optimized conditions. An organic solution of PLGA (1.98–7.02 mg/mL) in 10 mL of acetone containing CP (0.08–0.92 mg/mL) was poured into 20 mL of an aqueous solution of P188 (5.80–14.20 mg/mL) under moderate stirring and adjusted to pH 3.5. Acetone was evaporated and the NPs dispersion concentrated to 20 mL under reduced pressure (Buchi B-480, Flawil, Switzerland). The resulting NPs were collected by ultracentrifugation (3000 rpm, for 30 min. Sigma 301 K centrifuge, Barcelona, Spain), and washed twice with doubled distilled water [37]. Resultant NPs were freeze-dried and sterilized for *in vivo* study.

2.2.3. Physicochemical Characterization

The team of Parra et al. [36] described the physicochemical characterization of CP nanoparticles within the following parameters: mean particle size (Z-ave), polydispersity index (PI), zeta potential (ZP) and encapsulation efficiency (EE). The values of each parameter were: Z-ave, which ranged between 176.20 ± 0.36 and 250.17 ± 49.47 nm with narrow distribution; PI values $< 0.09 \pm 0.09$. ZP values ranged from -19.10 ± 1.76 to -26.20 ± 0.46 mV. EE values varied from 74.70 ± 0.95 to $97.10 \pm 1.41\%$.

2.3. Permeation Studies

2.3.1. Mucous Membranes

Three different types of porcine mucous were used as permeation membranes: buccal, sublingual and vagina. Additionally, three ophthalmic structures (sclera, cornea and conjunctiva) were also used to evaluate CP permeation and/or penetration. Ex vivo tissues were obtained under veterinary supervision from residual individuals of female pigs (cross Landrace × Large White, 25–30 kg), previously used in surgical university practices and according to the Ethics Committee of Animals Experimentation at the University of Barcelona. Pigs were anesthetized with intramuscular administration of ketamine (3 mg/kg), xylazine (2.5 mg/kg) and midazolam (0.17 mg/kg). After chirurgical experimentation, the animals were euthanized with an intravenous overdose of sodium thiopental. After debridation, samples were frozen to $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ and longitudinally cut in $700\text{ }\mu\text{m}$ slabs with a dermatome GA 630 (Aesculap, Tuttlingen, Germany) [38–40]. The integrity of the mucous tissues was verified prior to the experiment according to Section 2.4.

2.3.2. Ex Vivo Study: Franz Diffusion Cells

Ex vivo permeation study of NPs was performed in vertical Franz diffusion cells (FDC 400, Crown Glass, Somerville, NY, USA) following a previously validated procedure [41] with a diffusion area of 0.64 cm^2 for all membranes except for buccal mucous (2.54 cm^2). A dialysis membrane (Dialysis Tubing Visking, Mediacell International Ltd., London, UK) was used according to Parra et al. [36].

Mucous membrane samples were placed between the receptor and donor compartments with the proximal side in contact with the receptor medium and the mucous side in contact with the donor chamber. Samples of $300\text{ }\mu\text{L}$ were placed in the donor compartment (CP-Solution and CP nanoparticles (CP-NPs)). As receptor medium, PBS at pH 7.4 was used and kept at $32\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ under continuous stirring in accordance with sink conditions. Samples of $300\text{ }\mu\text{L}$ were withdrawn from the receptor compartment at pre-selected times for 6 h and replaced by an equivalent volume of fresh PBS at the same temperature. This experiment was done in six replicates for each tissue and formulation. At the end of the experiment, samples were analyzed by HPLC–UV.

2.3.3. HPLC–UV

The HPLC–UV apparatus consisted of a Waters LC Module I plus (Waters Co., Milford, MA, USA), with an ultraviolet detector set up at 235 nm, and Millenium[®] software (Waters Co., Milford, MA, USA). A reverse-phase column C18, $3.9 \times 150\text{ nm}$ packed with $5\text{ }\mu\text{m}$, was used (Symmetry[®], Waters Co., Dublin, Ireland). The mobile phase, previously filtered by a $0.45\text{ }\mu\text{m}$ nylon membrane filter (Technokroma, Barcelona, Spain) and degassed by sonication, consisted of methanol and potassium dihydrogen phosphate diluted in 1 L distilled water PH = 3 (75:25). The injection volume was $30\text{ }\mu\text{L}$ and the flow rate was 0.1 mL/min . This method has been validated in our laboratory and is specific and sensitive for the detection of carprofen. The retention times were 2.4–3.6 min as we can see in Figures 1–7 and Table 1.

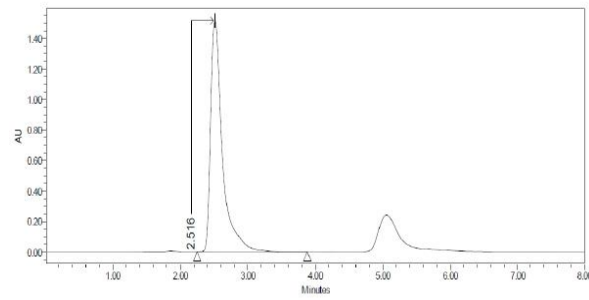


Figure 1. Chromatogram of the Carprofen (CP) validation line at concentration 100 µg/mL.

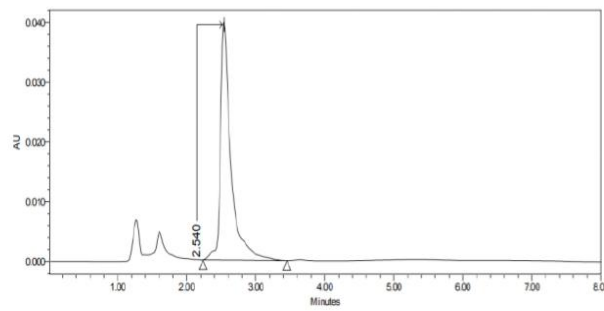


Figure 2. Chromatogram of CP nanoparticles (CP-NPs) in sclera at 6 h.

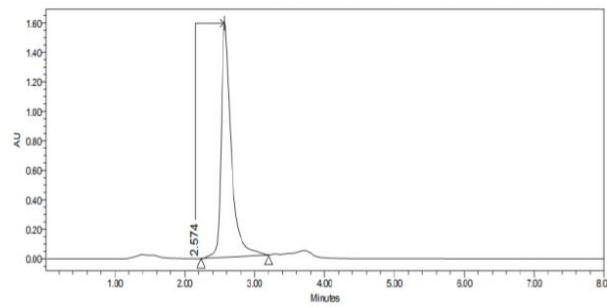


Figure 3. Chromatogram of CP-NPs in cornea at 6 h.

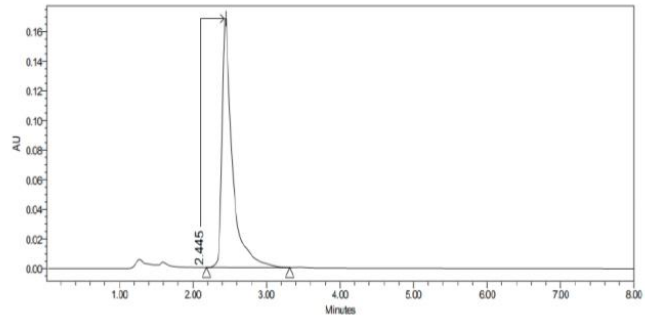


Figure 4. Chromatogram of CP-NPs in conjunctiva at 6 h.

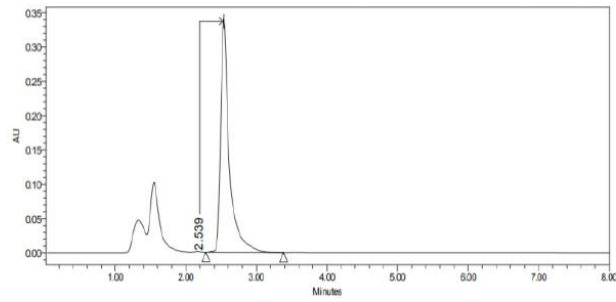


Figure 5. Chromatogram of CP-NPs in buccal mucous at 6 h.

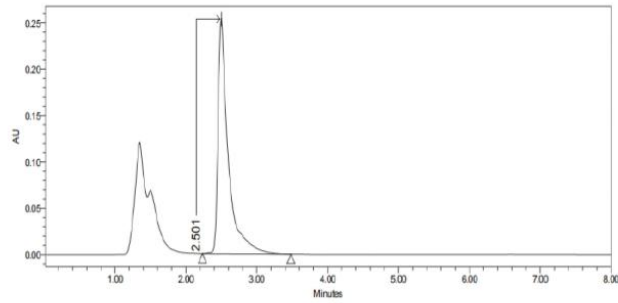


Figure 6. Chromatogram of CP-NPs in sublingual mucous at 6 h.

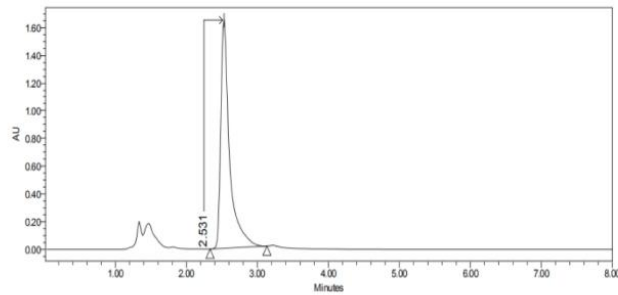


Figure 7. Chromatogram of CP-NPs in vaginal mucous at 6 h.

Table 1. Retention times (minutes) of CP-NPs in each studied tissue.

Type of Tissue	Retention Time (Minutes)
CP validation line (100 µg/mL)	2.516
Sclera	2.54
Cornea	2.574
Conjunctiva	2.445
Buccal mucous	2.539
Sublingual mucous	2.501
Vaginal mucous	2.531

2.3.4. Permeation Parameters

For the permeation assays, the flux values per unit area (J_s in mg/h cm²) across mucous membranes and the permeability coefficients (K_p in cm/h) were calculated at the steady state. Lag times (T_l) and J_s values were calculated by linear regression analysis using the Graph Pad Prism[®] software version 5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) [42]. Stationary flux values followed the following relationship:

$$J_s = Qt/A \times t \quad (1)$$

where Qt is the amount of CP which permeates into the receptor compartment (mg). A is the active cross-sectional area available for diffusion (cm²) and t is the time of exposure (h) per unit area

The permeability coefficient (K_p , cm/h) was calculated based on the relationship:

$$K_p = J_s / C_o \quad (2)$$

where J_s is the flux calculated per unit area at the steady state and C_o is the drug concentration in the donor compartment.

Partition parameter (P_1) and diffusion parameter (P_2) were estimated from the following equations:

$$T_l = 1/6 \times P_2 \quad (3)$$

$$K_p = P_1 \times P_2 \quad (4)$$

The predicted steady-state plasma concentration (C_{ss}) of drug that would penetrate mucous barrier after topical application, was obtained using the following equation:

$$C_{ss} = (J_s \times A) / Cl_p \quad (5)$$

where C_{ss} is the plasma steady-state concentration, J_s the flux/area obtained in this study, A the hypothetical area of application and Cl_p the plasmatic clearance. Calculations were addressed on the basis of a maximum application area of 1 cm² and Cl_p values of 2.18 L/h +/- 0.42.

The retained amount of drug in the tissue (Q_r , µg/cm²) was calculated with the following formula:

$$Q_r = (Ex/Px) / A \times 100/R \quad (6)$$

where Ex (mcg) is the amount of drug extracted, Px (g) is the weight of the permeated mucous membranes, A (cm²) is the active cross-sectional area available for diffusion and R is the percentage of recovery of the drug, obtained as described formerly [41].

2.3.5. Statistical Analysis

Nonparametric analysis was performed in these studies because drug permeation through animal tissues follows more closely a log-normal than a normal (Gaussian) distribution [43]. Nonparametric t -test (Graph Pad Prism[®] 5.01, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) assessed the significance

of the differences between formulations and groups of membranes. A p -value < 0.05 was accepted as significant.

2.4. In Vivo Studies

Integrity of the mucous tissues after in vivo formulations application was investigated with optical microscopy. The studies were conducted under a protocol approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the University of Barcelona (Spain) with ethical approval code 10619.

Thirteen female pigs (Yorkshire-Landrace) of 45–50 kg were anesthetized for 6 h with a standard sedation protocol based on IM ketamine (Imalgene®) at 3 mg/kg; IM xylazine HCl (Rompun®) at 2.5 mg/kg and IM midazolam (MidazolamGen®) at 0.17 mg/kg. Afterward, anesthesia was induced with IV propofol (Propofol Lipuro 1%®) at 2.5 mg/kg from Boehringer Ingelheim, Bayer AG, GES and BBraun, respectively. Maintenance for 6 h was achieved with inhaled isoflurane (Forane® 2%) of Centauro Veterinary administered by tracheal intubation with a low-pressure balloon, number 7.

One female pig was not administered anything (white). CP-Solution was administered to six female pigs and CP-NP was administered to six female pigs (thirteen female pigs in total). Each formulation (CP-Solution and CP-NP) was administered topically and locally in each studied tissue (conjunctiva, cornea, sclera, buccal mucous, sublingual mucous and vaginal mucous) in pigs. The same formulation (CP-Solution or CP-NP) was administered in the tissues studied in the same pig. In summary, $n = 6$ for each biological membrane and formulation and $n = 1$ for each untreated biological membrane. The reason why a single pig was used to collect untreated samples is that we did not expect to find cellular or structural changes in healthy untreated pigs. In this way, the number of animals used is reduced, as indicated in the regulation of 3R (Reduce, Replace and Refine) of animal investigation.

After the in vivo permeation phase, studied porcine mucous and ophthalmic tissues were obtained immediately after the animals were sacrificed by an intravenous overdose of sodium thiopental. Samples were collected and fixed overnight (ON) by immersion in 4% paraformaldehyde (PFA) in phosphate-buffered (PB) 20 mM, pH 7.4 and further processed for paraffin embedding. Vertical histological sections were obtained, stained with hematoxylin and eosin and mounted under a cover slip to be observed at 400× and photographed with a Leica DMD 108 optical microscope. In addition, part of the original tissue was used to calculate the in vivo retained amount (Q_r) of the drug.

Determination of the Amount of Drug Remaining in the Mucous Membrane

At the end of the in vivo study, the mucous membrane specimens were used to determine the amount of retained drug. Mucous and ophthalmic samples were carefully cleaned with gauze soaked in a 0.05% solution of sodium lauryl sulfate, washed with distilled water and blotted dry with filter paper. The permeation area was then excised and weighed. Later, different tissues were perforated using a 30 G needle (BD Ultra Fine™, Beckton Dickinson, Fraga, Spain). Its CP content was extracted with methanol/buffer phosphate solution in an ultra-sonic processor for 20 min ($n = 6$ for each biological membrane and formulation). The resulting solutions were measured by HPLC–UV yielding the amount of CP retained in the membrane (Q_r , mg/g.cm² of mucous membrane).

3. Results

3.1. Permeation Studies

The permeation studies were done six replicates for each tissue and formulation. Permeation parameters are summarized in Tables 2 and 3. Results are expressed as median, maximum and minimum values for each type of membrane and formulation. Significant differences are observed between several membranes, especially conjunctiva, buccal, sublingual and vaginal. In contrast, there are almost no significant differences between the cornea and the sclera. However, other trends have been detected and discussed. In addition, we can see in Figures 1–7 the chromatograms and CP-NPs retention times of each tissue are detailed in Table 1.

Table 2. Median, maximum and minimum values of flux (J_s), lag time (T_l), P1, P2, permeability coefficient (K_p) and in vivo retained amount (Q_r) of CP at 6h from the solution of CP (CP-Solution) and nanoparticles of CP (CP-NPs) through ocular membranes (conjunctiva, cornea, sclera).

	CP-Solution			CP-NPs		
	Conjunctiva	Cornea	Sclera	Conjunctiva	Cornea	Sclera
J_s (mcg/h)	9.4 (8.50–10.20)	5.08 (1.13–6.16)	0.9 (0.22–1.58)	4.19 ** (0.50–7.88)	1.24 (0.42–4.73)	1.01 (0.96–1.05)
T_l (h)	1.45 (1.42–1.45)	1.71 (1.51–2.33)	2.04 (1.86–2.22)	0.31 ** (0.19–1.43)	1.72 (1.31–2.44)	2.7 ** (2.66–2.73)
$P_2 \times 10^1$ (h^{-1})	1.15 (0.84–1.47)	0.98 (0.72–1.10)	0.82 (0.75–0.90)	6.32 ** (3.88–8.77)	0.97 (0.68–1.27)	0.62 ** (0.61–0.63)
$P_1 \times 10^2$ (cm)	17.01 (15.80–20.0)	11.91 (2.14–15.38)	2.13 (0.60–3.66)	2.18 ** (0.12–4.24)	3.34 (0.69–9.37)	3.39 (3.27–3.50)
$K_p \times 10^3$ (cm·h)	19.58 (15.40–22.0)	10.58 (2.36–12.83)	1.87 (0.45–3.29)	8.73 * (1.04–16.41)	2.58 (0.88–9.85)	2.09 (2.0–2.19)
Q_r (mcg/cm ² /g)	3.62 (3.61–3.63)	16.56 (16.10–17.06)	12.21 (12.17–12.26)	3.57 (2.89–4.25)	20.89 ** (18.55–23.23)	12.25 (12.16–12.34)

* p -Value < 0.05 and ** p -Value < 0.01.**Table 3.** Median, maximum and minimum values of flux (J_s), lag time (T_l), P1, P2, permeability coefficient (K_p) and in vivo retained amount (Q_r) of CP at 6h from the solution of CP (CP-Solution) and nanoparticles of CP (CP-NPs) through mucous membranes (buccal, sublingual and vaginal).

	CP-Solution			CP-NPs		
	Buccal	Sublingual	Vaginal	Buccal	Sublingual	Vaginal
J_s (mcg/h)	0.74 (0.73–0.75)	4.81 (1.37–8.24)	3.91 (3.83–3.99)	2.76 ** (1.70–3.82)	0.31 ** (0.14–0.48)	8.89 ** (5.09–12.69)
T_l (h)	1.65 (1.5–1.80)	2.77 (2.68–2.87)	3.34 (2.57–4.11)	0.8 ** (0.74–0.86)	2.09 ** (1.53–2.65)	1.75 ** (1.4–2.1)
$P_2 \times 10^1$ (h^{-1})	1.02 (0.92–1.11)	0.6 (0.58–0.62)	0.53 (0.41–0.65)	2.1 ** (1.94–2.25)	0.86 ** (0.63–1.09)	0.99 ** (0.79–1.19)
$P_1 \times 10^2$ (cm)	0.38 (0.35–0.41)	16.24 (4.91–27.56)	16.25 (12.82–29.67)	0.72* (0.40–1.04)	0.93 ** (0.27–1.60)	17.78 (13.35–22.21)
$K_p \times 10^3$ (cm·h)	0.39 (0.38–0.39)	10.01 (2.86–17.17)	8.15 (7.99–8.31)	1.45 ** (0.89–2.01)	0.65 ** (0.30–1.0)	18.52 ** (10.59–26.44)
Q_r (mcg/cm ² /g)	2.38 (2.2–2.56)	33.14 (33.09–33.18)	23.44 (20.7–26.19)	3.46 * (2.49–3.63)	29.13 ** (27.81–30.45)	52.81 ** (49.41–56.21)

* p -Value < 0.05 and ** p -Value < 0.01.

3.2. In Vivo Studies

Histological studies of all the tissues have been carried out in order to verify if the formulations studied do affect the tissue structure and therefore, or its effect is attributable to the drug itself. In all tissues, a blank histological study (without drug), a CP-Solution histological study and a CP-NPs histological study have been performed ($n = 6$ for each biological membrane and formulation and $n = 1$ for each untreated biological membrane).

In the histological photographs of each tissue, the different layers of the untreated membrane are justified (Photos 1, 4, 7, 10, 13 and 15). The mucous membranes are composed of two parts: epithelium (A) and connective tissue (B). Inside the epithelium, the outermost part is the stratified flat keratinized

epithelium (A) and the connective tissue is its own laminate (B). These two parts are separated by the basal layer. This is the basic structure of the mucous membranes and each tissue presents its own particularities detailed in the photographs.

4. Discussion

4.1. HPLC Results

Figures 1–7 show the chromatograms of the CP-NPs in each tissue studied and in Table 1 we can see different retention times of each tissue. Figure 1 represents the value of 100 µg/mL in the standard line and its retention time is 2516 min. In the following figures (Figures 2–7), the chromatograms of the samples collected at 6 h in each tissue (sclera, cornea, conjunctiva, buccal, sublingual and vaginal, respectively) are represented. As can be seen in Table 1, in all tissues the retention time it is very similar (2445–2574 min.) to the retention time of the standard line (2516 min.). Summarizing, we can say that the method used is very selective and specific for the study of CP.

4.2. Ophthalmic Tissues

As we can see in Table 2, in conjunctiva mucous the flow (J_s) is statistically higher in the CP-Solutions (9.4 mcg/h) than in CP-NPs (4.19 mcg/h). This is interesting, since the flow is the rate of entry into the eye, preventing its residence. So, in this type of mucous, the NPs stay longer in the tissue that is the place of action of the drug. In addition, the Tl of the NPs is statistically lower (0.31 h) compared to the results of the CP-Solution (1.45 h). Tl indicates the time required to reach a steady state, therefore, the results suggested that CP-NPs are absorbed very rapidly in this tissue and had a high diffusion [44]. In the case of Kp , it is statistically higher in the CP-Solution (19.58 cm h) than in the CP-NPs (8.73 cm h). The Kp depends a lot on the formula of the drug, and in this case, the NPs have lower permeability, they stay longer in the tissue and can perform their function. Therefore, this may be an indication that NPs can have more effect for a longer time [36]. There are also significant differences between $P1$ and $P2$ between the two types of formulations. $P1$ indicates the distribution between the formulation and the tissue and $P2$ indicates the diffusion of the drug into the tissue. In this case, $P1$ is statistically higher in the CP-Solution formulation (17.01 cm) than in the CP-NPs (2.18 cm). In other words, the distribution between vehicle and membrane is greater in CP-Solutions, and therefore, it penetrates better than CP-NPs. An explanation would be the product formulation itself, since the CP-Solution is dissolved and the CP-NPs are encapsulated [45]. However, $P2$ is statistically higher in the case of CP-NPs (6.32 cm). These results show that although NPs have a shorter lag time penetrating the tissue (probably due to their formulation) [46], once inside, their diffusion and distribution capacity in the tissue is better playing a significant role in its residence inside the conjunctiva. Finally, we can see that there are no significant differences in the Qr of the two types of formulations (3.62 mcg/cm²/g in CP-Solution and 3.57 mcg/cm²/g in CP-NPs). In summary, in the conjunctive mucous, we can say that CP-NPs have advantages, since they have a lower J_s and Kp and a higher $P2$ than the CP-Solution. Therefore, CP-NPs have a lower permeation capacity and a better diffusion inside the tissue.

In cornea, no statistically significant differences are observed for any parameter (Table 2), except for the Qr . So, both formulations act in a very similar way. Although there are no differences between J and Kp , the Qr of the CP-NPs (20.89 mcg/cm²/g) is statistically greater than in the CP-Solution (16.56 mcg/cm²/g). Therefore, we can affirm that CP-NPs are retained in the mucous and therefore have more local activity and are safer (since less drug passes into the bloodstream).

In the sclera, there are no significant differences between the J_s and the Kp between formulations (Table 2). Only statistically differences are in Tl and $P2$. In this case, the CP-Solution has a significantly lower Tl (2.04 h⁻¹) than the CP-NPs (2.7 h⁻¹). In addition, the CP-Solution has a statistically higher $P2$ (0.82 cm) than the CP-NPs (0.62 cm). These two parameters suggest that in this tissue the CP-Solution has advantages over the CP-NPs, since CP-Solution takes less time to penetrate the tissue and also diffuses better inside the mucous membrane.

In brief, in the eye, we can conclude that CP-NPs have advantages in the conjunctiva and cornea. In the conjunctiva, CP-NPs take longer to penetrate, so they stay longer in the place of action. In the case of the cornea, although the two formulations act in a similar way, the CP-NPs have a better local activity and are safer. So, CP-NPs are a good option to treat locally inflammatory diseases in these two tissues.

4.3. Mucous Membranes

As we can see in Table 3, in the buccal mucous, it can be observed that J and Kp are statistically lower in the CP-Solution (0.74 mcg/h in CP-Solution and 0.39 cm in CP-NPs). Therefore, CP-Solution has a lower capacity for permeation and less entry into the bloodstream. However, other factors such as Tl , $P1$, $P2$ and Qr should be commented on and considered. Tl is statistically higher in the CP-Solution (1.65 h) than in the CP-NPs (0.8 h). In addition, $P1$, $P2$ and Qr are statistically significantly higher in CP-NPs. A very important factor to consider is that Qr in CP-NPs is statistically higher (3.46 mcg/cm²/gr) than in CP-Solution (2.38 mcg/cm²/gr). Therefore, we can say that CP-NPs are safer and more efficient to treat buccal mucous membranes.

In the sublingual mucous, it can be observed that the flow (J) is statistically lower in the CP-NPs (0.31 mcg/h) than in the CP-Solution (4.81 mcg/h) (Table 3). Therefore, as explained before, CP-NPs have a lower bloodstream entry rate, and for this reason, are more effective at the local level. In addition, Kp is also statistically lower in CP-NPs (0.65 cm·h) and this factor also makes it a better treatment locally in this tissue. Another factor to take into account is that the Tl of the CP-NPs is statistically lower (0.8 h) than that of the CP-Solution (2.77 h), and therefore, it is absorbed into the tissue more quickly. Significant differences are also observed in $P1$ and $P2$. In this case, the $P1$ is statistically higher in the CP-Solution (16.24 cm); but, the $P2$ is statistically higher in the CP-NPs (2.1 h⁻¹) than in the CP-Solution (0.6 h⁻¹). Therefore, CP-NPs spread faster inside the sublingual mucous. However, a negative factor is that in this tissue the Qr is slightly statistically higher in the CP-Solution (33.14 mcg/cm²/g) than in the CP-NPs (29.13 mcg/cm²/g). This factor is important, since the higher the Qr , the more effective and safer the drug is. However, although the Qr is significantly higher in the CP-Solution, the amount of Qr in the CP-NPs is also quite high. In summary, taking into account all the factors, we can affirm that CP-NPs are a good candidate for the local treatment of inflammatory diseases.

The last tissue to consider is vaginal mucous (Table 3). In this tissue, we can see that the flow (J) and Kp are statistically lower in the CP-Solution (3.91 mcg/h and 8.15 cm h, respectively) than in the CP-NPs (8.89 mcg/h and 18.52 cm h, respectively). Therefore, permeation into the bloodstream is lower in the CP-Solution. However, Tl is statistically lower in the CP-NPs (1.75 h) than in the CP-Solution (3.34 h). Then, CP-NPs reach a steady state faster than CP-Solution. In addition, $P2$ is statistically higher in CP-NPs (0.99 h⁻¹) than in CP-Solution (0.53 h⁻¹). So, the diffusion of CP-NPs within the tissue is better. Finally, we can see that the Qr in the CP-NPs is much higher (52.81 mcg/cm²/g) than in the CP-Solution (23.44 mcg/cm²/g). Therefore, the amount of drugs retained in vaginal tissue is higher in CP-NPs, and ultimately, they are safer and more effective.

In summary, we can affirm that CP-NPs have particular advantages in these three tissues. In the sublingual mucous, CP-NPs take longer to penetrate, so they stay longer in the place of action. In addition, CP-NPs are safer and more effective in the buccal and vaginal mucous. So, CP-NPs are a good option to treat locally inflammatory diseases in these three tissues.

4.4. In Vivo Studies

When reviewing histological photos, it is important to look at and compare several parameters. The most important part to analyze is the areas that have been in contact with the drug. Therefore, we will focus on the outermost area of the mucous (stratified flat keratinized epithelium and own laminate). On the other hand, it is also important to verify that the cellular structures that make up each tissue do not show alterations [47,48]. Then, we analyze the results in each tissue studied.

In buccal mucous (Figure 8) we can see that the outermost part of the tissue (A), and therefore which has been in contact with the drug, is intact in all three tissues and in addition no cell changes are observed. It can be seen that the thickness of the epithelium is different in each photo. This is due to individual variability of the animals and that there are no structural changes caused by the drugs.

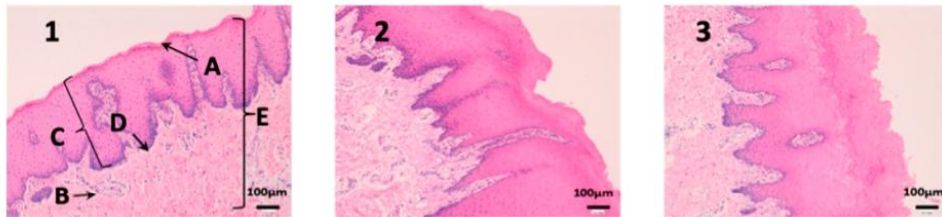


Figure 8. Photo 1: Histological image of untreated buccal mucous observed at 400×; Photo 2: Histological image of buccal mucous treated with CP-Solution observed at 400×; Photo 3: Histological image of buccal mucous treated with CP-NPs observed at 400×. (A) Stratified flat keratinized epithelium; (B) own laminate. (C) dermal papilla; (D) basal layer and (E) buccal mucous.

Sublingual mucous tissue is a much more muscular tissue than the rest (C) and with much more collagen (D) (Figure 9). However, it is important to highlight that the outermost part of the tissue (A) and cells do not show alterations, and therefore, drugs have not altered the tissue structure.

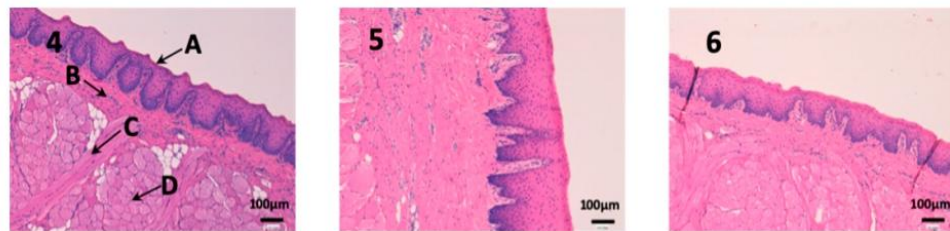


Figure 9. Photo 4: Histological image of untreated sublingual mucous observed at 400×; Photo 5: Histological image of sublingual mucous treated with CP-Solution observed at 400×; Photo 6: Histological image of sublingual mucous treated with CP-NPs observed at 400×. (A) Stratified flat keratinized epithelium; (B) own laminate. (C) muscle and (D) collagen fibers.

We can see vaginal mucous tissue presents undulations (Figure 10). This is because the pig's vaginal mucous has invaginations to facilitate intercourse with males. In addition, we can observe differences in the thickness of the epithelium (A) between each photo. These differences are due to the phase of the estrous cycle of the female pig. Depending on the estrous phase in which a female pig is, the thickness of the epithelium is different. Finally, it should be noted that the epithelium (A) is not altered in any of the three photographs.

We can see the structure of the cornea in Figure 11. It is a very fragile and fine tissue. The epithelium (A) and the own laminate (B) are separated by a thin layer called the Bowman membrane (C). As seen in photographs 11 and 12, its structure is not affected and the epithelium (A) and cells are not altered by any drug.

As we can see in Figure 12, the conjunctiva is a very vascularized tissue with oil glands (C). In addition, we can find hair follicles that belong to the eyelashes (D). As seen in photographs eight and nine, neither the epithelium (A) nor the own laminate (B) is affected by any treatment.

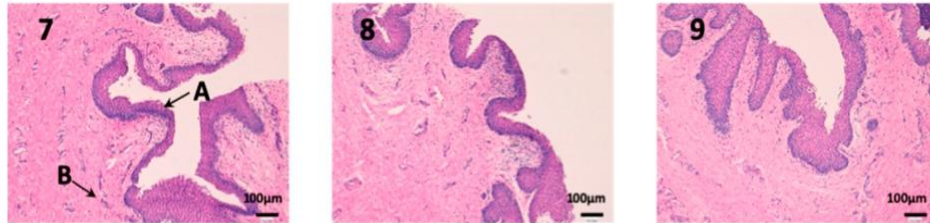


Figure 10. Photo 7: Histological image of untreated vaginal mucous observed at 400×; Photo 8: Histological image of vaginal mucous treated with CP-Solution observed at 400×; Photo 9: Histological image of vaginal mucous treated with CP-NPs observed at 400×. (A) Stratified flat keratinized epithelium; (B) own laminate.

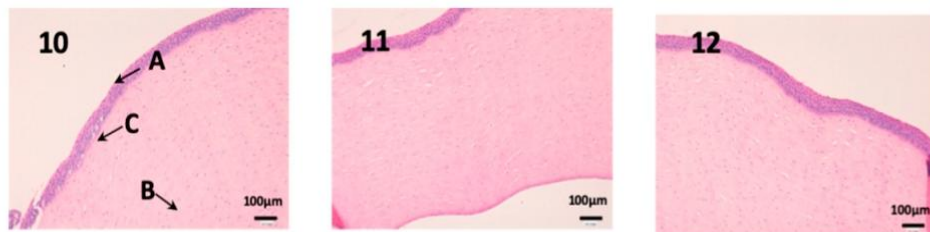


Figure 11. Photo 10: Histological image of untreated cornea observed at 400×; Photo 11: Histological image of cornea treated with CP-Solution observed at 400×; Photo 12: Histological image of cornea treated with CP-NPs observed at 400×. (A) Stratified flat keratinized epithelium; (B) own laminate. (C) Bowman's membrane.

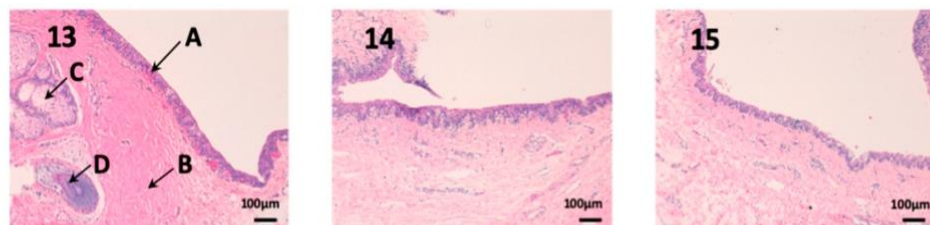


Figure 12. Photo 13: Histological image of untreated conjunctive mucous observed at 400×; Photo 14: Histological image of conjunctive mucous treated with CP-Solution observed at 400×; Photo 15: Histological image of conjunctive mucous treated with CP-NPs observed at 400×. (A) Stratified flat keratinized epithelium; (B) own laminate. (C) oil gland and (D) hair Follicle.

In this last figure, we can see the structure of the sclera (Figure 13). This tissue is similar to the cornea, it is very thin, fragile and delicate. The episclera (A) is the outermost layer and its function is to facilitate the sliding of the eyeball with the rest of the eye structures. The stroma (B) is formed by collagen fibers, and finally, the innermost layer is the fusca lamina (C), and it contains abundant blood vessels. As we can see in photographs 14 and 15, no structural part of the sclera is affected by any pharmacological treatment.

Definitely, no histopathological or significant structural changes were observed between control and treated samples. The epithelial cells and the connective tissue beneath showed normal morphology and distribution in the histological mucosal samples analyzed. These results strongly suggest that CP-Solution and CP-NPs do not affect the cellular and tissular morphology and organization in locally *in vivo* treatment.

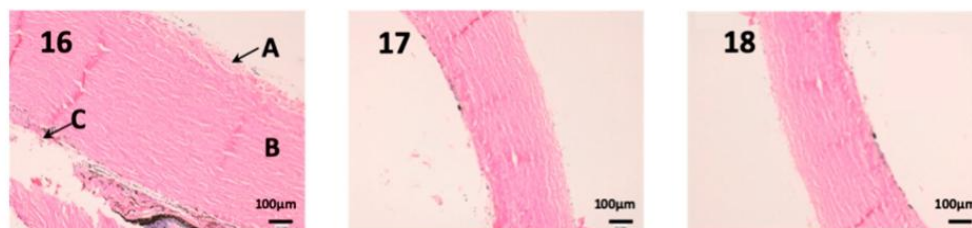


Figure 13. Photo 16: Histological image of untreated sclera observed at 400×; Photo 17: Histological image of sclera treated with CP-Solution observed at 400×; Photo 18: Histological image of sclera treated with CP-NPs observed at 400×. A: Stratified flat keratinized episclera; (B) stroma (collagen fibers). (C) fusca laminate (blood vessels).

5. Conclusions

In conclusion, the results show that CP-NPs have advantages in most tissues. They are more effective and safer than the CP-Solution and do not alter the tissue structure. This presents great possibilities for the local treatment of many inflammatory diseases in pigs or humans. In this approach, the side effects of NSAIDs will be minimized. However, additional studies are required to formulate a pharmaceutical presentation that will be easier to apply in pigs to facilitate its administration and animal management.

Author Contributions: Conceptualization, A.C.C.-C. and Á.G.; methodology, L.G.-S., A.P. and I.G.d.A.; software, L.G.-S.; validation, L.G.-S., A.P. and A.C.C.-C.; formal analysis, L.G.-S.; investigation, L.G.-S. and A.P.; resources, Á.G. and A.C.C.-C.; data curation, L.G.-S.; writing—original draft preparation, L.G.-S.; writing—review and editing, A.B.-M., A.C.C.-C. and L.G.-S.; visualization, A.B.-M., A.C.C.-C. and L.G.-S.; supervision, A.B.-M., A.C.C.-C. and Á.G. All authors contributed to the article. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: We thank all technicians and workers of the Animal House of Campus Bellvitge CCiT-UB, Joan Blasi and Alba Gómez Segura for technical assistance. The authors would like to thank the University of Barcelona for the financial support to cover the cost of open access publication.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Yü, T.-E.; Perel, J. Pharmacokinetic and Clinical Studies of Carprofen in Gout. *J. Clin. Pharmacol.* **1980**, *20*, 347–351. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Griswold, D.E.; Adams, J.L. Constitutive cyclooxygenase (COX-1) and inducible cyclooxygenase (COX-2): Rationale for selective inhibition and progress to date. *Med. Res. Rev.* **1996**, *16*, 181–206. [[CrossRef](#)]
3. Kerr, A.C.; Muller, F.; Ferguson, J.; Dawe, R.S. Occupational carprofen photoallergic contact dermatitis. *Br. J. Dermatol.* **2008**, *159*, 1303–1308. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. *Committee for Veterinary Medicinal Products Carprofen Summary Report*; EMEA/MRL/042/95-FINAL; The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products: London, UK, 1999.
5. Armstrong, S.; Tricklebank, P.; Lake, A.; Frean, S.; Lees, P. Pharmacokinetics of carprofen enantiomers in equine plasma and synovial fluid—A comparison with ketoprofen. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **1999**, *22*, 196–201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Lees, P.; Landoni, M.F.; Ciraudel, J.; Toutain, P.L. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in species of veterinary interest. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **2004**, *27*, 479–490. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Lascelles, B.D.X.; Cripps, P.J.; Jones, A.; Waterman-Pearson, A.E. Efficacy and kinetics of carprofen, administered preoperatively or postoperatively, for the prevention of pain in dogs undergoing ovariohysterectomy. *Vet. Surg.* **1998**, *27*, 568–582. [[CrossRef](#)]

8. Grisneaux, E.; Pibarot, P.; Dupuis, J.; Biais, D. Comparison of ketoprofen and carprofen administered prior to orthopedic surgery for control of postoperative pain in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **1999**, *215*, 1105–1110.
9. Slingsby, L.S.; Waterman-Pearson, A.E. Analgesic effects in dogs of carprofen and pethidine together compared with the effects of either drug alone. *Vet. Rec.* **2001**, *148*, 441–444. [CrossRef]
10. Slingsby, L.S.; Waterman-Pearson, A.E. Comparison between meloxicam and carprofen for postoperative analgesia after feline ovariohysterectomy. *J. Small Anim. Pract.* **2002**, *43*, 286–289. [CrossRef]
11. McGeown, D.; Danbury, T.C.; Waterman-Pearson, A.E.; Kestin, S.C. Effect of carprofen on lameness in broiler chickens. *Vet. Rec.* **1999**, *144*, 668–671. [CrossRef]
12. Roughan, J.V.; Flecknell, P.A. Behaviour-based assessment of the duration of laparotomy-induced abdominal pain and the analgesic effects of carprofen and buprenorphine in rats. *Behav. Pharmacol.* **2004**, *15*, 461–472. [CrossRef] [PubMed]
13. Chandrasekharan, N.V.; Simmons, D.L. The cyclooxygenases. *Genome Biol.* **2004**, *5*, 241. [CrossRef] [PubMed]
14. Food and Drug Administration. FDA Approved Animal Drug Products Database. Available online: <https://animaldrugstatsfda.fda.gov/adafda/views/#/home/searchResult> (accessed on 13 June 2019).
15. Sanderson, R.O.; Beata, C.; Flipo, R.M.; Genevois, J.P.; Macias, C.; Tacke, S.; Innes, J.F. Systematic review of the management of canine osteoarthritis. *Vet. Rec.* **2009**, *164*, 418–424. [CrossRef] [PubMed]
16. Slingsby, L.S.; Jones, A.; Waterman-Pearson, A.E. Use of a new finger-mounted device to compare mechanical nociceptive thresholds in cats given pethidine or no medication after castration. *Res. Vet. Sci.* **2001**, *70*, 243–246. [CrossRef]
17. Bergmann, H.M.; Nolte, I.; Kramer, S. Comparison of analgesic efficacy of preoperative or postoperative carprofen with or without preincisional mepivacaine epidural anesthesia in canine pelvic or femoral fracture repair. *Vet. Surg.* **2007**, *36*, 623–632. [CrossRef]
18. Sidler, M.; Fouché, N.; Meth, I.; von Hahn, F.; von Rechenberg, B.; Kronen, P. Transcutaneous Treatment with Vetrod[®] Sustains the Adjacent Cartilage in a Microfracturing Joint Defect Model in Sheep. *Open Orthop. J.* **2013**, *7*, 57–66. [CrossRef]
19. Elitok, B.; Elitok, Ö.M. Clinical efficacy of carprofen as an adjunct to the antibacterial treatment of bovine respiratory disease. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **2004**, *27*, 317–320. [CrossRef]
20. Lockwood, P.W.; Johnson, J.C.; Katz, T.L. Clinical efficacy of flunixin, carprofen and ketoprofen as adjuncts to the antibacterial treatment of bovine respiratory disease. *Vet. Rec.* **2003**, *152*, 392–394. [CrossRef]
21. Mathews, K.A. Non-steroidal anti-inflammatory analgesics for acute pain management in dogs and cats. *Vet. Comp. Orthop. Traumatol.* **1997**, *10*, 122–129. [CrossRef]
22. Mcpherson, M.L.; Cimino, N.M. Topical NSAID formulations. *Pain Med. (U.S.)* **2013**, *14*, S35–S39. [CrossRef]
23. Amores, S.; Domenech, J.; Colom, H.; Calpena, A.C.; Clares, B.; Gimeno, Á.; Lauroba, J. An improved cryopreservation method for porcine buccal mucous in Ex Vivo drug permeation studies using Franz diffusion cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2014**, *60*, 49–54. [CrossRef] [PubMed]
24. Alqurshi, A.; Hanafy, A.F.; Abdalla, A.M.; Guda, T.K.; Gabr, K.E.; Royall, P.G. Ocular anti-inflammatory activity of prednisolone acetate loaded chitosan-deoxycholate self-assembled nanoparticles. *Int. J. Nanomed.* **2019**, *14*, 3679–3689.
25. Perpiñán, D.; Bargalló, F.; Grifols, J. Correction of periocular fat pad hypertrophy and entropion in a pot-bellied pig (*Sus scrofa*). *Clínica Vet. Pequeños Anim.* **2015**, *35*, 27–30.
26. Moreau, M.E.; Dubreuil, P.; Molinaro, G.; Chagnon, M.; Müller-Esterl, W.; Lepage, Y.; Adam, A. Expression of metalloproteinases and kinin receptors in swine oropharyngeal tissues: Effects of angiotensin I-converting enzyme inhibition and inflammation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *315*, 1065–1074. [CrossRef]
27. Takalkar, D.; Desai, N. Nanolipid Gel of an Antimycotic Drug for Treating Vulvovaginal Candidiasis—Development and Evaluation. *AAPS PharmSciTech* **2018**, *19*, 1297–1307. [CrossRef]
28. Newell-Fugate, A.E.; Lenz, K.; Skenandore, C.; Nowak, R.A.; White, B.A.; Braundmeier-Fleming, A. Effects of coconut oil on glycemia, inflammation, and urogenital microbial parameters in female Ossabaw mini-pigs. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0179542. [CrossRef]
29. Patel, A.; Bell, M.; O'Connor, C.; Inchley, A.; Wibawa, J.; Lane, M.E. Delivery of ibuprofen to the skin. *Int. J. Pharm.* **2013**, *457*, 9–13. [CrossRef]
30. Zhang, J.Y.; Fang, L.; Tan, Z.; Wu, J.; He, Z.G. Influence of ion-pairing and chemical enhancers on the transdermal delivery of meloxicam Enhanced penetration of meloxicam. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2009**, *35*, 663–670. [CrossRef]

31. Singh, P.; Roberts, M.S. Skin permeability and local tissue concentrations of nonsteroidal anti-inflammatory drugs after topical application. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1994**, *268*, 144–151.
32. Parra, A.; Clares, B.; Rosselló, A.; Garduño-Ramírez, M.L.; Abrego, G.; García, M.L.; Calpena, A.C. Ex Vivo permeation of carprofen from nanoparticles: A comprehensive study through human, porcine and bovine skin as anti-inflammatory agent. *Int. J. Pharm.* **2016**, *501*, 10–17. [[CrossRef](#)]
33. Flaten, G.E.; Palac, Z.; Engesland, A.; Filipović-Grčić, J.; Vanić, Ž.; Škalko-Basnet, N. In vitro skin models as a tool in optimization of drug formulation. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2015**, *75*, 10–24. [[CrossRef](#)]
34. Bolzinger, M.A.; Briançon, S.; Pelletier, J.; Chevalier, Y. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2012**, *17*, 156–165. [[CrossRef](#)]
35. Magnusson, B.M.; Walters, K.A.; Roberts, M.S. Veterinary drug delivery: Potential for skin penetration enhancement. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *50*, 205–227. [[CrossRef](#)]
36. Parra, A.; Mallandrich, M.; Clares, B.; Egea, M.A.; Espina, M.; García, M.L.; Calpena, A.C. Design and elaboration of freeze-dried PLGA nanoparticles for the transcorneal permeation of carprofen: Ocular anti-inflammatory applications. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2015**, *136*, 935–943. [[CrossRef](#)]
37. Zahr, A.S.; De Villiers, M.; Pishko, M.V. Encapsulation of drug nanoparticles in self-assembled macromolecular nanoshells. *Langmuir* **2005**, *21*, 403–410. [[CrossRef](#)]
38. Brugués, A.P.; Naveros, B.C.; Calpena Campmany, A.C.; Pastor, P.H.; Saladrigas, R.F.; Lizandra, C.R. Developing cutaneous applications of paromomycin entrapped in stimuli-sensitive block copolymer nanogel dispersions. *Nanomedicine* **2015**, *10*, 227–240. [[CrossRef](#)]
39. Netzlaff, F.; Schaefer, U.F.; Lehr, C.M.; Meiers, P.; Stahl, J.; Kietzmann, M.; Niedorf, F. Comparison of bovine udder skin with human and porcine skin in percutaneous permeation experiments. *Atla Altern. Lab. Anim.* **2006**, *34*, 499–513.
40. Seto, J.E.; Polat, B.E.; Lopez, R.F.V.; Blankschtein, D.; Langer, R. Effects of ultrasound and sodium lauryl sulfate on the transdermal delivery of hydrophilic permeants: Comparative in vitro studies with full-thickness and split-thickness pig and human skin. *J. Control. Release* **2010**, *145*, 26–32. [[CrossRef](#)]
41. Cañadas-Enrich, C.; Abrego, G.; Alvarado, H.L.; Calpena-Campmany, A.C.; Boix-Montañes, A. Pranoprofen quantification in Ex Vivo corneal and scleral permeation samples: Analytical validation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2018**, *160*, 109–118. [[CrossRef](#)]
42. Sanz, R.; Calpena, A.C.; Mallandrich, M.; Gimeno, Á.; Halbaut, L.; Clares, B. Development of a buccal doxepin platform for pain in oral mucositis derived from head and neck cancer treatment. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2017**, *117*, 203–211. [[CrossRef](#)]
43. Williams, A.C.; Cornwell, P.A.; Barry, B.W. On the non-Gaussian distribution of human skin permeabilities. *Int. J. Pharm.* **1992**, *86*, 69–77. [[CrossRef](#)]
44. Raber, A.S.; Mittal, A.; Schäfer, J.; Bakowsky, U.; Reichrath, J.; Vogt, T.; Schaefer, U.F.; Hansen, S.; Lehr, C.M. Quantification of nanoparticle uptake into hair follicles in pig ear and human forearm. *J. Control. Release* **2014**, *179*, 25–32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Carneiro, P.; Morais, S.; Carmo-Pereira, M. Nanomaterials towards Biosensing of Alzheimer's Disease Biomarkers. *Nanomaterials* **2019**, *9*, 1663. [[CrossRef](#)]
46. Bamrungsap, S.; Zhao, Z.; Chen, T.; Wang, L.; Li, C.; Fu, T.; Tan, W. Nanotechnology in therapeutics: A focus on nanoparticles as a drug delivery system. *Nanomedicine* **2012**, *7*, 1953–1971. [[CrossRef](#)]
47. Bacha, W.J., Jr.; Bacha, L.M. *Color Atlas of Veterinary Histology*, 3rd ed.; Wiley&BlackWell: New York, NY, USA, 2012; pp. 122–188.
48. Zimmerman, J.J.; Karriker, L.A.; Ramirez, A.; Schwartz, K.J.; Stevenson, G.W.; Zhang, J. *Diseases of Swine*, 11th ed.; Wiley&BlackWell: New York, NY, USA, 2019; pp. 292–392.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Article 3

**Application of liquid chromatography/mass spectrometry for bioanalysis of
Carprofen in swine: pharmacokinetics and bioavailability**

(Aplicació de cromatografia de líquids/espectrometria de masses per a la bioanàlisi
de Carprofen en porcs: farmacocinètica i biodisponibilitat)

Lidia Gómez-Segura, Alexander Parra, Álvaro Gimeno, Ana C. Calpena, David Bellido,
José L. Soriano-Ruiz, Antonio Boix-Montañes

Pendent per enviar

Resum

Aquest treball proporciona un estudi per primera vegada de la farmacocinètica del Carprofèn en porcs Yorkshire-Landrace. El projecte es va dur a terme per via IM i IV, després de l'administració de CP (Rimadyl® 50mg/ml) amb una dosi de 4mg/kg. El nou mètode d'anàlisi mitjançant cromatografia de líquids per espectrometria de masses (LC/MS/MS) ens ha permès calcular les concentracions plasmàtiques, avaluar els paràmetres farmacocinètics i la biodisponibilitat. A més, hem validat aquest nou mètode analític. Tots els paràmetres s'han calculat utilitzant mètodes compartimentals i no compartimentals. A més, s'ha dut a terme un estudi farmacocinètic comparatiu amb altres espècies. Resultats: la desviació estàndard relativa va ser superior al 3%, la repetibilitat va ser bona. La precisió va ser del 80 al 120%. Límit de detecció (LOD) 0,019ppb i límit de quantificació (LOQ) 0,060ppb. El model seleccionat per al tractament compartimental ens permet predir quin seria el perfil dels nivells plasmàtics de CP obtinguts per la via IM. Per tant, s'ha proposat aplicar un règim de dosificació còmode i senzill en porcs. Conclusions: S'ha pogut descriure i validar un nou mètode per caracteritzar els nivells plasmàtics de Carprofèn en porcs i proposar un règim de dosificació.

Graphical Abstract

En la figura 20 es mostra el graphical Abstract d'aquest article.

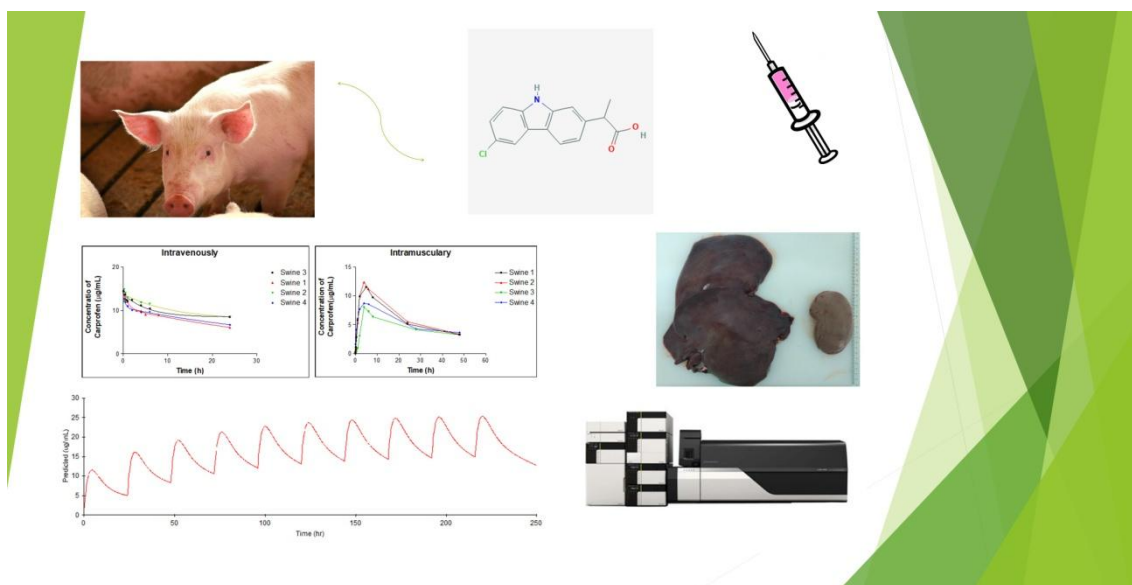


Figura 20: Graphical abstract de l'article 3.

Application of liquid chromatography/mass spectrometry for bioanalysis of Carprofen in swine: pharmacokinetics and bioavailability

Lidia Gómez-Segura¹, Alexander Parra², Álvaro Gimeno³, Ana C. Calpena^{4,5}, David Bellido⁶, José L. Soriano-Ruiz^{7*}, Antonio Boix-Montañes^{4,5}

¹ Department of Medicine and Animal Health. Faculty of Veterinary. Autonomous University of Barcelona, 08193 (Bellaterra), Barcelona, Spain.

² Department of Veterinary medicine and Zootechnic. Faculty of Agriculture Sciences. University of Applied and Environmental Sciences, RX2257 Bogota, Colombia.

³ Department of Animal Research, Animal House of Bellvitge, University of Barcelona, CCiT-UB, 08907 (Hospitalet de Llobregat), Barcelona, Spain.

⁴ Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology and Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, Barcelona, 08028, Spain.

⁵ Institute of Nanoscience and Nanotechnology (IN2UB), University of Barcelona. Barcelona, 08028, Spain.

⁶ Department of Separative Techniques. Scientific and Technological Centers, University of Barcelona. Barcelona, 08028, Spain.

⁷ Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Granada, 18071 Granada, Spain

*Correspondence: jlsoriano@correo.ugr.es

Abstract: (1) Background: This work provides a study for the first time of the pharmacokinetics of Carprofen (CP) in Yorkshire-Landrace swines. The project was carried out in intramuscular (IM) and intravenous (IV) routes, after the administration of CP (Rimadyl® 50mg/ml) with a dose of 4mg/kg. (2) Methods: The new method of analysis using liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS/MS) has allowed us to calculate the plasma concentrations, evaluate pharmacokinetic parameters and the bioavailability. Furthermore, we have validate this new analytical method. All parameters have been calculated using both compartmental and non-compartmental methods. In addition, a comparative pharmacokinetic study has been carried out with other species. (3) Results: The relative standard deviation was better than 3 %, the repeatability was good. Accuracy was 80-120%. Limit of detection (LOD) 0.019ppb and limit of quantitation (LOQ) 0.060ppb. The model selected for compartmental treatment allows us to predict what would be the profile of CP plasma levels obtained by the IM route. Therefore, a comfortable and simple dosage regimen has been proposed to be applied in swines. (4) Conclusions: It has been possible to describe and validate a new method to characterize plasma levels of Carprofen in swines and propose a dosing regimen.

Keywords: Pharmacokinetics, bioanalysis, mass spectrometry validation, Carprofen, swines.

1. Introduction

Carprofen (CP), 6-chloro- α -methyl-9H-carbazole-2-acetic acid, is a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) and has been utilized as anti-inflammatory or analgesic and having anti-pyretic effects [1,2]. CP was licensed for veterinary use in the 1990s[3].

Currently, CP is one of the most widely used NSAID in veterinary medicine based on the inhibition of cyclooxygenase (COX) [4]. The effectiveness of CP has been described in numerous pathologies and species: osteoarthritis in dogs [5]; bovine respiratory diseases in combination with antibiotics [6, 7]; inflammatory symptoms in dogs or cats, as a treatment for bovine mastitis [8-10] and also analgesic in dogs [11].

Even, recent studies show CP as a possible drug for the treatment of COVID-19 [12] which provide specific usefulness for this drug. However, up to our knowledge, there are very few studies about CP mode of administration in swines [13].

Swine is one of the species most frequently used in animal research. Studying the effects of CP in this species could help to treat various swine diseases that occur causing inflammation and pain. Furthermore, studying the pharmacokinetics and pharmacodynamics of CP in swine is useful to create an animal model for further allometric models to the human species.

Numerous CP pharmacokinetic studies have been conducted in various species: horses [14-15], donkeys [16], calves [17-18], sheep [19], rabbits [20-21], vultures [22], humans [23], dogs [24-25] and cats [26-27]. The commercial CP drug (Rimadyl®) consists of a racemic mixture (50:50) of the enantiomers (R(-) and S(+)). It has been shown in various species that the effectiveness of CP is due to the S(+) enantiomer [14,16,20]. In contrast, the R(-) enantiomer has higher protein binding and is therefore the predominant enantiomer in plasma. No chiral inversion of the two CP enantiomers has been observed in any species to date [14, 20]. Furthermore, it was shown that there is a remarkable variability in the dosage of CP in different species. For this reason, it is required to carry out pharmacokinetic and pharmacodynamic studies in each species [15].

Concerning drug analysis, the majority of published pharmacokinetic studies have determined CP by UV high-performance liquid chromatography (HPLC-UV) in accordance with previously developed methods [28-29]. This technique lacks of enough detection limits for low concentration samples and it is preferable to analyze CP with an alternative liquid chromatography mass spectrometry technique (LC-MS/MS) which has several analytical advantages [30]. Since LC-MS/MS provides significant accuracy and precision advantages, it reduces plasma contamination and solvent consumption [31-32] in comparison with HPLC-UV.

The objective of this study is to investigate the pharmacokinetic data of the racemic mix of CP in swine after intravenous (IV) and intramuscular

administration (IM) and its bioavailability. In addition, we have developed and validated a new bioanalytical procedure by LC-MS/MS to quantify CP in swine's plasma samples. Finally, we have determined CP recovery in swine's liver and kidney.

2. Materials and Methods

2.1 Animals and experimental design

The study was conducted under a protocol approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the University of Barcelona (Spain), holding ethical approval code 10617.

Four Yorkshire-Landrace swine (two males and two females) of 25-50kg were anaesthetized with a standard sedation protocol based on IM midazolam (MidazolamGen®) from Bayer AG at 0.17 mg/kg; IM xylazine (Rompun®) from Bayer AG at 2.5 mg/kg and IM ketamine (Imalgene®) from Boehinger Ingelheim at 3 mg/kg. Then, anesthesia was induced with IV propofol (Propofol Lipuro 1%®) at 2.5mg/kg from Braun. Maintenance was achieved with inhaled isoflurane (Forane® 2%) of Centauro Veterinary administered by tracheal intubation with a low pressure balloon.

The femoral artery was then catheterized using a 22G catheter from Centauro Veterinary. CP (Rimadyl® 50mg/ml of Zoetis) was administered at a dose of 4mg/kg intravenously (IV) and blood samples were collected at various times: 0.5 min, 15 min, 30 min, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 24h. The blood obtained at each time point is stored in a EDTA tube, centrifuged at 3200rpm for 15 min at 4°C. The supernatant (plasma) is then removed and frozen at -80°C for further analysis. Subsequently, a latency time of 7 days was given for each swine to make sure there are no traces of drug administered IV and there is no carry-over effect. This was followed by the same procedure being performed administering 4mg/kg of CP (Rimadyl®) intramuscularly (IM). Blood samples were taken at the same times as described in route IV and in addition one more blood sample was extracted at 48h. The plasma was then obtained by the same procedure as previously described and stored at -80°C for subsequent analysis.

At the end of the study, the animals were euthanized by sodium thiopental 1g overdose (from Braun) and liver and kidney samples were removed and frozen at -80°C for further recovery analysis.



Figure 1: Liver and kidney samples collected for later recovery analysis.

2.2 Liquid chromatography mass spectrometry analysis

2.2.1 Standard Curve

A standard curve was prepared from 1 to 1000 ng/ml of CP obtained from Capot Chemical (Hangzhou, P.R. China) and Carprofen-d3 from Sigma-Aldrich was added as per Internal Standard (IS). The procedure consisted of weighing 10mg of CP, adding 5ml of DMSO and 5ml of methanol (mother solution). From this stock solution (1000mg / ml), different dilutions were made with methanol to the concentrations described above (from 1 to 1000ng/ml). Subsequently, IS (Carprofen-d3) at 500ng/ml was added at each point on the standard line.

2.2.2 LC-MS/MS method

The equipment used was UPLC Acquity, auto sampler s/n K07UPA434M and binary pump s/n J07UPB374M (Waters Chromatography) coupled to an API 3000 triple quadrupole mass spectrometer s/n DG340007 (AB Sciex). An Acquity UPLC BEH C18 1.7 μ m 2.1 x 50 mm column was used as a stationary phase. The column temperature was set at 40 °C. The mobile phase consisted of (A) Ammonium Formate 10 mM at pH 5.00 in MilliQ Water and (B) Methanol: Acetonitrile: Formic Acid (80:20:0.1). The gradient elution profile was chosen as follows: from 0 to 0.1 min 98% A, from min 0.1 to min 1 % A decreased from 98 to 2%, kept at 2% until minute 2 and returning to initial conditions at minute 2.1 until minute 4. Flow was set at 0.35mL/min.

Carprofen was detected in the negative electrospray ionization (ESI) mode. The ion spray voltage was set at -4500 Volts and source temperature at 450 °C. Data were acquired in MRM (multiple reaction monitoring) mode. Transitions selected for Carprofen were 271.8/228.0 for quantization and 271.8/225.9 for confirmation. Internal Standard (Carprofen-d3) transition was 275.0/231.2.

2.2.3 Validation assays

Standard curves were made by quadrupled. From 1 ppb (ng/mL) to 1000 ppb in DMSO/methanol, comprising seven points. Internal Standard was 500 ppb of Carprofen-d3. Validation was performed for two transitions: T1 is for transition 271.8 / 228.0 and T2 is for transition 271.8 / 22, to confirm the quantification of the method.

Linearity and range: Four independent sets of CP standard solutions prepared to build calibration curves were injected one each of four consecutive days. Range tested was from 1 ppb to 1000 ppb, IS at 500 ppb in standard solutions and in all samples. The linearity was evaluated by linear regression and the criterion of acceptance was $R^2 > 0.99$.

Repeatability: Precision of the method was examined as repeatability. The 10 ppb, 250 ppb and 750 ppb Carprofen solutions (IS 500 ppb) were injected six times to study the repeatability of the method. Mean, Standard Deviation and Relative Standard Deviation (RSD) were calculated (concentrations in ng/mL).

Accuracy: Was measured from the linearity data. The recorded data points were interpolated in the straight line calibration curve in order to study the deviation of the recovery values as a measure of the accuracy.

Sensitivity (LOD and LOQ): Limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) of the method were evaluated from signal-to-noise ratio. The detection limit was defined as the lowest concentration level resulting in a peak height of three times the baseline noise. The quantitation limit was defined as the lowest concentration level that provided a peak height with a signal-to-noise ratio of 10. LOD and LOQ were calculated from the 2 ppb dabigatran chromatogram. Determined as a signal-to-noise ratio 3 for LOD and 10 for LOQ.

2.2.4 Sample preparation

200 μ L of plasma were transferred in a 1.5 ml Eppendorf tube, added 25 μ L of Carprofen-d3 (IS) at 10 μ g/mL, 475 μ L of methanol were added, mixed and centrifuged at 10000 RPM 5 min at 4°C. Supernatant was collected and kept at -80°C until analysis.

2.2.5 Recovery of the liver and kidney

Liver and kidney samples were superficially cleaned with gauze soaked in a 0.05% solution of dodecyl sulphate from Sigma-Aldrich followed by MiliQ water. Then, samples were carefully cut into small pieces and accurately weighed. Samples were crushed with an IKA® ultra Turrax® disperser tube (DT-20 dispersing tube with rotor-stator element, 25/cs) from Sigma-Aldrich and then the CP content was extracted with phosphate buffer solution 7.4 (PBS) under sonication (20 min) in an ultrasonic bath in a container protected from light. Supernatant was collected and centrifuged at 10000 RPM 5 minutes at 4°C. The resulting extracted solutions were measured by the LC-MS/MS method previously described.

2.2.6 Statistical analysis

Nonparametric t-test (Graph Pad Prism® 5.01, Graph Pad Software Inc., and San Diego, CA, USA) assessed the significance ($p < 0.05$) of the differences of CP recovery tissues.

2.2.7 Fitting Pharmacokinetic Models

CP pharmacokinetic parameters have been calculated by the WinNonlin computer program (Pharsight 5.2, Mountain View, CA, USA). Individual pharmacokinetic parameters were calculated with both the compartmental and non-compartmental model [33]. After visual inspection of plasma profiles, two-compartment open model was fit to the plasma concentrations.

Finally, taking into account, swines physiological values of total aqueous volume (TBW: 60% of body mass) [34] and renal blood flow (RBF: $62.0 + 3.1$ ml / min) [35], clearance (Cl_p), volume of distribution (V_{dss}) and half-life (HL) of the CP in swine were calculated for the four ranges established by Davies i cols. [36] (see Table 1) to classify the pharmacokinetic parameters of CP obtained by the compartment method.

Table 1: Primary parameters (Cl_p and V_{dss}) and half live (HL) elimination ranges classified into four magnitude ranges established by Davies i cols. [36].

Parameter	Low	Medium	High	Very High
Plasma Clearance (Cl _p in mL/min)	<1/10 RBF < 26,2	1/10 - 3/4 RBF 26,2 - 196,5	>3/4 RBF > 196,5	> RBF >262
Volume of Distribution (V _{dss} in L/kg)	< TBW < 0,6	TBW - 5 0,6 - 5	5 - 100 5 - 100	> 100 > 100
Half Lives (HL in h)	< 3	3 - 8	8 - 14	> 14

2.2.8 Non-compartmental analysis and Bioavailability

A non-compartmental analysis of the observed data was also performed for each IV and IM data set. The pharmacokinetic parameters estimated include the terminal rate constant (k_z); terminal half-life (HL), the area under the concentration curve from time = 0 to infinity (AUC_{∞}) calculated by the trapezoidal method. Furthermore, the predicted parameters of the mean residence time (MRT_{∞}); the volume of distribution at a steady-state (V_{dss}) and the observed clearance (Cl) were represented, since they hardly differed from the observed values.

The absolute bioavailability (F%) of CP in Rimadyl® drug in swine was measured by comparing the respective AUCs and C_{max} of IM and IV administration after a non-compartmental treatment of the plasma concentration data with respect to time and normalized by the dose [37].

2.2.9 Simulations as applicability of the model

The studied model found by a compartmental treatment allows us to predict what would be the profile of plasma levels obtained after 3 different dosing regimens by the IM route by the WinNonlin computer program (Pharsight 5.2, Mountain View, CA, USA). The aim is to find a regimen and dosage of CP which is practical, easy to administer and safe for the treatment of housed swine. For this reason, 3 models were chosen: administration 3 times a day, 2 times a day or a single dose. For this simulation, we wanted to ensure that the stationary equilibrium of the drug in blood had been reached (with stable C_{min} and C_{max} values): 15 doses of 4mg/kg at 8h, 14 doses of 4mg/kg at 12h and 10 doses of 4mg/kg at 24h.

3. Results

3.1 Liquid chromatography mass spectrometry

Figure 2 shows the ionograms and CP retention times of the standard curve; IV and IM plasma samples collected at different times from the same swine (swine number 1). Several ionograms of each swines can be consulted in the Supplementary Material (Figures S5-S7).

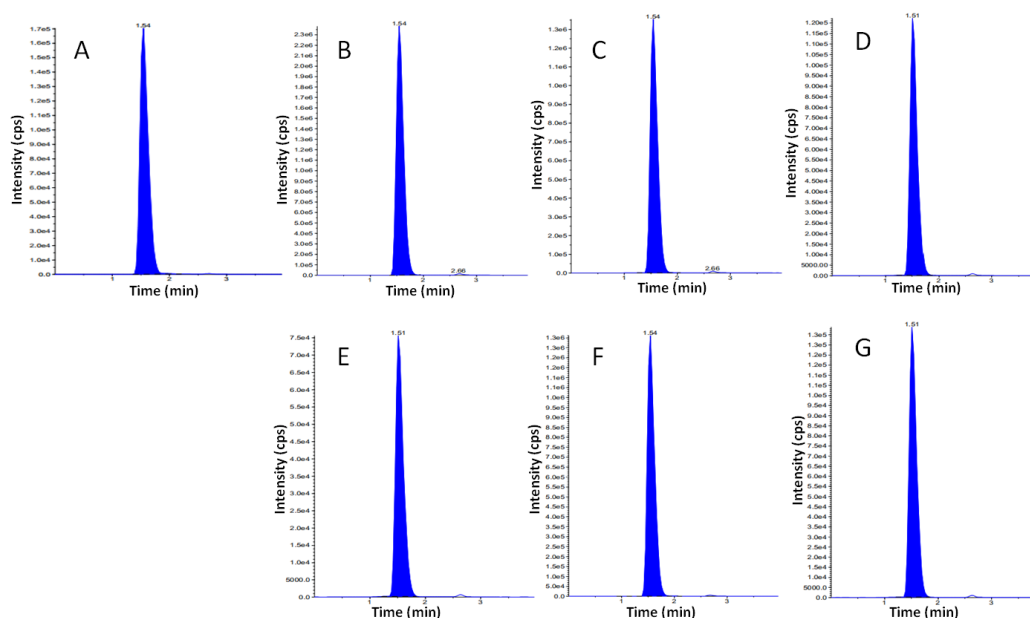


Figure 2: Ionograms of CP at different plasma samples times of swine number 1. A: standard curve at 750 ng/ml; B: IV levels at 5 min; C: IV levels at 6h; D: IV levels at 24h; E: IM levels at 5 min; F: IM levels at 6h and G: IM levels at 24h.

3.2 Validation assays

It is verified by the two transitions that the values of $R^2 > 0.99$. As the relative standard deviation of the six measurements was better than 3 %, the repeatability of the method was good. Values of accuracy were from 80 to 120%. Finally, LOD T1 was 0.019ppb and LOQ T1 0.064ppb and LOD T2 was 0.060ppb and LOQ T2 0.199ppb. All tables and figures of validation method can be consulted in supplementary material section (Figures S1-S4 and Tables S1-S4).

3.3 Recovery from liver and kidney

Figure 3 shows the results obtained from the recovery of the CP ($\mu\text{g/g}$) in liver and kidney at 48h after being administered.

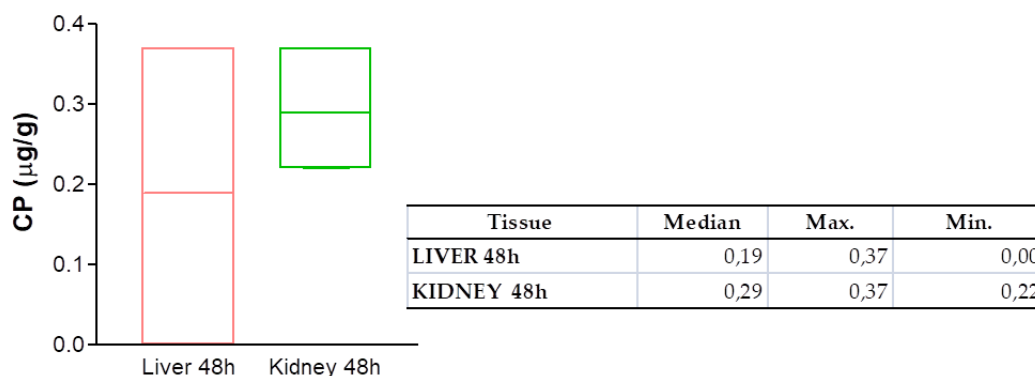


Figure 3: CP retained in liver and kidney ($\mu\text{g/g}$) at 48h expressed by median and range.

3.4 Pharmacokinetic parameters

Using the CP concentrations of the plasma after IV and IM administration during 24-48 hours (Figure 4), the main pharmacokinetic parameters of 4 pigs have been evaluated by a non-compartmental treatment in accordance with the equations presented by Leon Shargel i cols. [37] (see table 2 and 3).

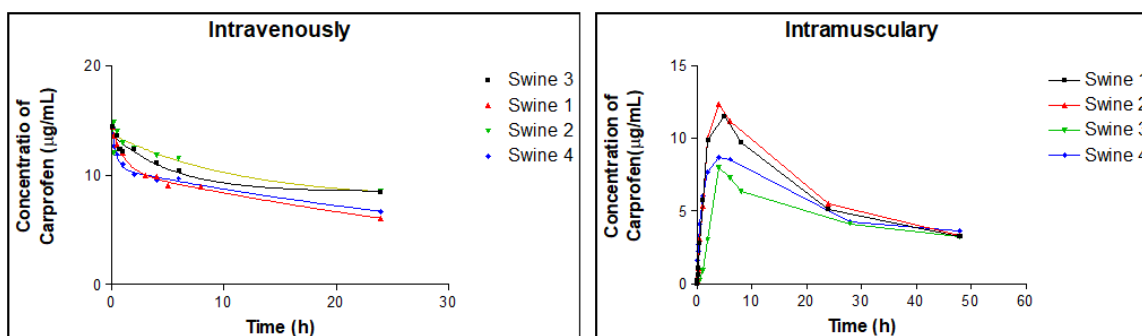


Figure 4: CP plasma concentration of 4 swine injected with IV 4mg/kg (left) and IM 4mg/kg (right).

Table 2: Pharmacokinetic data of CP in plasma of 4 swine injected with 4mg/kg IV treated by a non-compartmental method expressed in mean, standard deviation (SD), median and range.

Parameters	Mean	SD	Median	Max.	Min.
λ_z (1/h)	0.02	0.00	0.02	0.01	0.02
HL λ_z (h)	40.59	10.69	39.17	29.32	54.69
Tmax (h)	0.12	0.08	0.08	0.08	0.25
Co ($\mu\text{g/mL}$)	14.49	0.21	14.41	14.34	14.80

AUC_{∞_pred} (h·µg/mL)	673.06	202.68	664.94	455.58	906.76
Vdss_pred (mL/kg)	352.23	28.54	359.71	313.55	375.95
Cl_pred (mL/h/kg)	6.38	1.96	6.16	4.41	8.78
MRT_{∞_pred} (h)	57.95	15.62	55.90	41.49	78.52

Table 3: Pharmacokinetic data of CP in plasma of 4 swine injected with 4mg/kg IM treated by a non-compartmental method expressed in mean, standard deviation (SD), median and range.

Parameters	Mean	SD	Median	Max.	Min.
λ_z (1/h)	0.02	0.01	0.03	0.02	0.03
HL_λ_z (h)	29.96	8.35	28.00	23.06	40.76
Tmax (h)	4.25	0.50	4.00	4.00	5.00
Cmax (µg/mL)	10.14	2.11	10.11	8.01	12.34
AUC_{∞_pred} (h·µg/mL)	402.89	9.28	404.24	390.53	412.56
Vdss_pred (mL/kg)	428.62	117.35	401.07	327.53	584.83
Cl_pred (mL/h/kg)	9.93	0.23	9.90	9.70	10.24
MRT_{∞_pred} (h)	44.81	12.07	41.89	34.92	60.56

Using the plasma CP concentrations after IV and IM (Figures 5 and 6) administration during 24-48 hours, the main pharmacokinetic parameters of 4 pigs have been evaluated by a compartmental treatment in accordance with the equations presented by Leon Shargel et al. [37] (see table 4 and 5).

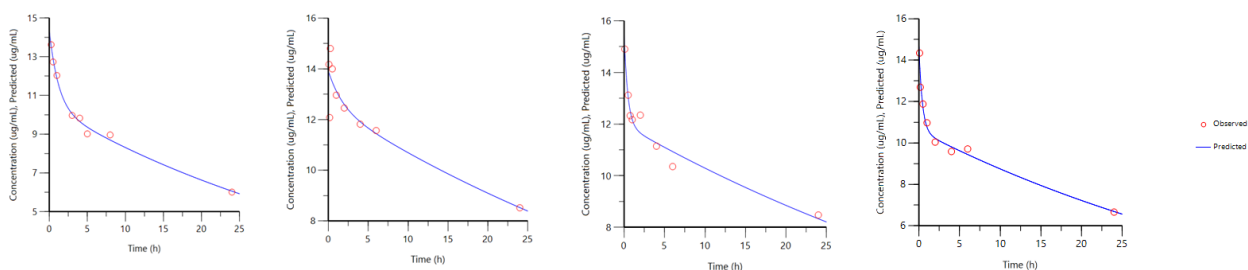


Figure 5: CP plasma concentrations in 4 swine injected IV (4mg/kg) in a bicompartamental model.

Table 4: Pharmacokinetic data of CP in plasma of 4 swine injected with IV (4mg/kg) treated by a compartmental method expressed in mean, standard deviation (SD), median and range.

Parameters	Mean	SD	median	Max.	Min.
A (µg/mL)	3.23	1.27	3.74	4.09	1.36
B (µg/mL)	11.38	1.05	11.28	12.56	10.41
Alpha (1/h)	1.50	0.93	1.51	2.40	0.57
Beta (1/h)	7.69	15.34	0.02	30.69	0.02
AUC (h·µg/mL)	648.52	164.02	667.25	793.76	465.84
K10_HL (h)	30.75	7.69	30.83	38.85	22.49
Alpha_HL (h)	0.66	0.45	0.58	1.21	0.29
Beta_HL (h)	31.25	21.21	39.55	45.88	0.02
K10 (1/h)	0.02	0.01	0.02	0.03	0.02
K12 (1/h)	0.35	0.27	0.35	0.65	0.05
K21 (1/h)	1.14	0.67	1.16	1.73	0.52
Co (µg/mL)	14.61	0.67	14.52	15.50	13.92
V1 (mL/kg)	274.13	12.32	275.54	287.35	258.07
CL (mL/h/kg)	6.49	1.72	6.17	8.59	5.04
AUMC (h·h·µg/mL)	37468.33	15320.74	38506.30	52437.54	20423.16
MRT (h)	55.92	9.97	56.88	66.06	43.84
Vdss (mL/kg)	350.33	30.27	354.13	376.45	316.61
V2 (mL/kg)	76.20	33.59	86.34	102.88	29.25
CLD2 (mL/h/kg)	95.20	72.14	93.64	178.41	15.11

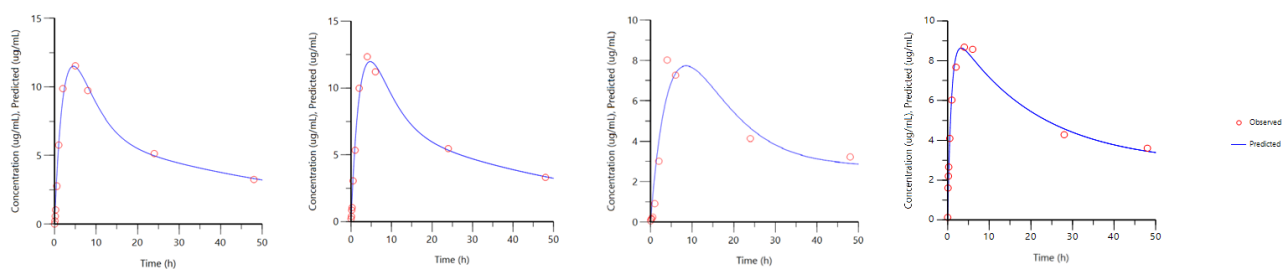


Figure 6: CP plasma concentration in 4 swine injected with IM in a bi-compartmental model.

Table 5: Pharmacokinetic data of CP in plasma of 4 swine injected with IM treated by a compartmental method, expressed in mean, standard deviation (SD), median and range.

Parameters	Mean	SD	Median	Max.	Min.
A (µg/mL)	73.20	58.45	71.54	142.54	7.20
B (µg/mL)	5.17	2.80	4.94	8.03	2.74
K01 (1/h)	0.47	0.43	0.31	1.11	0.16
Alpha (1/h)	0.17	0.11	0.18	0.27	0.05
Beta (1/h)	0.01	0.01	0.01	0.02	0.00
K10 (1/h)	0.03	0.03	0.03	0.05	0.00
K12 (1/h)	0.10	0.05	0.11	0.15	0.04
K21 (1/h)	0.05	0.04	0.05	0.09	0.01
AUC (h·µg/mL)	509.77	38.69	494.77	566.47	483.07
K01_HL (h)	2.37	1.51	2.26	4.32	0.63
K10_HL (h)	14.12	0.37	14.04	14.59	13.79
Alpha_HL (h)	6.31	5.33	4.36	13.96	2.59
Beta_HL (h)	36.89	5.44	36.92	43.39	30.33
V1_F (mL/kg)	247.62	117.66	206.22	413.99	164.04
V2_F (mL/kg)	363.18	122.34	367.36	483.67	234.35
VDSS (mL/kg)	610.80	120.36	286.78	448.83	199.20
CL_F (mL/h/kg)	4.13	4.76	4.11	8.28	0.00
CLD2_F	21.05	4.46	22.63	24.30	14.63

(mL/h/kg)

Tmax (h)	5.26	2.28	4.63	8.54	3.25
Cmax (µg/mL)	9.96	2.10	10.07	11.97	7.72

Once the pharmacokinetic parameters of CP were found in swine, we were able to compare swine with other previously described species: dogs [25], horses [15], cats [26], rabbits [20], sheep [19] and humans [23] (see table 6). In this way, we can compare if the behavior of the CP is similar in the species studied to date. To make the comparison between the various species and swine, a t-Student statistical test was performed between each species and swine.

Table 6: Pharmacokinetic parameters estimates in different species. Statistical comparison of the CP pharmacokinetic parameters (HL β , AUC, Vdss, Cl and MRT) of swine versus different studied species (dogs [25], horses [15], cats [26], rabbits [20], sheep [19] and humans [23]) expressed in mean and SD, except in dogs (mean and coefficient variation).

Parameters	DOG (4mg/kg IV Rimadyl ®) (n=6)	HORSE (4mg/kg IV Rimadyl ®) (n=6)	CAT (4mg/kg IV Zenecarp ®) (n=5)	RABBIT (2mg/kg IV Rimadyl ®) (n=6)	SHEEP (4mg/kg IV racemic CP) (n=8)	HUMAN (100mg IV Imadyl ®) (n=6)	SWINE (4mg/kg IV Rimadyl ®) (n=4)
Co (µg/mL)	58.11 ± 100.70	36.16 ± 3.88	179.8 ± 263.1	20.7 ± 2.05	39.61 ± 5.6	ND	14.61 ± 1.1
A (µg/mL)	47.68 ± 13.39	28.38 ± 3.26	146 ± 239	14.36 ± 2.72	ND	ND	3.23 ± 1.27
B (µg/mL)	10.43 ± 87.31	7.78 ± 0.61	33.8 ± 24.1	6.1 ± 2.08	ND	ND	11.38 ± 1.05
α (h-1)	0.43 ± 25.13	2.01 ± 0.66	2.94 ± 3.9	1.94 ± 0.66	1.69 ± 0.33	ND	1.5 ± 0.93
β (h-1)	0.08 ± 17.15	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.02	0.23 ± 0.05	0.03 ± 0.01	ND	7.69 ± 15.34
HL α (h)	1.63 ± 25.13	0.39 ± 0.13	ND	0.36 ± harmonic	0.43 ± 0.09	1.8 ± 0.5	0.66 ± 0.45
HL β (h)	9.1 ± 17.15	11.35 ± 2.21 *	20 ± 16.6	3.06 ± harmonic	24.17 ± 5.98	9.9 ± 0.79 *	31.25 ± 21.21
AUC (µg h/mL)	268.94 ± 26***	138.1 ± 17.89 ***	636 ± 237	37.82 ± 9.64 ***	531.8 ± 120.7	ND	648.52 ± 164.02
K10 (h-1)	0.23 ± 26.61	0.22 ± 0.04	0.34 ± 0.53	0.55 ± 0.21	0.08 ± 0.04	ND	0.02 ± 0.01
K12 (h-1)	0.11 ± 61.3	1.27 ± 0.49	2.1 ± 3.3	0.81 ± 0.34	0.97 ± 0.24	ND	0.35 ± 0.27
K21 (h-1)	0.14 ± 43.31	0.59 ± 0.2	0.55 ± 0.55	0.81 ± 0.16	0.68 ± 0.06	ND	1.14 ± 0.67
Vc (L/Kg)	0.07 ± 0.06	0.14 ± 0.02	0.05 ± 0.03	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.00	0.045 ± 0.01	0.27 ± 0.01
Vdss (L/Kg)	0.12 ± 0.01 ***	0.43 ± 0.05 *	0.14 ± 0.05 ***	0.09 ± 0.02 ***	0.13 ± 0.19 *	0.22 ± 0.06 **	0.35 ± 0.03
Cl (mL/Kg/h)	14.87 ± 26.03	29 ± 4.9 ***	7.1 ± 2.81	27.92 ± 7.07 ***	4 ± 1.22 *	31.11 ± 6 ***	6.49 ± 1.72
MRT (h)	8.02 ± 23.28 **	15.1 ± 3.43 ***	23.6 ± 16.2 *	3.45 ± 0.5 ***	33.89 ± 8.38 **	7.07 ± 9.17 ***	55.92 ± 9.97

* P-Value <0.05; **P-Value <0.01 and ***P-Value <0.001. ND: Not determined.

3.5 Bioavailability

Table 7 represents CP bioavailability calculated by comparing the respective AUCs IM and IV administration and Table 8 represents CP bioavailability calculated by comparing the respective Cmax IM and IV administration after a non-compartmental treatment of the CP plasma concentration data with respect to time and normalized by the dose.

Table 7: Bioavailability evaluated by AUC expressed in mean, standard deviation (SD), median and range.

	Swine			
	1	Swine 2	Swine 3	Swine 4
AUC IM (Dose: 4 mg/kg)	390.53	406.29	402.19	412.56
AUC IV (Dose: 4 mg/kg)	455.58	767.88	906.76	562.00
Bioavailability (F %)	85.72	52.91	44.35	73.41
Mean	SD	Median	Min.	Max.
64.1	18.9	63.2	44.4	85.7

3.6 Multiple dose calculation IM

Finally, we have been able to calculate three different dosing regimens by the IM route for the CP in swine. Figures 7, 8 and 9 represent the simulation of administering multiple doses (4mg/kg) of IM CP in swines every 8 h, 12 h and 24 h respectively.

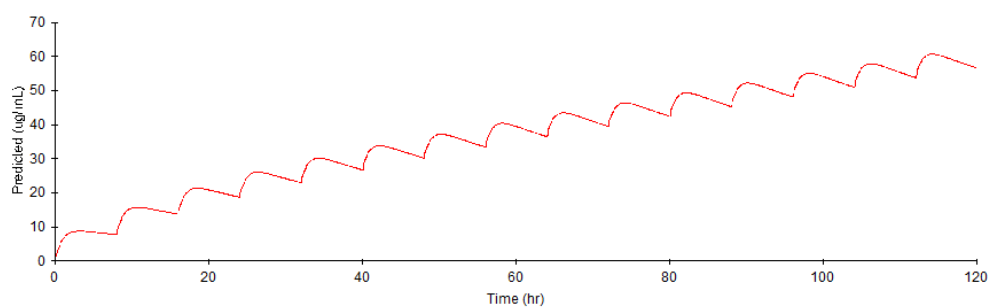


Figure 7: Simulation of administration of multiple doses (4mg/kg) of CP IM administration in swine every 8h.

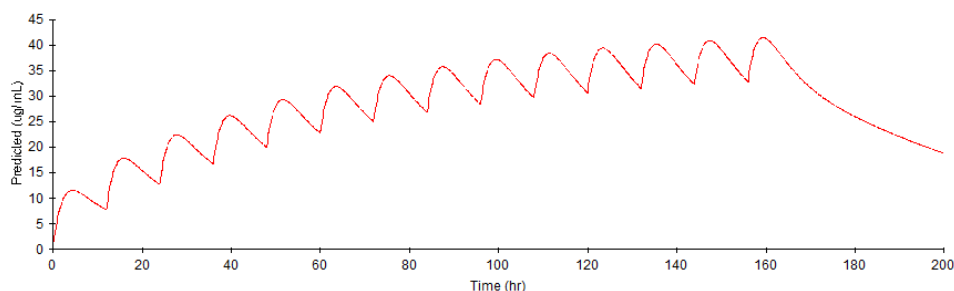


Figure 8: Simulation of administration of multiple doses (4mg/kg) of CP IM administration in swine every 12h.

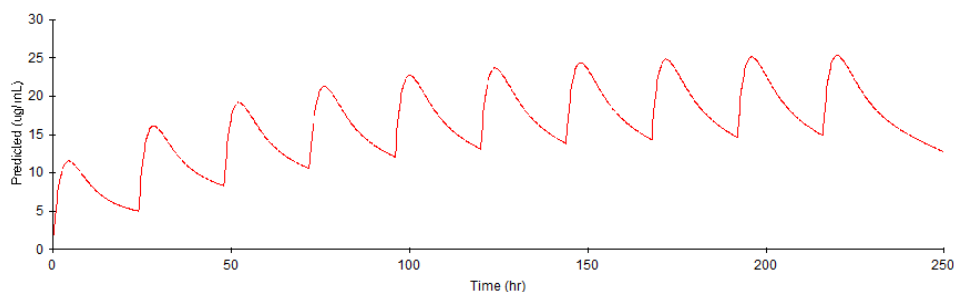


Figure 9: Simulation of administration of multiple doses (4mg/kg) of CP IM administration in swine every 24h.

4. Discussion

4.1 Liquid chromatography mass spectrometry and validation assay

By the resolution of the images (see Figure 2), it can be verified that this technique is a good method to evaluate the CP plasma concentration in this species. All ionograms have the same retention time (1.54 min), well-defined peaks and no interference. Furthermore, this method has the advantage that it does not require a great deal of prior treatment. So it is faster to perform (if we compare it with the previously described HPLC method) and therefore, cheaper to perform. Validation assay was suitable for the established parameters. The results demonstrate an adequately selective, accurate and precise method.

4.2 Pharmacokinetic parameters

As previously mentioned, the results obtained were treated with two methods of calculating parameters: non-compartmental and compartment methods. These two methods are accepted clinically and by the drug agency (EMA) when studying the dosage of a drug [37-38].

Data of plasma concentrations of CP by the IV route were treated by the compartmental method. We can observe that the 4 profiles in each route are very similar between the 4 swine. Finally, the main pharmacokinetic parameters of CP by the IM route were analyzed by the compartmental method. These parameters do not show any abnormality. However, once the parameters have been described by the compartmental method and based on the classification of Davies et al. [36], we can say that Cl: 3.24 mL/min and Vdss: 0.35L/kg values can be considered in low range. However, the HL: 39h can be considered very high. Low Cl implies a long permanence time in the organism. Therefore, this factor will be beneficial as it is able to provide the conditions for a longer dosage over time. Due to low Cl, it implies a longer HL of the drug and therefore a lower elimination constant [33]. Low Vdss may be due to the fact that it has been described in other species that CP has a high binding to plasma proteins [15-17] and this hinders its distribution in the organism.

Once the pharmacokinetic parameters of CP were found in porcine plasma by the compartmental method, we were able to perform a comparison between species. To do this, we have searched for the CP pharmacokinetic parameters investigated up to the present time in dogs, horses, cats, rabbits, sheep and humans. As we can see, all species were administered a CP dose of 4mg / kg IV route (the same as in our study). In this way, the comparison between species is more robust and valid. As can be seen, not all the pharmacokinetic parameters found in the porcine species have been described in other species. For this reason, we are going to focus on the shaded parameters in Table 6 (HL, AUC, Vdss, Cl and MRT), since they are the parameters described in almost all the species studied to date and therefore comparable with swine.

As we can see, AUC of CP in swine is the highest (648.52 $\mu\text{g} \cdot \text{h} / \text{mL}$) and presents significant differences with almost all the species studied. This factor is beneficial for swine since a high AUC represents more unchanged drug in the organism and therefore it can have its effect for longer [33]. Furthermore, we can observe that HL and MRT of CP in the swine is also very high (31.25h and 55.92h respectively) and the Cl is low (6.49 mL / Kg / h) compared to other species. Therefore, the drug remains in the body for longer and its elimination constant is low, which favors the drug to be able to work for a longer time. Finally, we can observe that Vdss of the drug in the swine species (0.35L / Kg), although it is not very high, is one of the highest levels if we compare it with the other species (only exceeded in horses). The Vdss represents the distribution of a drug through the different tissues [37].

Therefore, CP in porcine species is distributed better in tissues than in other species.

In summary, we can say that CP presents significant differences in its pharmacokinetic behavior with respect to the other species studied. In the case of swine, CP remains unchanged in the organism for longer than in other mammals and can carry out its action for a longer time. Therefore, we can say that CP is a good candidate to treat inflammatory diseases and pain in swine species. Furthermore, the importance of carrying out pharmacokinetic studies of a drug in different species should be highlighted, since the results can be very different from one species to another [39].

4.3 Bioavailability

The AUC level-time curve is a measurement of the extent of bioavailability of a drug. The AUC reflects the total amount of active drug that reaches the systemic circulation. In our study we have observed that in order to estimate the AUC value more precisely, it would be necessary to calculate more points after 48h. Therefore, the estimation of the non-compartmental method is a bit imprecise. However, our study has served as a preliminary study for the calculation of the AUC of CP in pigs. Assuming that AUC value calculated by the non-compartmental method has a bias, we have calculated the bioavailability from AUC value calculated by the compartmental method. When comparing them we have been able to establish that no great differences are observed, and therefore the result is acceptable.

Therefore, from the AUCs found in IV and IM administration by a single administered dose (4mg/kg), bioavailability can be determined by the IM route in swine. In this case, the bioavailability of CP in porcine species when administered IM is 64.1%. Given the variability of 18.9%, high, but which is considered normal in living beings [40], we can consider the CP bioavailability very acceptable and the IM route is deemed very suitable for the porcine species.

4.4 Recovery from liver and kidney

From samples taken at 48 hours from kidney and liver, we obtained the amounts of CP in these organs at the end of the pharmacokinetic study. We can say that the distribution and retention of CP remains homogeneous in the two organs (previously determined the % recovery of 97.4% in liver and 83.62% in kidney). At 48 hours there are still CP quantifiable amounts retained in both organs, as there is still drug being eliminated.

In addition, given that the CP half-life for IM administration is almost two days (39h) and to ensure that there is no drug left in the body requires a purification of 7-10 half-lives [41]. We can say that in order to establish a period of suppression for human consumption, we should wait a minimum waiting time of 15-20 days before consuming pork treated with CP.

4.5 Multiple dose calculation IM

Bearing in mind that the IV via has limitations in the posology in the treatment of swine, we have concentrated on making a posology with the IM via. The aim was to find the best administration interval in swine with a dose of 4mg/kg IM in order to achieve plasmatic concentrations within the therapeutic range and in the shortest time possible [42]. As we did not know the therapeutic interval in swine, we based our research on studies carried out before in two species: humans [23] and dogs [43]. The studied administration intervals were: 8, 12 and 24 hours. Taking values between 15-20 µg/ml as a measure of effective concentration, we could put forward that the best plan administrating CP is every 24h, for the second dosage arrives at efficient concentrations and maintains beneficial and safe concentrations over a long period of time.

5. Conclusions

As a conclusion of this study, it has been possible to describe and validate a new method to characterize plasma levels of Carprofen in swines, in order to explore the pharmacokinetic parameters. These results open the possibility of using Rimadyl® for veterinary applications in this specie.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/xxx/s1, **Figure S1:** Linear regression of the 4 studied lines by T1, **Figure S2:** Linear regression of the 4 studied lines by T2, **Table S1:** Repeatability of the method for two transitions (T1 and T2) expressed by Mean, Standard Desviation (SD) and Relative Standard Deviation (RSD) for three concentration levels (10, 250 and 750 ppb), **Table S2:** Accuracy of the method for transition T1 expressed by Mean, Standard Desviation (SD) and Relative Standard Deviation (RSD) for total of seven concentration levels of the standard curves (from 1 ppb (ng/mL) to 1000 ppb), **Table S3:** Accuracy of the method for transition T2 expressed by Mean, Standard Desviation (SD) and Relative Standard Deviation (RSD) for total of seven concentration levels of the standard curves (from 1 ppb (ng/mL) to 1000 ppb), **Table S4:** Limit of Detection (LOD) and Limit of Quantification (LOQ) of the method for two transitions (T1 and T2) expressed by ppb concentration, **Figure S3:** Ionogram of Limit of Detection (LOD) and Limit of Quantification (LOQ) for transition T1, **Figure S4:** Ionogram of Limit of Detection (LOD) and Limit of Quantification (LOQ) for transition T2, **Figure S5:** Ionograms of CP at different plasma samples times of swine number 2. A: IV levels at 5 min; B: IV levels at 6h; C: IV levels at 24h; D: IM levels at 5 min; E: IM levels at 6h and F: IM levels at 24h, **Figure S6:** Ionograms of CP at different plasma samples times of swine number 3. A: IV levels at 5 min; B: IV levels at 6h; C: IV levels at 24h; D: IM levels at 5 min; E: IM levels at 6h and F: IM levels at 24h, Ionograms of CP at different plasma samples times of swine number 4. A: IV levels at 5 min; B: IV levels at 6h; C: IV levels at 24h; D: IM

levels at 5 min; E: IM levels at 6h and F: IM levels at 24h and **Figure S7**: Ionograms of CP at different plasma samples times of swine number 4. A: IV levels at 5 min; B: IV levels at 6h; C: IV levels at 24h; D: IM levels at 5 min; E: IM levels at 6h and F: IM levels at 24h.

Author Contributions: Conceptualization, Ana C. Calpena, Alexander Parra and Álvaro Gimeno.; methodology, Lúdia Gómez-Segura, Álvaro Gimeno and David Bellido.; validation, Lúdia Gómez-Segura, Ana C. Calpena and Antonio Boix-Montañés.; formal analysis, Lúdia Gómez-Segura and David Bellido; investigation, Lúdia Gómez-Segura and Alexander Parra.; resources, Alvaro Gimeno and Lúdia Gómez-Segura.; data curation Lúdia Gómez-Segura and Ana C. Calpena.; writing—original draft preparation, Lúdia Gómez-Segura.; writing—review and editing, Lúdia Gómez-Segura, Antonio Boix-Montañés and Ana C. Calpena.; visualization, Lúdia Gómez-Segura, Antonio Boix-Montañés and Ana C. Calpena.; supervision, Antonio Boix-Montañés and Ana C. Calpena.; project administration, Antonio Boix-Montañés and Ana C. Calpena. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee University of Barcelona (protocol code 10617 and 14/06/2019).

Acknowledgments: We thank Miss. Alba Gómez-Segura and Mr. Harry Paul for their technical assistance in the preparation of the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Reference

1. Yü, T. F.; Perel, J. Pharmacokinetic and Clinical Studies of Carprofen in Gout. *J. Clin. Pharmacol.* **1980**, *20*(5-6), 347-351.
2. Griswold, D.E.; Adams, J.L. Constitutive cyclooxygenase (COX-1) and inducible cyclooxygenase (COX-2): rationale for selective inhibition and progress to date. *Med Res Rev.* **1996**, *16*(2), 181-206.
3. Kerr, A.C.; Muller, F.; Ferguson, J.; Dawe, R.S. *Br. J. Dermatol.* **2008**, *159*, 1303.
4. Simmons, D.L.; Regina, M.B.; Hla, T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol. Rev.* **2004**, *56*, 387-437.
5. Sanderson, R.O.; Beata, C.; Flipo, R.M.; Genevois J.P.; Macias, C.; Tacke, S.; Vezzoni, A., Innes, J.F.. Systematic review of the management of canine osteoarthritis. *Vet. Rec.* **2009**, *164*, 418-424.

6. Elitok, B.; Elitok, O.M. Clinical efficacy of Carprofen as an adjunct to the antibacterial treatment of bovine respiratory disease. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **2004**, *27*, 317–320.
7. Lockwood, P.W.; Johnson, J.C.; Katz, T.L. Clinical efficacy of flunixin: Carprofen and ketoprofen as adjuncts to the antibacterial treatment of bovine respiratory disease. *Vet. Rec.* **2003**, *152*, 392–394.
8. Vangroenweghe, F.; Duchateau, L.; Boutet, P.; Lekeux, P.; Rainard, P.; Paape, M.J.; Burvenich, C. Effect of Carprofen treatment following experimentally induced *Escherichia coli* mastitis in primiparous cows. *J. Dairy Sci.* **2005**, *88*, 2361–2376.
9. Karol, A.M. Nonsteroidal anti-inflammatory analgesics in pain management in dogs and cats. *Can. Vet. J.* **1996**, *37*, 539–543.
10. Sidler, M.; Fouché, N.; Meth, I.; von Hahn, F.; von Rechenberg, B.; Kronen, P.W. Transcutaneous treatment with vetdrop1 sustains the adjacent cartilage in a microfracturing joint defect model in sheep. *Open Orthop. J.* **2013**, *7*, 57–66.
11. Bergmann, H.M.; Nolte, I.; Kramer, S. Comparison of analgesic efficacy of preoperative or postoperative Carprofen with or without preincisional mepivacaine epidural anesthesia in canine pelvic or femoral fracture repair. *Vet. Surg.* **2007**, *36*, 623–632.
12. <https://www.animalshealth.es/profesionales/antiinflamatorio-veterinario-Carprofen-podria-frenar-coronavirus-covid-19> . Available online: URL (accessed on 9th September 2020).
13. Bošnjak M.; Kržan M.; Lamprecht T. U.; Dolenc J.; Čemažar M.; Seliškar A. Pharmacokinetics of carprofen in anaesthetized pigs: A preliminary study. *Vet. Anaesth. Analg.* **2020**, *20*, S1467-2987(20)30227-0.
14. Armstrong S.; Tricklebank P.; Lake A.; Frean S.; Lees P. Pharmacokinetics of Carprofen enantiomers in equine plasma and synovial fluid. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **1999**, *22*, 196-201.
15. Lees P.; Aliabadi F. S.; Landoni M. F. Pharmacodynamics and enantioselective pharmacokinetics of racemic Carprofen in the horse. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **2003**, *25*(6), 433-48.
16. Mealey K. L.; Matthews N. S.; Peck K. E.; Burchfield M. L.; Bennett B. S.; Taylor T. S. Pharmacokinetics of R(-) and S(+) Carprofen after administration of racemic Carprofen in donkeys and horses. *Am. J. Vet. Res.* **2004**, *65*(11), 1479-82.
17. Brentnall C.; Cheng Z.; McKellar Q. A.; Lees P. Pharmacokinetic-pharmacodynamic integration and modelling of oxytetracycline administered alone and in combination with Carprofen in calves. *Res. Vet. Sci.* **2013**, *94*(3), 687-94.
18. Brentnall C.; Cheng Z.; McKellar Q. A.; Lees P. Influence of oxytetracycline on Carprofen pharmacodynamics and pharmacokinetics in calves. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **2013**, *36*(4), 320-8.

19. Cheng Z.; Nolan A.; Monteiro A.; McKellar Q. Enantioselective pharmacokinetics and cyclo-oxygenase inhibition of Carprofen and Carprofen enantiomers in sheep. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **2003**, *26*, 391-394.
20. Hawkins M. G.; Taylor I. T.; Craigmill A. L.; Tell L. A. Enantioselective pharmacokinetics of racemic Carprofen in New Zealand white rabbits. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **2008**, *31*(5), 423-30.
21. Zhang L.; Zhang J.; Wang L.; Xia H. Ocular Pharmacokinetics and Availability of Topically Applied Baicalein in Rabbits. *Curr. Eye Res.* **2009**, *34*(4), 257-63.
22. Fourie T.; Cromarty D.; Duncan N.; Wolter K.; Naidoo V. The Safety and Pharmacokinetics of Carprofen, Flunixin and Phenylbutazone in the Cape Vulture (*Gyps coprotheres*) following Oral Exposure. *PLoS One.* **2015**, *10*(10), e0141419.
23. Crevoisier C. Pharmacokinetic properties of Carprofen in humans. *Eur. J. Rheumatol. Inflamm.* **1982**, *5*(4), 492-502.
24. Lipscomb V. J.; AliAbadi F. S.; Lees P.; Pead M. J.; Muir P. Clinical efficacy and pharmacokinetics of Carprofen in the treatment of dogs with osteoarthritis. *Vet. Rec.* **2002**, *150*(22), 684-9.
25. Messenger K. M.; J. A.; Papich M. G. Carprofen pharmacokinetics in plasma and in control and inflamed canine tissue fluid using in vivo ultrafiltration. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **2016**, *39*(1), 32-9.
26. Parton K.; Balmer T. V.; Boyle J.; Whitem T.; MacHon R. The pharmacokinetics and effects of intravenously administered Carprofen and salicylate on gastrointestinal mucosa and selected biochemical measurements in healthy cats. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **2000**, *23*(2), 73-9.
27. Taylor P. M.; Delatour P.; Landoni F. M.; Deal C.; Pickett C.; Aliabadi F. S.; Foot R.; Lees P. Pharmacodynamics and enantioselective pharmacokinetics of Carprofen in the cat. *Res. Vet. Sci.* **1996**, *60*(2), 144-51.
28. Foster, R.T.; Jamali F. High-performance liquid chromatographic assay of ketoprofen enantiomers in human plasma and urine. *J. Chromatogr. A.* **1987**, *416*, 388-393.
29. Armstrong, S.; Tricklebank, P.; Lake A.; Freaan, S.; Lees, P. Pharmacokinetics of carprofen enantiomers in equine plasma and synovial fluid – a comparison with ketoprofen. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **1999**, *22*, 196-201.
30. Jedziniak P.; Szprengier-Juszkiewicz T.; Pietruk K.; 'Sledzin'snka E.; Zmudzki J. Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs and their metabolites in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *403*, 2955-2963.
31. Christianson C. C.; Johnson C. J.; Needham S. R. The advantages of microflow LC-MS/MS compared with conventional HPLC-MS/MS for the analysis of methotrexate from human plasma. *Bioanalysis.* **2013**, *5*(11), 1387-1396.
32. Li R. ; Ran R.; Li Q.; Huang Y.; Gu Y.; Si D. Development of an LC-MS/MS method for the quantitation of deoxyglycyloxazol in rat plasma and its application in pharmacokinetic study. *J. Pharm. Anal.* **2016**, *6* (3), 184-189.

33. Doménech B. J.; Martínez L. J.; Peraire G. C. *General Treaty on Biopharmacy and Pharmacokinetics*. 3rd ed. Publisher: Madrid, Spain, 2013; Volume 1, pp. 368-438.
34. <http://www.todoelcampo.com.uy/espanol/agua-en-cerdos-fisiologia-requerimientos-e-implicaciones-practicas-15?nid=15904> . Available online: URL (accessed on 9th September 2020).
35. Linares Q. A. I.; Burgos R. F. J.; Villafruela S. J.J.; Zamora R. J.; Pascual S. J.; Marcén L. R.; Cuevas S. B.; Correa G. C. Análisis comparativo de las modificaciones hemodinámicas y del flujo sanguíneo renal (FSR) durante la nefrectomía abierta y laparoscópica. Modelo experimental. *Actas Urol. Esp.* **2007**, *31* (4).
36. Davies B.; Morris T. Physiological Parameters in Laboratory Animals and Humans. *Pharm. Res.* **1993**, *10*, 1093–1095.
37. Shargel L.; Yu A. B. C. *Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics*. 3rd ed. Publisher: Connecticut, United States of America, 1992, 193-203.
38. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-pharmacokinetic-clinical-evaluation-modified-release-dosage-forms_en.pdf **21 September 2020** . Available online: URL (accessed on 12th October 2020).
39. Baggot J. D. Clinical pharmacokinetics in veterinary medicine. *Clin Pharmacokinet.* **1992**, *22*(4), 254-73.
40. Davit, B. M., Conner, D. P., Fabian-Fritsch, B. *et al.* Highly Variable Drugs: Observations from Bioequivalence Data Submitted to the FDA for New Generic Drug Applications. *AAPS J.* **2008**, *10*, 148–156.
41. Younan M.; Atkinson T. J.; Fundin J. A Practical Approach to Discontinuing NSAID Therapy Prior to a Procedure. *PPM.* **2013**, *13* (10), 45-51.
42. Lees P.; Landoni M. F.; Giraudel J.; Toutain P. L. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in species of veterinary interest. *J. vet. Pharmacol. Therap.* **2004**, *27*, 479–490.
43. Clark T. P.; Chieffo C.; Huhn J. C.; Nimz E. L.; Wang C.; Boy M. G. The steady-state pharmacokinetics and bioequivalence of carprofen administered orally and subcutaneously in dogs. *J. vet. Pharmacol. Therap.* **2003**, *26*, 187–192.

DISCUSIÓ

El nostre primer estudi s'ha basat en la validació del mètode analític del CP mitjançant HPLC, ja que fins ara no s'havia fet servir. Per fer-ho hem fet servir una solució de CP saturada (CP-Sat).

Els pics detectats abans dels primers 2 minuts en totes les mostres es van atribuir a la injecció de la mostra, ja que apareixia regularment en totes les mostres provades. El pic de CP va aparèixer entre 2-3 minuts. La resolució calculada per a qualsevol pic va revelar que aquest mètode era acceptablement selectiu pel CP.

Tots els R^2 van resultar per sobre de 0,998. Es va demostrar una linealitat satisfactòria dins de les concentracions estudiades, ja que no es van trobar diferències estadístiques ($P > 0,05$) mitjançant un test d'anàlisi de variances (ANOVA) amb Valors de P per els dos intervals de 0,404 i 0,078.

Com podem veure a la taula 1 del primer article, les prediccions de les dues rectes de concentració són similars. Suposant un volum de cèl·lula de 4,5 ml i tenint en compte que s'han utilitzat 300 μL ·1500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ com a solució donant, el valor mínim de LOQ assegura una mesura adequada fins a un mínim del 0,4% de la dosi aplicada a l'experiment de permeació.

L'exactitud i precisió de les corbes de calibratge de CP van ser inferiors al 15% dels valors límit suggerits a les pautes EMA (EMA (b)) i no es van trobar diferències estadístiques ($p < 0,05$) en el test ANOVA. Aquests resultats suggereixen que el mètode proposat és adequadament exacte i precís per a tot l'interval estudiat (0,78-100 $\mu\text{g} / \text{mL}$).

La recuperació màxima s'ha aconseguit en la mucosa vaginal (26,2%) i la més baixa en la mucosa bucal (1,2%). En el nostre cas, no hem utilitzat dissolvents orgànics, ja que tot i que s'hagués aconseguit una recuperació més elevada, es podria haver compromès la integritat histològica dels teixits (objectiu principal d'aquest experiment). De fet, estudis de validació previs demostren que el CP es pot degradar mitjançant l'ús de dissolvents orgànics alcohòlics o halogenats. Per aquest motiu, hem utilitzat també fosfat salí (PBS) aquós per a les proves d'extracció.

Segons els experiments de permeació, es van complir les "sink conditions" en el compartiment receptor (el volum del compartiment receptor ha de ser tres vegades el volum de saturació) com a premissa per a aquesta validació (European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, 2018). El compliment de les "sink conditions" es va verificar tenint en compte la solubilitat experimental de CP en PBS i els màxims nivells de permeació assolits en cada cas.

En quan a les permeacions realitzades en aquest treball, la permeació de la membrana conjuntiva presenta una permeació estacionària lineal des del temps zero. Per contra, les corbes de les membranes de l'esclera i de la còrnia són còncaues, cosa que suggereix l'existència d'un temps de retard rellevant fins a la

segona hora (a la còrnia) i fins a la tercera hora (a l'esclera). La quantitat màxima de permeabilitat es va produir en la còrnia i la seva concentració equivalent no va assolir el límit de "sink conditions". En conseqüència, en els teixits oftàlmics, la permeació corneal té el valor màxim (49,06 µg), que representa una concentració d'uns 220,78 µg/mL.

Pel que fa a les membranes mucoses, els perfils bucal i sublinguals són còncaus, això suggereix un augment del flux de permeació després de la tercera hora en ambdós teixits. En canvi, la permeació de la mucosa de la vagina mostra una permeació lineal des de l'inici, sense temps de retard. En aquest cas, els nivells a les 6h dels tres casos són força similars, arrodonint el valor màxim a 18,24 µg per a la permeació bucal, que representa una concentració d'uns 218,89 µg / mL.

En resum, la quantitat màxima impregnada amb teixits oftàlmics és de 49,06 µg, el que representa un 2,80% del valor de saturació de CP. En relació amb les membranes mucoses, la quantitat màxima permeable és de 18,24 µg, el que representa un 1,02% del valor de saturació de CP. En ambdues sèries, les quantitats màximes permeses representen menys del 20% de la solubilitat de CP. Per tant, es compleix la premissa experimental.

Pel que fa a la probabilitat de valors de retenció de fàrmacs, els resultats s'acosten a altres valor aconseguit per altres autors amb medicaments similars (Lindstrom i Kim, 2006). Es coneix que la permeabilitat de la còrnia amb AINEs és superior a la d'altres estructures oftalmològiques (Gabani i cols., 2020).

En quan els paràmetres de permeació, es van observar diferències estadístiques entre els teixits oftàlmics pel que fa als coeficients de flux (J_s) i constant de permeabilitat (K_p). El J_s del CP (és la velocitat d'entrada al teixit) és significativament més ràpid a través de l'escleròtica (26,54 µg/h) que en conjuntiva i còrnia (0,22 i 1,85 µg/h respectivament). Aquests resultats es poden deure a les seves diferents estructures anatòmiques i a la formulació del producte (Olsen i cols., 2002; Menduni i cols., 2018; Sanchez i cols., 2011). A més, diversos estudis recolzen que, tot i que la còrnia i l'escleròtica tenen un gruix similar (900µm), l'escleròtica és deu vegades més permeable (Sanchez i cols., 2011). No s'han trobat estudis previs sobre la conjuntiva. D'altra banda, el K_p és significativament superior en esclera (5,53cm·h) que en conjuntiva (0,045cm·h) i còrnia (0,39cm·h). Per tant, la conjuntiva i la còrnia tenen una permeabilitat inferior. El CP es manté més temps al teixit i aquest és un factor beneficiós per a futurs estudis de tractaments antiinflamatoris d'acció local.

D'altra banda, el J_s és força baix i molt similar a les tres membranes mucoses (no hi ha diferències significatives entre els tres teixits). El temps de retard (TI) és el temps necessari per arribar a l'estat estacionari, cosa que suggereix una ràpida absorció de CP a través de les mucoses bucal (3.27h) i sublingual (2.83h) i més lentament a la mucosa vaginal (0.13h). Aquestes diferències es poden explicar a

causa de l'estructura dels teixits (Domínguez-Villegas i cols., 2014). En resum, les permeabilitats trobades són més baixes que els teixits oftàlmics.

Seguidament parlarem de la retenció del fàrmac estudiat a les membranes. La quantitat retinguda (Q_r) en conjuntiva i esclera (22,74 i 48,94 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{g}$ respectivament) és superior a la de la còrnia (14,21 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{g}$). L'alta retenció de CP a la còrnia afavoreix una alliberació perllongada. Un estudi similar (Parra i cols., 2015) en còrnia de porc i nanopartícules de CP va mostrar aproximadament 50,43 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{g}$. Aquests resultats no són directament comparables amb aquest experiment a causa de les diferències de formulació i metodologia, però la similitud dels valors assolits confirma la seva idoneïtat.

En les membranes mucoses estudiades, la Q_r és molt similar a la mucosa vaginal i sublingual, sent la mucosa vaginal la més alta (26,3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{g}$). En canvi, la Q_r menor pertany a la membrana mucosa bucal (10,41 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{g}$). Aquestes diferències entre mucoses bucals i sublinguals es poden deure a diferències de teixits estructurals (Domínguez-Villegas, V. i cols., 2014). En aquest cas, l'alta Q_r de la mucosa sublingual fa que la CP sigui un medicament candidat molt interessant per administrar localment en aquest teixit (Lam i cols., 2014).

Per últim, avaluarem la integritat histològica de les membranes de permeació. Per avaluar les imatges histològiques, cal observar i comparar alguns paràmetres. La part més important per avaluar si un teixit ha patit algun dany és la part més externa (en aquest cas l'epiteli queratinitzat pla estratificat). Ja que és la part que té un contacte més directe amb el fàrmac estudiat. A més, també és important observar que la resta d'estructures cel·lulars no presenten cap tipus d'alteració (Bacha i cols., 2014; Zimmerman i cols., 2019). Per tant, analitzarem les imatges de cada teixit estudiat per separat.

El teixit mucós vaginal té la particularitat de tenir moltes ondulacions. Aquesta estructura és per facilitar la munta entre mascle i la femella. Una altra particularitat d'aquest teixit és que l'epiteli pot tenir un gruix diferent segons la fase del cicle estral. Finalment, tal i com es pot observar en la foto 2 del primer article, podem dir que la part més externa no està danyada en el teixit tractat.

En quan a la mucosa bucal, la part de l'epiteli (la part més externa) no presenta alteracions ni canvis cel·lulars.

El teixit mucós sublingual presenta algunes particularitats, ja que és un teixit més muscular i amb fibres de col·lagen. Es pot veure que les dues fotos (teixit no tractat i teixit tractat) no mostren danys i, per tant, que el teixit tractat amb CP-Sat no ha patit cap alteració.

La còrnia és un teixit molt fràgil i fi. L'epiteli i la làmina pròpia estan separades per una fina capa anomenada membrana de Bowman. Si observem la imatge tractada

amb CP-Sat, podem veure que ni l'estructura cel·lular ni l'epiteli presenten alteracions.

La conjuntiva és un teixit molt vascular i podem veure fol·licles pilosos que pertanyen a les pestanyes. Com podem veure a la imatge tractada amb CP-Sat no presenta cap diferència amb la imatge no tractada.

Finalment, podem veure l'estructura de l'escleròtica. Aquest teixit també és molt fi, fràgil i delicat. L'episclera és la capa més externa i la seva funció és facilitar el lliscament del globus ocular amb la resta d'estructures oculars. L'estroma està format per fibres de col·lagen. Finalment, la capa més interna és la làmina fusca i conté abundants vasos sanguinis. Com podem veure a la imatge tractada amb CP-Sat, no hi ha cap part estructural de l'escleròtica afectada.

En resum, no es van observar danys histopatològics entre les mostres control (no tractades) i les mostres tractades amb CP-Sat. L'estructura cel·lular de tots els teixits estudiats presenta una morfologia i distribució normals. Per tant, podem dir que el mètode utilitzat no afecta l'estructura cel·lular dels teixits estudiats.

Un cop vam realitzar la validació del mètode, s'ha realitzat un estudi de permeació de solució de CP i nanopartícules de CP en els mateixos teixits comentats prèviament. La finalitat d'aquest experiment és demostrar i comparar l'eficàcia i seguretat de les dues formulacions.

En els cromatogrames de les CP-NPs de cada teixit estudiat podem observar els diferents temps de retenció. La figura 1 del segon article representa el valor de concentració de 100 µg/mL i el seu temps de retenció és de 2.516 min. A les figures següents es representen els cromatogrames de les mostres recollides a les 6 hores en cada teixit (esclera, còrnia, conjuntiva, bucal, sublingual i vaginal respectivament). En tots els teixits el temps de retenció és molt similar (2.445-2.574min.). En resum, podem dir que el mètode utilitzat és molt selectiu i específic per a l'estudi del CP.

A la mucosa conjuntiva el Js és estadísticament més alt en la solució de CP (9,4 mcg/h) que en les CP-NPs (4,19 mcg/h). Per tant, en aquest tipus de mucoses, les NPs queden més temps al teixit (en el lloc d'acció del medicament). A més, la Tl de les NPs és estadísticament inferior (0,31 h) en comparació amb els resultats de la solució CP (1,45 h). Per tant, els resultats suggereixen que les CP-NPs s'absorbeixen molt ràpidament en aquest teixit i tenen una alta difusió (Raber, A.S. i cols., 2014). En el cas de Kp, és estadísticament més alt en la solució CP (19,58cm·h) que en les CP-NPs (8,73cm·h). El Kp depèn molt de la fórmula del medicament i, en aquest cas, les NPs tenen una permeabilitat inferior, es mantenen més temps al teixit i poden realitzar la seva funció. Per tant, això pot ser una indicació que les NPs poden tenir més efecte durant més temps (Parra i cols., 2015). També hi ha diferències significatives entre els valors P1 i P2 entre els dos tipus de

formulacions. P1 indica la distribució entre la formulació i el teixit i P2 indica la difusió del fàrmac en el teixit. En aquest cas, P1 és estadísticament més alt en la formulació de la solució de CP (17,01cm) que en les CP-NPs (2,18cm). En altres paraules, la distribució entre el vehicle i la membrana és més gran en la solució de CP i, per tant, penetra millor que CP-NPs. Una possible explicació seria la formulació del producte en sí, ja que la solució de CP es dissol millor que les CP-NPs (Carneiro i cols., 2019). D'altra banda, la P2 és estadísticament més alta en el cas de CP-NPs (6,32 cm). Aquests resultats mostren que, tot i que els NP tenen un temps de retard més curt per penetrar al teixit (probablement a causa de la seva formulació) (Bamrungsap i cols., 2012), un cop a dins la seva capacitat de difusió i distribució en el teixit juga un paper important en el seu funcionament. Finalment, podem veure que no hi ha diferències significatives en la Qr dels dos tipus de formulacions (3,62 mcg/cm²/g en la solució de CP i 3,57 mcg/cm²/g en CP-NPs).

En resum, a la mucosa conjuntiva podem dir que les CP-NPs tenen avantatges, ja que tenen un Js i Kp més baixos i un P2 més alt que la solució de CP. Per tant, les CP-NPs tenen una menor capacitat de permeació i una millor difusió dins del teixit.

A la còrnia no s'observen diferències estadísticament significatives per a cap paràmetre, excepte pel paràmetre Qr. Per tant, ambdues formulacions actuen d'una manera molt similar. Tot i que no hi ha diferències entre Js i Kp, la Qr de les CP-NPs (20,89 mcg/cm²/g) és estadísticament major que a la Solució CP (16,56 mcg/cm²/g). Per tant, podem afirmar que les CP-NPs es mantenen més temps a la mucosa i, per tant, tenen més activitat local i són més segures (ja que passa menys fàrmac al torrent sanguini).

A l'escleròtica, no hi ha diferències significatives entre les Js i les Kp entre les formulacions. Només s'observen diferències estadístiques en Tl i P2. En aquest cas, la solució CP té una Tl significativament inferior (2,04 h⁻¹) que la CP-NPs (2,7h⁻¹). A més, la solució CP té un P2 estadísticament més alt (0,82 cm) que les CP-NPs (0,62 cm). Aquests dos paràmetres suggereixen que en aquest teixit la solució CP té avantatges respecte a les CP-NPs. Atès que la solució CP necessita menys temps per penetrar en el teixit i també es difon millor a l'interior de la membrana mucosa.

En resum, podem concloure que les CP-NPs tenen avantatges a la conjuntiva i a la còrnia. A la conjuntiva, les CP-NPs triguen més a penetrar, de manera que romanen més temps en el lloc d'acció. En el cas de la còrnia, tot i que les dues formulacions actuen de manera similar, les CP-NPs tenen una millor activitat local i són més segures. Per tant, les CP-NPs són una bona opció per tractar malalties inflamatòries de forma local en aquests dos teixits.

A la mucosa bucal es pot observar que Js i Kp són estadísticament més baixos en la solució CP (0,74 mcg/h en la solució CP i 0,39 cm en les CP-NPs). Per tant, la solució CP té una menor capacitat de permeabilitat i menys entrada al torrent sanguini. No obstant, caldria comentar i considerar altres factors com Tl, P1, P2 i

Qr. Tl és estadísticament superior en la solució CP (1,65 h) que en les CP-NPs (0,8 h). A més, P1, P2 i Qr són estadísticament significativament més altes en les CP-NPs. Un factor molt important a tenir en compte és que Qr en les CP-NPs és estadísticament superior (3,46 mcg/cm²/g) que en la solució CP (2,38 mcg/cm²/g). Per tant, podem dir que les CP-NPs són més segures i eficients per tractar localment la membrana mucosa bucal.

A la mucosa sublingual es pot observar que el Js és estadísticament inferior en les CP-NPs (0,31 mcg/h) que en la solució CP (4,81 mcg/h). Per tant, com s'ha explicat anteriorment, les CP-NPs tenen una taxa d'entrada de flux sanguini més baixa i per aquest motiu són més eficaces a nivell local. A més, Kp també és estadísticament inferior en CP-NPs (0,65 cm·h) i aquest factor també el converteix en un millor tractament local en aquest teixit. Un altre factor a tenir en compte és que la Tl de les CP-NPs és estadísticament inferior (0,8 h) que la de la solució CP (2,77 h) i, per tant, s'absorbeix al teixit més ràpidament. També s'observen diferències significatives a P1 i P2. En aquest cas, el P1 és estadísticament més alt en la solució CP (16,24 cm); però la P2 és estadísticament més alta en les CP-NPs (2,1h-19). Per tant, les CP-NPs entren més ràpidament a l'interior de la mucosa sublingual. No obstant això, un factor negatiu és que en aquest teixit, el Qr és lleugerament estadísticament més alt en la solució CP (33,14 mcg/cm²/g) que en les CP-NPs (29,13 mcg/cm²/g). Aquest factor és important, ja que quan més eleva és la Qr d'un medicament, més eficaç i segur és. Tanmateix, tot i que el Qr és significativament més alta en la solució CP, la quantitat de Qr en el CP-NPs també és força elevada. En resum, tenint en compte tots els factors, podem afirmar que les CP-NPs són un bon candidat per al tractament local de malalties inflamatòries.

L'últim teixit a considerar és la mucosa vaginal. En aquest teixit podem veure que el Js i Kp són estadísticament més baixos en la solució CP (3,91 mcg/h i 8,15 cm·h respectivament) que en les CP-NPs (8,89 mcg/h i 18,52 cm·h respectivament). Per tant, la permeació al torrent sanguini és menor a la solució CP. No obstant això, Tl és estadísticament inferior en les CP-NPs (1,75h). Per tant, les CP-NPs arriben a un estat estacionari més ràpid que la solució CP. A més, P2 és estadísticament més alt en CP-NPs (0,99h⁻¹) que en solució CP(0,53h⁻¹). Per tant, la difusió de CP-NPs dins del teixit és millor. Finalment, podem veure que la Qr en les CP-NPs és molt superior (52,81 mcg/cm²/g) que en la solució CP (23,44 mcg/cm²/g). En resum, la quantitat de fàrmac retingut en el teixit vaginal és més alta en CP-NPs i, en última instància, són més segures i efectives.

En conclusió, podem afirmar que les CP-NPs tenen avantatges particulars en aquests 3 teixits. A les mucoses sublinguals, les CP-NP triguen més a penetrar, de manera que romanen més temps al lloc d'acció. A més, les CP-NPs són més segures i eficaces a la mucosa bucal i vaginal. Per tant, les CP-NPs són una bona opció per tractar malalties inflamatòries locals en aquests tres teixits.

Seguidament revisarem les fotos histològiques del segon article. Com s'ha comentat prèviament la part més important a analitzar són les àrees que han estat en contacte amb el fàrmac (Bacha, i cols., 2014 i Zimmerman i cols., 2019). Per tant, ens centrarem en la zona més externa de les mucoses (epiteli queratinitzat pla estratificat i làmina pròpia). A continuació, analitzem els resultats de cada teixit estudiat.

A la mucosa bucal podem veure que la part més externa del teixit i, per tant, la que ha estat més en contacte amb el fàrmac, està intacta en els 3 teixits i, a més, no s'observen canvis cel·lulars. Es pot veure que el gruix de l'epiteli és diferent a cada imatge. Això es deu a la variabilitat individual dels animals i no per canvis estructurals causats pels fàrmacs estudiats.

El teixit mucós sublingual és un teixit molt més muscular que la resta i amb molt més col·lagen. No obstant, és important destacar que la part més externa del teixit i les cèl·lules no presenten alteracions i, per tant, les formulacions no han alterat l'estructura del teixit.

Podem veure que el teixit mucós vaginal presenta les típiques ondulacions i a més, podem observar diferències en el gruix de l'epiteli entre cada imatge degut a les diferents fases del cicle estral. Finalment, cal assenyalar que l'epiteli no s'altera en cap de les 3 imatges.

L'estructura de la còrnia no es veu afectada i l'epiteli i cèl·lules no són alterats per cap formulació estudiada.

La conjuntiva és un teixit molt vascularitzat amb glàndules olioses. Ni l'epiteli ni la làmina pròpia es veuen afectades per cap tractament.

Per últim, podem veure l'estructura de l'escleròtica és similar a la còrnia. L'episclera és la capa més externa i l'estroma està formada per fibres de col·lagen. Cap part estructural de l'escleròtica no es veu afectada per cap tractament farmacològic.

Definitivament, no es van observar canvis estructurals histopatològics o significatius entre les mostres controlades i les tractades. Les cèl·lules epitelials i el teixit connectiu mostren una morfologia i distribució normals en les mostres histològiques analitzades. Aquests resultats suggereixen fermament que la solució CP i CP-NPs no afecten la morfologia, l'organització cel·lular i tissular en el tractament local *in vivo* en l'espècie porcina.

Per últim, hem realitzat un estudi de farmacocinètica del CP en l'espècie porcina per diferents vies d'administració, IV i IM, mitjançant el mètode d'anàlisi LC/MS/MS. Aquest mètode d'anàlisi no s'havia fet servir fins ara per aquest fàrmac en plasma ni per aquesta espècie i per aquest motiu, també l'hem validat.

Gràcies a la resolució de les imatges que es poden veure en aquest article, es pot comprovar que la tècnica d'anàlisi utilitzada és un bon mètode per avaluar la concentració plasmàtica de CP en aquesta espècie. Tots els ionogrames tenen el mateix temps de retenció (1,54 min), pics ben definits i no tenen interferències. A més, aquest mètode té l'avantatge que no requereix una gran quantitat de tractament previ. Per tant, és més ràpid de realitzar (si el comparem amb el mètode HPLC descrit anteriorment) i, per tant, més econòmic.

Els resultats obtinguts es van tractar amb dos mètodes de càlcul de paràmetres: mètode no compartimental i mètode compartimental. Aquests dos mètodes són acceptats per l'EMA quan s'estudia la dosi d'un medicament (Shargel i cols., 1992 i Baggot, 1992).

Les dades de les concentracions plasmàtiques de CP per la via IV es van tractar mitjançant el mètode compartimental. Els 4 perfils de cada ruta són molt similars entre els 4 porcs. Tanmateix, els principals paràmetres farmacocinètics de CP per via IM es van analitzar mitjançant el mètode compartimental. Aquests paràmetres no mostren cap anomalia. Un cop descrits els paràmetres pel mètode compartimental i basant-se en la classificació de Davies i cols., 1993, podem dir que els valors de clearance (Cl, 3,24 mL/min) i volum de distribució (Vdss, 0,35 L/kg) es poden considerar en un rang baix. Tot i així, el temps de vida mitja (HL, 39h es pot considerar molt alt). El Cl baix implica un llarg temps de permanència a l'organisme. Per tant, aquest factor serà beneficiós ja que és capaç de proporcionar les condicions per a una dosificació més llarga durant més temps. A causa del baix Cl, implica un HL més llarg del medicament i, per tant, una constant d'eliminació inferior (Doménech i cols, 2012). La Vdss baixa es pot deure al fet que en altres espècies s'ha descrit que la CP té una alta unió a les proteïnes plasmàtiques (Brentnall i cols., 2012; Lees i cols., 2013 i Mealey i cols., 2004) i això dificulta la seva distribució a l'organisme.

Un cop es van trobar els paràmetres farmacocinètics de CP en plasma porcí mitjançant el mètode compartimental, vam poder realitzar una comparació entre espècies. Per fer-ho, hem buscat els paràmetres farmacocinètics de CP investigats fins ara en gossos, cavalls, gats, conills, ovelles i humans. Com podem veure, a totes les espècies se'ls va administrar una dosi CP de 4 mg/kg de via IV (la mateixa que en el nostre estudi). D'aquesta manera, la comparació entre espècies és més robusta i vàlida. En el nostre cas, ens centrarem en els següents paràmetres: HL, AUC, Vdss, Cl i temps mig de retenció (MRT), ja que són els paràmetres descrits en gairebé totes les espècies estudiades fins ara i, per tant, comparables amb l'espècie porcina.

Com podem veure, l'AUC de CP en porcs és la més alta (648,52 µg·h/mL) i presenta diferències significatives amb gairebé totes les espècies estudiades. Aquest factor és beneficiós per els porcs, ja que una AUC elevada representa més fàrmac sense

canvis a l'organisme i, per tant, pot tenir el seu efecte durant més temps (Doménech i cols, 2012). A més, podem observar que el HL i el MRT de CP als porcs també són molt alts (31,25h i 55,92h respectivament) i el Cl és baix (6,49 mL/Kg/h) en comparació amb altres espècies. Per tant, el medicament roman al cos durant més temps i la seva constant d'eliminació és baixa, cosa que afavoreix que el medicament pugui treballar durant més temps. Finalment, podem observar que el Vdss del fàrmac en les espècies porcines (0,35 L/Kg), tot i que no és molt elevat, és un dels nivells més alts si el comparem amb les altres espècies (només superat en els cavalls). El Vdss representa la distribució d'un medicament a través dels diferents teixits (Shargel i cols., 1992). Per tant, la CP en l'espècie porcina es distribueix millor en els teixits que en altres espècies.

En resum, podem dir que la CP presenta diferències significatives en el seu comportament farmacocinètic respecte a les altres espècies estudiades. En el cas dels porcs, la CP es manté inalterada en l'organisme durant més temps que en altres mamífers i pot dur a terme la seva acció durant més temps. Per tant, podem dir que la CP és un bon candidat per tractar malalties inflamatòries i dolor en els porcs. A més, cal destacar la importància de dur a terme estudis farmacocinètics d'un medicament en diferents espècies, ja que els resultats poden ser molt diferents d'una espècie a l'altra (Baggot, 1992).

En quan a la biodisponibilitat, la corba nivell-temps de l'AUC és una mesura de l'abast de la biodisponibilitat d'un medicament. L'AUC reflecteix la quantitat total de fàrmac actiu que arriba a la circulació sistèmica. En el nostre estudi hem observat que per estimar el valor de l'AUC amb més precisió, seria necessari calcular més punts després de 48h. Per tant, l'estimació del mètode no compartimental és una mica imprecisa. Tot i així, el nostre estudi ha servit com a estudi preliminar per al càlcul de l'AUC de CP en porcs. Suposant que el valor AUC calculat pel mètode no compartimental té un biaix, també hem calculat la biodisponibilitat a partir del valor AUC pel mètode compartimental. En compararlos, hem pogut establir que no s'observen grans diferències i, per tant, el resultat és acceptable.

Per tant, a partir de les AUC trobades en l'administració IV i IM per una única dosi administrada (4 mg/kg), la biodisponibilitat es pot determinar per la via IM en porcs. En aquest cas, la biodisponibilitat de CP en espècies porcines quan s'administra IM és del 64,1%. Cal comentar que la variabilitat és del 18,9%, a priori podria semblar alta, però que es considera normal en els éssers vius (Davit i cols., 2008). Per tant, podem considerar que la biodisponibilitat de la CP és acceptable i la via IM es considera molt adequada per a l'espècie porcina.

A partir de mostres preses a les 48 hores de ronyó i fetge, vam obtenir les quantitats de CP en aquests òrgans al final de l'estudi farmacocinètic. Podem dir que la distribució i la retenció de CP roman homogènia en els dos òrgans

(prèviament s'ha calculat el % de recuperació en els dos teixits estudiats: 97.4 % en fetge i de 83.62% en ronyó). A les 48 hores, encara es conserven quantitats quantificables de CP en ambdós òrgans, ja que encara s'elimina el medicament.

A més, com s'ha comentat prèviament a partir dels nostres estudis hem pogut calcular el HL del CP en el porc (39h). Està descrit que per assegurar-se que no quedi cap traça de fàrmac al cos, cal una purificació de 7-10 semivides (Younan i cols., 2013). Per tant, podem dir que per establir un temps d'espera per el consum de carn porcina hauríem d'esperar un mínim de 15 a 20 dies abans de consumir carn de porc tractada amb CP.

Per últim, hem fet un càlcul de dosis múltiples de CP. Tenint en compte que la via IV té limitacions en la posologia en el tractament dels porcs, ens hem centrat a estudiar una posologia mitjançant la via IM. L'objectiu era trobar el millor interval d'administració en porcs amb una dosi de 4 mg/kg IM per tal d'aconseguir concentracions plasmàtiques dins del rang terapèutic i en el menor temps possible (Lees i cols., 2004). Com que no coneixíem l'interval terapèutic en porcs, vam basar la nostra investigació en estudis realitzats anteriorment en dues espècies: humans (Crevoisier, 1982) i gossos (Clark i cols., 2003). Els intervals d'administració estudiats van ser: 8, 12 i 24 hores. Prenent valors d'entre 15-20 µg/ml com a rang de concentració efectiva, podríem avançar que la millor pauta d'administració del CP en l'espècie porcina és cada 24 hores, ja que la segona dosi arriba a concentracions eficients i manté concentracions beneficioses i segures durant un llarg període de temps.

CONCLUSIÓ

1. Hem aconseguir estudiar el CP com un antiinflamatori adient per l'espècie porcina mitjançant estudis biofarmacèutics i farmacocinètics.
2. Hem validat pel mètode HPLC el Carprofè en mucoses i teixits oculars d'origen porcí i per tant, hem pogut establir tots els paràmetres de permeació intrínseca. Mètode que s'ha establert que és lineal, exacte, precís, específic i amb un LOQ de 0.51. En els teixits oculars, hem pogut establir que l'esclera és el teixit més permeable i els teixits que més retenen són la conjuntiva i esclera. D'altra banda, les mucoses estudiades mostren valors de permeació similars entre ells i més baixos que els teixits oculars. Finalment, el teixit que més fàrmac reté és la mucosa vaginal.
3. Hem determinat els paràmetres de permeació en diferents teixits (mucoses i teixits oculars) tant per NP de CP com en CP solució de fàrmac lliure. En el teixits oculars s'ha demostrat que el teixit on pot ser més eficaç el tractament amb les CP-NPs és la conjuntiva, ja triguen més a penetrar, de manera que romanen més temps en el lloc d'acció. En el cas de les mucoses, la mucosa sublingual és el teixit on les CP-NP triguen més a penetrar, de manera que romanen més temps al lloc d'acció.
4. S'ha determinat les quantitats retingudes en tots els teixits estudiats en l'espècie porcina, així ens permet predir el seu possible efecte terapèutic. S'ha demostrat que en el cas de la còrnia, tot i que les dues formulacions actuen de manera similar, les CP-NPs tenen una millor activitat local i són més segures que el CP en solució. En el cas de les mucoses, les CP-NPs són més segures i eficaces a les mucosa bucal i vaginal. Per tant, les CP-NPs són una bona opció per tractar malalties inflamatòries locals en aquests tres teixits.
5. S'ha establert els nivells plasmàtic que s'assoliran després d'administrar les CP-NPs. Per tant, podem demostrar la seguretat d'aquesta formulació tòpica a l'hora de ser administrada.
6. Els estudis histològics portats a terme per tots els teixits tractats ens han permès assegurar que les dues formulacions (NP i fàrmac lliure) són segures i no danyen l'estructura tissular. Per tant, s'ha assegurat la integritat dels òrgans estudiats.
7. S'ha validat un nou mètode analític mitjançant LC/MS/MS per el CP en plasma porcí. Mètode que s'ha establert que és lineal, exacte, precís i amb una especificitat i amb un LOQ de 0.064ppb (T1) i de 0.199ppb (T2).
8. L'administració del CP per via IM i IV en el porc a dosis 4mg/kg ha estat estudiada per primera vegada. D'aquesta manera hem pogut determinar tots els paràmetres farmacocinètics, especialment la biodisponibilitat en aquesta espècie.
9. Gràcies als paràmetres del model farmacocinètic establert, s'ha proposat un règim posològic per via IM adient a l'espècie porcina (cada 24h).
10. Finalment, s'han estudiat les quantitats retingudes en ronyó i fetge acumulades a les 24 i 48 hores en l'espècie porcina per determinar la seva eliminació en aquests dos teixits.

BIBLIOGRAFIA

A

Alloui, A.; Zimmermann, K.; Mamet, J.; Duprat, F.; Noël, J.; Chemin, J.; Guy, N.; Blondeau, N.; Voilley, N.; Rubat-Coudert, C.; Borsotto, M.; Romey, G.; Heurteaux, C.; Reeh, P.; Eschalier, A.; Lazdunski, M. TREK-1, a K⁺ channel involved in polymodal pain perception. *EMBO J.* **2006**, *25*, 2368–2376.

Aragon, C.L.; Hofmeister, E.H.; Budsberg, S.C. Systematic review of clinical trials of treatments for osteoarthritis in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **2007.**, *230*, 514–521.

Armstrong S.; Tricklebank P.; Lake A.; Freaan S.; Lees P. Pharmacokinetics of Carprofen enantiomers in equine plasma and synovial fluid. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **1999**, *22*, 196-201.

Athar, M.; An, K.P.; Morel, K.D.; Kim, A.L.; Aszterbaum, M.; Longley, J.; Epstein, J.; Bickers, D.R. Ultraviolet B (UVB)-Induced COX-2 Expression in Murine Skin: An Immunohistochemical Study. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *280*, 1042–1047.

B

Bacha, W.J., Jr.; Bacha, L.M. Color Atlas of Veterinary Histology, 3a Edició, pp. 102–149. Wiley & BlackWell: New York, NY, USA, **2012**.

Baggot J. D. Clinical pharmacokinetics in veterinary medicine. *Clin Pharmacokinet.* **1992**, *22(4)*, 254-73.

Bai, R.; Wan, L.; Shi, M. The time-dependent expressions of IL-1 β , COX-2, MCP-1 mRNA in skin wounds of rabbits. *Forensic Sci. Int.* **2008**, *175*, 193–197.

Bamrungsap, S.; Zhao, Z.; Chen, T.; Wang, L.; Li, C.; Fu, T.; Tan, W. Nanotechnology in therapeutics: A focus on nanoparticles as a drug delivery system. *Nanomedicine.* **2012**, *7*, 1953–1971.

Benet LZ.; Bowman CM.; Koleske ML.; Rinaldi CL.; Sodhi JK. Understanding drug-drug interaction and pharmacogenomic changes in pharmacokinetics for metabolized drugs. *J Pharmacokinet Pharmacodyn.* **2019**, *46(2)*, 155-163.

Bergmann, H.M.; Nolte, I.; Kramer, S. Comparison of analgesic efficacy of preoperative or postoperative carprofen with or without preincisional mepivacaine epidural anesthesia in canine pelvic or femoral fracture repair. *Vet. Surg.* **2007**, *36*, 623–632.

Blatteis, C.M.; Li, S.; Li, Z.; Feleder, C.; Perlik, V. Cytokines, PGE2 and endotoxic fever: A re-assessment. *Prostaglandins and Other Lipid Mediat.* **2005**, *76*, 1–18.

Brentnall C.; Cheng Z.; McKellar Q. A.; Lees P. Pharmacokinetic–pharmacodynamic integration and modelling of oxytetracycline administered alone and in combination with Carprofen in calves. *Res. Vet. Sci.* **2013**, *94*(3), 687-94.

Brentnall, C.; Cheng, Z.; McKellar, Q.A.; Lees, P. Influence of oxytetracycline on carprofen pharmacodynamics and pharmacokinetics in calves. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **2012b**, *36*, 320–328.

Brentnall, C.; Cheng, Z.; McKellar, Q.A.; Lees, P. Potency and selectivity of carprofen enantiomers for inhibition of bovine cyclooxygenase in whole blood assays. *Res. Vet. Sci.* **2012a**, *93*, 1387–1392.

Brideau, C.; Van Staden, C.; Chan, C.C. In vitro effects of COX inhibitors in whole blood of horses, dogs, & cats. *Am. J. Vet. Res.* **2001**, *62*, 1755–1760.

Buckman, S.Y.; Gresham, A.; Hale, P.; Hruza, G.; Anast, J.; Masferrer, J.; Pentland, A.P. COX-2 expression is induced by UVB exposure in human skin: implications for the development of skin cancer. *Carcinogenesis*. **1998**, *19*, 723–729.

C

Calpena A. C., Clares B.; Fernandez F. Technological, biopharmaceutical and Pharmacokinetic advances: New formulations of application on the skin and oral mucosa. *Recent Advances in Pharma. Scien.* **2011**, 175-198.

Campbell, N.B.; Jones, S.L.; Blikslager, A.T. The effects of cyclo-oxygenase inhibitors on bile-injured and normal equine colon. *Equine Vet. J.* **2002**, *34*, 493–498.

Carneiro, P.; Morais, S.; Carmo-Pereira, M. Nanomaterials towards Biosensing of Alzheimer's Disease. *Biomarkers. Nanomaterials* **2019**, *9*, 1663.

Carrillo R.; Zavaleta M., Haidee; Alcántara A., Carrillo D.M; Carrillo C.A. La importancia de los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos en la prescripción de antibióticos. *Rev. Fac. Med.* **2013**, *56*(3), 26.

Castellsague, J.; Riera-Guardia, N.; Calingaert, B. Individual NSAIDs and upper gastrointestinal complications: a systematic review and meta-analysis of observational studies (the SOS project). *Drug Saf.* **2012**, *35*(12), 1127-1146.

Chandrasekharan, N. V.; Dai, H., Roos, K.L.T.; Evanson, N.K.; Tomsik, J.; Elton, T.S.; Simmons, D.L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *PNAS USA*. **2002**, *99*, 13926–31.

Chen, F.; Wu, A.; Chen, C. Inclusion complex of carprofen with Hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2003**, *46*, 111–115.

Cheng, Z.; Nolan, A.; Monteiro, A.; Mckellar, Q. Enantioselective pharmacokinetics and cyclo-oxygenase inhibition of carprofen and carprofen enantiomers in sheep. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **2003**, *26*, 391–394.

Clark, T.P.; Chieffo, C.; Huhn, J.C.; Nimz, E.L.; Wang, C.; Boy, M.G. The steady-state pharmacokinetics and bioequivalence of carprofen administered orally and subcutaneously in dogs. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **2003**, *26*, 187–192.

Clifford J.; Woolf, MD. Pain: Moving from Symptom Control toward Mechanism-

Court, M.H., Feline drug metabolism and disposition: pharmacokinetic evidence for species differences and molecular mechanisms. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* **2014**, *43*, 1–20.

Cox, S.R., Liao, S.; Payne-Johnson, M.; Zielinski, R.J.; Stegemann, M.R. Population pharmacokinetics of mavacoxib in osteoarthritic dogs. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **2011**, *34*, 1–11.

Crevoisier C. Pharmacokinetic properties of Carprofen in humans. *Eur. J. Rheumatol. Inflamm.* **1982**, *5(4)*, 492-502.

D

Davies B.; Morris T. Physiological Parameters in Laboratory Animals and Humans. *Pharm. Res.* **1993**, *10*, 1093–1095.

Davit, B. M., Conner, D. P., Fabian-Fritsch, B. *et al.* Highly Variable Drugs: Observations from Bioequivalence Data Submitted to the FDA for New Generic Drug Applications. *AAPS J.* **2008**, *10*, 148–156.

Del Arco, J. Fisiopatología, clasificación y tratamiento farmacológico. *Farmacia Profesional.* **2015**, *29(1)*, 36-43.

Delatour, P., Foot, R., Foster, A.P., Baggot, D., Lees, P., Pharmacodynamics and chiral pharmacokinetics of carprofen in calves. *British Vet. J.* **1996**, *152*, 183–198.

Delavary, B.M.; Van der Veer, W.M.; van Egmond, M.; Niessen, F.B.; Beelen, R.H.J. Macrophages in skin injury and repair. *Immunobiology.* **2011**, *216*, 753–762.

Delves, P.; Martin, S.; Burton, D.; Roitt, I. Roitt Inmunología Fundamentos. 12^a Edició. Part 1 Bases de la Inmunología. Capítol 9: La producció de efectores. Editorial Médica Panamericana. **2014**.

Doménech J., Martínez J. y Plá, J.M. Biofarmacia y Farmacocinética, Volumen II: Biofarmacia, 2^a edició, Madrid: Editorial Síntesis, S.A.; **2001**.

Doménech J.; Martínez J.; Peraire C. Tratado General de Biofarmacio y Farmacocinética. 1ª Edición. Volumen 1, pp. 33-50. Editorial Sintesis. **2012**.

Domínguez-Villegas, V.; Clares-Naveros, B.; García-López, M.L.; Calpena-Campmany, A.C.; Bustos-Zagal, P.; Garduño-Ramírez, M.L. Development and characterization of two nanostructured systems for topical application of flavanones isolated from *Eysenhardtia platycarpa*. *Colloids Surf. B* **2014**, *116*, 183–192.

Donalizio, C.; Barbero, R.; Cuniberti, B.; Vercelli, C.; Casalone, M.; Re, G. Effects of flunixin meglumine and ketoprofen on mediator production in ex vivo and in vitro models of inflammation in healthy dairy cows. *J Vet Pharmacol Ther.* **2013**, *36*, 130–139.

Dubois, R.N.; Abramson, S.B.; Crofford, L.; Gupta, R.A.; Simon, L.S.; van de Putte, L.B.; Lipsky, P.E. Cyclooxygenase in biology and disease. *The FASEB journal.* **1998**, *12*, 1063–1073.

Dürk, T.; Panther, E.; Müller, T.; Sorichter, S.; Ferrari, D.; Pizzirani, C.; Di Virgilio, F.; Myrtek D.; Norgauer, J. and Idzko. M. 5-Hydroxytryptamine modulates cytokine and chemokine production in LPS-primed human monocytes via stimulation of different 5-HTR subtypes. *Intl. Immunol.* **2005**, *17(5)*, 599–606.

Duman E.; Ceylan KC., Akpınar D.; Yücel N.; Ünsal Ş.; Duman S.; Kaya ŞÖ. The effects of steroidal and non-steroidal anti-inflammatory drugs on tracheal wound healing in an experimental rat model. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* **2020**, *30(4)*, 646–651.

Duz, M.; Parkin, T.D.; Cullander, R.M.; Marshall, J.F. Effect of flunixin meglumine and firocoxib on ex vivo cyclooxygenase activity in horses undergoing elective surgery. *Am. J. Vet. Res.* **2015**, *76*, 208–215.

E

Egger C.M.; Love L.; Doherty T. Pain Management in Veterinary Practice 1ª Edició. Secció 1: Introduction and Anatomy, Physiology, and Pathophysiology of Pain. Capítol 1: Introduction: Pain: An Issue of Animal Welfare. Capítol 2: Anatomy, Physiology, and Pathophysiology of Pain (a). Secció 4: Management of Pain in Veterinary Species Capítol 34: Recognition and Treatment of Pain in Pet Pigs (b) Editorial Wiley Blackwell. **2014**.

Elitok, B.; Elitok., O.M. Clinical efficacy of carprofen as an adjunct to the antibacterial treatment of bovine respiratory disease. *J Vet Pharmacol Ther.* **2004**, *27*, 317–320.

EMA (a): Multidisciplinary medicines. The European Medicines Agency's scientific guidelines on nanomedicines help medicine developers prepare marketing authorisation applications for human medicines.

EMA (b): European Medicines Agency (EMA). Guideline on Bioanalytical Method Validation-2011. Available online:

<http://www.ema.europa.eu/docs/enGB/documentlibrary/Scientificguideline/2011/08/WC500109686.pdf/> (accessed on 15 February 2020).

Escobar L.; Nella M.; Regueira T.; Andresen M. Pharmacokinetic considerations in critically ill patients. *Rev Med Chile.* **2012**, *140*, 780-788.

European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare: Recommendations on Dissolution Testing-2018 Version. Available online: <https://www.edqm.eu/sites/default/files/institutional-brochure-edqm.pdf/> (accessed on 15 February 2020).

F

Fainboim, L.; Geffner, J. Introducción a la inmunología humana. 6ª Edición. Capítulo 2. Inmunidad innata. Editorial Médica Panamericana. **2011**.

Fang, Z.Z.; Wang, H.; Cao, Y.F.; Sun, D.X.; Wang, L.X.; Hong, M.; Huang, T.; Chen, J.X.; Zeng, J. Enantioselective inhibition of carprofen towards UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 2B7. *Chirality.* **2015**, *27*, 189–193.

FDA: FDA nanotechnology resources. Guidance for Industry Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology.

Fitzpatrick, F.A. Cyclooxygenase enzymes: Regulation and function. *Curr. Pharm. Des.* **2004**, *10*, 577–588.

Fornai, M.; Antonioli, L.; Colucci, R.; Bernardini, N.; Ghisu, N.; Tuccori, M.; De Giorgio, R.; Del Tacca, M.; Blandizzi, C. Emerging role of cyclooxygenase isoforms in the control of gastrointestinal neuromuscular functions. *Pharmacol. Ther.* **2010**, *125*, 62–78.

Fosslien, E. Biochemistry of cyclooxygenase (COX)-2 inhibitors and molecular pathology of COX-2 in neoplasia. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **2000**, *37*, 431–502.

Frolich, J.C. A classification of NSAIDs according to the relative inhibition of cyclooxygenase isoenzymes. *Trends Pharmacol. Sci.* **1997**, *18*, 30–34.

G

Gabani, B.B.; Kiran, V. Incurred sample reanalysis of cefuroxime in rabbit ocular tissues—A case study. *Biomed. Chromatogr.* **2020**, *34*, e4737.

Galan G.; Torres I. Aplicaciones de la Biofarmacia y Farmacocinética en el desarrollo y control de medicamentos, revista Universitat de Barcelona, març **2012**.

Galey WR; Lonsdale HK; Nacht S. The in vitro permeability of skin and buccal mucosa to selected drugs and tritiated water. *J. Invest. Dermatol.* **1976**; 67(6), 713-717.

Giordano, J. The neurobiology of nociceptive and anti-nociceptive systems. *Pain physician* **2015**, 8, 277–290.

Griswold, D.E.; Adams, J.L. Constitutive cyclooxygenase (COX-1) and inducible cyclooxygenase (COX-2): rationale for selective inhibition and progress to date. *Med. Res. Rev.* **1996**, 16, 181–206.

H

Hamamoto, T.; Yabuki, A.; Yamato, O.; Fujiki, M.; Misumi, K.; Matsumoto, M. Immunohistochemical analysis of cyclooxygenase-2 induction during wound healing in dog skin. *Res. Vet. Sci.* **2009**, 87, 349–354.

Harris, R.C. Cyclooxygenase-2 inhibition and renal physiology. *Am. J. Cardiol.* **2002**, 89, 10D–17D.

Hassam, A.A.; Mansourb M.K.; El Hamakya A.M; Sayed El Ahla R. M.;Orabya N. H. Multifunctional Hybrid Nanomaterials for Sustainable Agri-food and Ecosystems. Nanomaterials and nanocomposite applications in veterinary medicine. Capítol 24. Elsevier. **2020**.

Hata, A.N.; Breyer, R.M. Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacol. Ther.* **2004**, 103, 147–166.

Hawkins M. G.; Taylor I. T.; Craigmill A. L; Tell L. A. Enantioselective pharmacokinetics of racemic Carprofen in New Zealand white rabbits. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **2008**, 31(5), 423-30.

Hernández-Díaz, S.; García-Rodríguez, L.A.Epidemiologic assessment of the safety of conventional nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J. Med.* **2001**, 110(3A), 20S–27S.

Holdcroft, A., Jaggar, S., 2005. Core topics in pain. Cambridge, pp. 3–37/95–121/261–317. **2005**

Huskisson, E.C.; Ghozlan, R.; Kurthen, R.; Degner, F.L.; Bluhmki, E. A long-term study to evaluate the safety and efficacy of meloxicam therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology.* **1996**, 35, 29–34.

I

Iwakawa, S.; Spahn, H.; Benet, L.Z.; Lin, E.T. Stereoselective disposition of carprofen, flunoxaprofen, and naproxen in rats. *Drug Metab. Dispos.* **1991**, *19*, 853–857.

J

Jackson, L.M.; Wu, K.; Mahida, Y.R.; Jenkins, D.; Donnelly, M.T.; Hawkey, L.C.J. Cox-1 expression in human gastric mucosa infected with helicobacter pylori: Constitutive or induced? *Gut.* **2000**, *47*, 762–770.

Jiang, D.; Zou, J.; Huang, L.; Shi, Q.; Zhu, X.; Wang, G.; Yang, H. Efficacy of intra-articular injection of celecoxib in a rabbit model of osteoarthritis. *Int. J. Mol. Sci.* **2010**, *11*, 4106–4113.

Jiao, H.; Wachsmuth, L.; Kumari, S. Z-nucleic-acid sensing triggers ZBP1-dependent necroptosis and inflammation. *Nature.* **2020**, *580*, 391–395.

K

Kamoun A.; de Reyniès A.; Allory Y., Sjö Dahl G.; Robertson AG.; Seiler R.; Hoadley KA., Groeneveld CS., Al-Ahmadie H.; Choi W.; Castro MAA.; Fontugne J.; Eriksson P.; Mo Q.; Kardos J.; Zlotta A.; Hartmann A.; Dinney CP., Bellmunt J.; Powles T.; Malats N.; Chan KS.; Kim WY; McConkey DJ.; Black PC., Dyrskjø t L.; Höglund M.; Lerner SP.; Real FX.; Radvanyi F. Bladder Cancer Molecular Taxonomy Group. A Consensus Molecular Classification of Muscle-invasive Bladder Cancer. *Eur Urol.* **2020**, *4*, 420–433.

Kargman, S.; Charleson, S.; Cartwright, M.; Frank, J.; Riendeau, D.; Mancini, J.; O'Neill, G. Characterization of prostaglandin G/H synthase 1 and 2 in rat, dog, monkey, and human gastrointestinal tracts. *Gastroenterology.* **1996**, *111*, 445–454.

Karol, A.M. Nonsteroidal anti-inflammatory analgesics in pain management in dogs and cats. *Can. Vet. J.* **1996**, *37*, 539–543.

Karrasch, T.; Steinbrecher, K.A.; Allard, B.; Baldwin, A.S.; Jobin, C. Wound-induced p38MAPK-dependent histone H3 phosphorylation correlates with increased COX-2 expression in enterocytes. *J. Cell Physiol.* **2006**, *207*, 809–815.

Katz D.F.; Yuan A.; Gao Y. Vaginal drug distribution modeling. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *92*, 2–13.

Kaufmann, W.E.; Andreasson, K.I.; Isakson, P.C.; Worley, P.F. Cyclooxygenases and the central nervous system. *Prostaglandins.* **1997**, *54*, 601–624.

Kerr, A.C.; Muller, F.; Ferguson, J.; Dawe, R.S.; Kerr, A.C. Occupational carprofen photoallergic contact dermatitis. *Contact Dermatitis and Allergy*. **2008**, *159*, 1303–1308.

Kim, S.J.; Flach, A.J.; Jampol, L.M. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in ophthalmology. *Surv. Ophthalmol.* **2010**, *55*, 108–133.

Kömhoff, M.; Jeck, N.D.; Seyberth, H.W., Gröne, H.J.; Nüsing, R.M.; Breyer, M.D. Cyclooxygenase-2 expression is associated with the renal macula densa of patients with Bartter-like syndrome. *Kidney international*. **2000**, *58*, 2420–2424.

Kritas S.K; G. Ronconi G.; Caraffa A.; Gallenga C.E.; Ross R.; Conti P. Mast cells contribute to coronavirus-induced inflammation: new anti-inflammatory strategy. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*. **2020**, *34(1)*, 9-14.

Krohne, S.G.; Blair, M.J.; Bingaman, D.; Gionfriddo, J.R. Carprofen inhibition of flare in the dog measured by laser flare photometry. *Vet. Ophthalmol.* **1998**, *1*, 81–84.

Kuehl, G.E.; Lampe, J.W.; Potter, J.D.; Bigler, J. Glucuronidation of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: identifying the enzymes responsible in human liver microsomes. *Drug Metab. Dispos.* **2005**, *33*, 1027–1035.

L

Lam, J.K.W.; Xu, Y.; Xu, Y.; Worsley, A.; Wong, I.C.K. Oral transmucosal drug delivery for pediatric use. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, *73*, 50–62.

Langenbach, R.; Loftin, C.; Lee, C.; Tiano, H. Cyclooxygenase knockout mice. *Biochem. Pharmacol.* **2002**, *58*, 1237–1246.

Langenbach, R.; Morham, S.G.; Tiano, H.F.; Loftin, C.D.; Ghanayem, B.I.; Chulada, P.C.; Smithies, O. Prostaglandin synthase 1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric ulceration. *Cell*. **1995**, *83*, 483–492.

Langford, R.M.; Mehta, V. Selective cyclooxygenase inhibition: its role in pain and anaesthesia. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. **2006**, *60*, 323–328.

Larsen, C.; Østergaard, J.; Larsen, S.W.; Jensen, H.; Jacobsen, S.; Lindegaard, C.; Andersen, P.H. Intra-articular depot formulation principles: Role in the management of postoperative pain and arthritic disorders. *J. Pharm. Sci.* **2008**, *97*, 4622–4654.

Lees P.; Aliabadi F. S.; Landoni M. F. Pharmacodynamics and enantioselective pharmacokinetics of racemic Carprofen in the horse. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **2003**, *25(6)*, 433-48.

Lees P.; Landoni M. F.; Giraudel J.; Toutain P. L. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in species of veterinary interest. *J. vet. Pharmacol. Therap.* **2004**, *27*, 479–490.

Leong, J.; Hughes-Fulford, M.; Rakhlin, N.; Habib, A.; Maclouf, J.; Goldyne, M.E. Cyclooxygenases in human and mouse skin and cultured human keratinocytes: association of COX-2 expression with human keratinocyte differentiation. *Exp.Cell Res.* **1996**, *224*, 79–87.

Lindstrom, R.; Kim, T. Ocular permeation and inhibition of retinal inflammation: An examination of data and expert opinion on the clinical utility of nepafenac. *Curr. Med. Res. Opin.* **2006**, *22*, 397–404.

Li T, Bao Q, Shen J, Lalla RV, Burgess DJ. Mucoadhesive in situ forming gel for oral mucositis pain control. *Int J Pharm.* 2020, 580:119238.

Lohuis, J.A.; van Werven, T.; Brand, A.; van Miert, A.S.; Rohde, E.; Ludwig, B.; Heizmann, P.; Rehm, W.F.. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of carprofen, a non-steroidal anti-inflammatory drug, in healthy cows and cows with *Escherichia coli* endotoxin-induced mastitis. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **1991**, *14*, 219–229.

Luna SPL.; de Araújo AL., da Nóbrega Neto PI.; Brondani JT., de Oliveira FA.; Azerêdo LMDS.; Telles FG.; Trindade PHE. Validation of the UNESP-Botucatu pig composite acute pain scale (UPAPS). *PLoS One.* **2020**, *15*(6):e0233552.

Luong, C.; Miller, A.; Barnett, J.; Chow, J.; Ramesha, C.; Browner, M.F. Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2. *Nat. Struct. Biol.* **1996**, *3*, 927–933.

M

Machado R.; Palmeira-de-Oliveira A.; Gaspar C.; Martinez-de Oliveira J.; Palmeira-de-Oliveira R. Studies and methodologies on vaginal drug permeation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2015**, *92*, 14-26.

Main, I.H.M.; Whittle, B.J.R. The effects of E and A prostaglandins on gastric mucosal blood flow and acid secretion in the rat. *Br. J. Pharmacol.* **1973**, *49*, 428–436.

Maire-Gauthier, T.; Buronfosse, T.; Magdalou, J.; Herber, R.; Besse, S.; Delatour, P.; Benoit, E. Species-dependent enantioselective glucuronidation of carprofen. *Xenobiotica.* **1998**, *28*, 595–604.

Martín J.; Orellana J.A. Ciencia y tecnología en experimentación y protección animal 1ª Edició. Capítol 1: La ciencia del animal de laboratorio y el procedimiento experimental. Editorial Solana e hijos, A.G., S.A.U. **2016**.

McCarberg B.; Gibofsky A. Need to develop new nonsteroidal anti-inflammatory drug formulations. *Clin Ther.* **2012**, *34(9)*,1954- 1963.

McKellar Q. A.; Bogan J.A.; von Fellenberg R.L.; Ludwig B.; Cawley G.D. Pharmacokinetic, biochemical and tolerance studies on carprofen in the horse. *Equine Vet J.* **2002**, *23(4)*, 280-4

Mealey K. L.; Matthews N. S.; Peck K. E.; Burchfield M. L.; Bennett B. S.; Taylor T. S. Pharmacokinetics of R(-) and S(+) Carprofen after administration of racemic Carprofen in donkeys and horses. *Am. J. Vet. Res.* **2004**, *65(11)*, 1479-82.

Menduni, F.; Davies, L.N.; Madrid-Costa, D.; Fratini, A.; Wol_sohn, J.S. Characterisation of the porcine eyeball as an in-vitro model for dry eye. *Contact Lens Anterio.* **2018**, *41*, 13-17.

Messenger K. M.; J. A.; Papich M. G. Carprofen pharmacokinetics in plasma and in control and inflamed canine tissue fluid using in vivo ultrafiltration. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **2016**, *39(1)*, 32-9.

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA). El sector de la carne porcina en cifras. Principales indicadores económicos 2019. **2020**.

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA). Guía de buenas prácticas para el manejo de cerdas gestantes en grupos y para la protección de los cerdos destinados a cría y engorde. **2012**.

Mitchell, J.A.; Akarasereenont, P.; Thiemermann, C.; Flower, R.J.; Vane, J.R. Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *PNAS USA.* **1993**, *90*, 11693-11697.

Morita, I. Distinct functions of COX-1 and COX-2. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators.* **2002**, *68-69*, 165-175.

Moses, V.S.; Bertone, A.L.; Nonsteroidal anti-inflammatory drugs. The Veterinary clinics of North America. *Equine practice.* **2002**, *18*, 21-37.

Murison, P.J.; Jones, A.; Mitchard, L.; Burt, R.,&Birchall, M.A. Development of perioperative care for pigs undergoing laryngeal transplantation: a case series. *Laboratory Animals.* **2009**, *43*, 338-343.

O

Olsen, T.W.; Sanderson, S.; Feng, X.; Hubbard,W.C. Porcine Sclera: Thickness and surface area. *Inv. Ophthalm. Vis. Sci.* **2002**, *43*, 2529-2532.

P

Parente, L., Perretti, M. Advances in the pathophysiology of constitutive and inducible cyclooxygenases: two enzymes in the spotlight. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *65*, 153–159.

Park, B.K.; Heo, M.Y.; Park, H.; Kim, H.P. Inhibition of TPA-induced cyclooxygenase-2 expression and skin inflammation in mice by wogonin, a plant flavone from *Scutellaria radix*. *Eur. J. Pharmacol.* **2001**, *425*, 153–157.

Parra, A.; Mallandrich, M.; Clares, B.; Egea, M.A.; Espina, M.; García, M.L.; Calpena, A.C. Design and elaboration of freeze-dried PLGA nanoparticles for the transcorneal permeation of carprofen: Ocular anti-inflammatory applications. *Colloids Surf B Biointerfaces.* **2015**, *136*, 935–943.

Pasinetti, G.M. Cyclooxygenase and Alzheimer's disease: implications for preventive initiatives to slow the progression of clinical dementia. *Archives of 192 Gerontology and Geriatrics.* **2001**, *33*, 13–28.

Patel, M.J.; Stockfleth, E. Does progression from actinic keratosis and Bowen's disease end with treatment: Diclofenac 3% gel, an old drug in a new environment? *Br J Dermatol.* **2007**, *156*, 53–56.

Payne-Johnson, M.; Becskei, C.; Chaudhry, Y.; Stegemann, M.R. Comparative efficacy and safety of mavacoxib and carprofen in the treatment of canine osteoarthritis. *Vet. Rec.* **2014**, *176(11)*, 1-6.

Pinard, C.L., Gauvin, D., Moreau, M., Martel-pelletier, J., Pelletier, J., Troncy, E. Measurements of canine aqueous humor inflammatory mediators and the effect of carprofen following anterior chamber paracentesis. *Vet. Ophthalmol.* **2011**, *14*, 296–303.

Pires, I.; Garcia, A.; Prada, J.; Queiroga, F.L. COX-1 and COX-2 expression in canine cutaneous, oral and ocular melanocytic tumours. *J. Comp. Pathol.* **2010**, *143*, 142–149.

Plaghki L.; Mouraux A.; Bars D.Le. Fisiología del dolor. *EMC-Medicina Física.* **2018**, *39(1)*, 1-22.

Praveen, P.N.; Knaus, E.E. Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **2008**, *11*, 81–110.

Pradilla O.E. Ciclooxygenasa 3: La nueva iso-enzima en la familia. *Med. UNAB.* **2004**, *7(21)*, 181-184.

R

Raber, A.S.; Mittal, A.; Schäfer, J.; Bakowsky, U.; Reichrath, J.; Vogt, T.; Schaefer, U.F.; Hansen, S.; Lehr, C.M. Quantification of nanoparticle uptake into hair follicles in pig ear and human forearm. *J. Control. Release.* **2014**, *179*, 25–32.

Rainsford. K.D.; Path. M.R.C. Aspirin and the salicylates. Chapter 1: History and development of the salicylates. Butterworth & Co. (Publishers) Ltd., Published by Elsevier Ltd. **1984**.

Rang, H., Dale, M., Ritter, J., Moore, P., Pharmacology. 9^a Edició. Pàgines 209–241. Editorial Elsevier. **2004**.

Ray, J.E.; Wade, D.N.; Graham, G.G.; Day, R.O. Pharmacokinetics of carprofen in plasma and synovial fluid. *J. Clin. Pharmacol.* **1979**, *19*, 635–643.

Riccardi, C.; Levi-schaffer, F.; Tiligada, E. Immunopharmacology and Inflammation. 1^a Edició. Switzerland. Springer International Publishing AG, part of Springer Nature **2018**.

Ricketts, A.P.; Lundy, K.M.; Seibel, S.B. Evaluation of selective inhibition of canine cyclooxygenase 1 and 2 by carprofen and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am. J. Vet. Res.* **1998**, *59*, 1441–1446.

Robert, A.; Nezamis, J.E.; Lancaster, C.; Hanchar, A.J. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl, and thermal injury. *Gastroenterology.* **1979**, *77*, 433–443.

Rodriguez IC; Cerezo A; Salem II. Sistemas de liberación bioadhesivos. *Ars Pharm.* **2000**, *41(1)*, 115-128.

Ruel HLM; Watanabe R.; Evangelista MC.; Beauchamp G.; Auger JP.; Segura M.; Steagall PV. Pain burden, sensory profile and inflammatory cytokines of dogs with naturally-occurring neuropathic pain treated with gabapentin alone or with meloxicam. *PLoS One.* **2020**, *15(11)*:e0237121.

S

Samad, T.A.; Sapirstein, A.; Woolf, C.J. Prostanoids and pain: unraveling mechanisms and revealing therapeutic targets. *Trends. Mol. Med.* **2002**, *8*, 390–396.

Sanchez, I.; Martin, R.; Ussa, F.; Fernandez-Bueno, I. The parameters of the porcine eyeball. *Graefe's Arch. Exper. Ophthalm.* **2011**, *249*, 475–482.

Sandelin, J.; Harilainen, A.; Crone, H.; Hamberg, P.; Forsskåhl, B.; Tamelander, G. Local NSAID gel (eltenac) in the treatment of osteoarthritis of the knee. A double blind study comparing eltenac with oral diclofenac and placebo gel. *Scand. J. Rheumatol.* **1997**, *26*, 287–292.

Sanderson, R.O., Beata, C., Flipo, R.-M., Genevois, J.-P., Macias, C., Tacke, S., Vezzoni, A., Innes, J.F., Systematic review of the management of canine osteoarthritis. *Vet. Rec.* **2009**, *164*, 418–424.

Schneider, A.; Zhang, Y.; Zhang, M.; Lu, W.J.; Rao, R.; Fan, X., Redh, R., Davis, L.; Breyer, R.M.; Harris, R.; Guan, Y.; Breyer, M.D. Membrane-associated PGE synthase-1 (mPGES-1) is coexpressed with both COX-1 and COX-2 in the kidney. *Kidney International.* **2004**, *65*, 1205–1213.

Schwab, J.M.; Brechtel, K.; Nguyen, T.D.; Schluesener, H.J. Persistent accumulation of cyclooxygenase-1 (COX-1) expressing microglia/macrophages and upregulation by endothelium following spinal cord injury. *J. Neuroimmunol.* **2000**, *111*, 122–130.

Schwab, J.M.; Seid, K.; Schluesener, H.J., Traumatic brain injury induces prolonged accumulation of cyclooxygenase-1 expressing microglia/brain macrophages in rats. *J. Neurotrauma.* **2001**, *18*, 881–890.

Shargel L.; Yu A. B. C. *Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics.* 3^a Edició, pp. 193-203. Editorials Connecticut, United States of America, **1992**.

Sidler, M.; Fouché, N.; Meth, I.; von Hahn, F.; von Rechenberg, B.; Kronen, P.W. Transcutaneous treatment with vetdrop(®) sustains the adjacent cartilage in a microfracturing joint defect model in sheep. *Open Orthop. J.* **2013**, *7*, 57–66.

Simmons, D.L.; Regina, M.B.; Hla, T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol. Rev.* **2004**, *56*, 387–437.

Singh, P.; Roberts, M.S. Skin permeability and local tissue concentrations of nonsteroidal anti-inflammatory drugs after topical application. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1994**, *268*, 144–151.

Smith, W.L.; DeWitt, D.L.; Garavito, M.R., Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 145–182.

Soehnlein, O.; Lindbom, L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **2010**, *10*, 427–439.

Sorenmo, K.U.; Goldschmidt, M.H., Shofer; F.S., Goldkamp, C.; Ferracone, J. Evaluation of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 expression and the effect of cyclooxygenase inhibitors in canine prostatic carcinoma. *Vet. Comp. Oncol.* **2004**, *2*, 13–23.

Soslow, R.A.; Dannenberg, A.J.; Rush, D.; Woerner, B.M.; Nasir Khan, K.; Masferrer, J.; Koki, A.T. COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors. *Cancer.* **2000**, *89*, 2637–2645.

Specific Pharmacologic Management. Physiology in medicine: a series of articles

Streppa, H.K.; Jones, C.J.; Budsberg, S.C. Cyclooxygenase selectivity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in canine blood. *Am. J. Vet. Res.* **2002**, *63*, 91–94.

T

Taylor P. M.; Delatour P.; Landoni F. M.; Deal C.; Pickett C.; Aliabadi F. S.; Foot R.; Lees P. Pharmacodynamics and enantioselective pharmacokinetics of Carprofen in the cat. *Res. Vet. Sci.* **1996**, *60*(2), 144-51.

Theoharides, T. C.; Alysandratos, K.; Angelidou, A.; Delivanis, D.; Sismanopoulos, N.; Zhang, B.; Asadi, S.; Vasiadi, M.; Weng, Z.; Miniati, A. and Kalogeromitros, D. Mast cells and inflammation. *Biochim. et Biophys. Acta.* **2012**, *1822*, 21–33.

Tortora, G. J.; Derrickson, B. Principios de anatomía y fisiología. Capítulo 22: Inmunidad innata. 11ª Edició. Buenos Aires. Editorial Medica Panamericana. **2010**.

Turini, M.E.; Dubois, R.N. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target. *Annu. Rev. Med.* **2002**, *53*, 35–57.

V

Vane, J.R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature: New Biol.* **1971**, *231*, 232–235.

Vangroenweghe, F.; Duchateau, L.; Boutet, P.; Lekeux, P.; Rainard, P.; Paape, M.J.; Burvenich, C. Effect of carprofen treatment following experimentally induced Escherichia coli mastitis in primiparous cows. *Int. J. Dairy Sci.* **2005**, *88*, 2361–2376.

W

Washington. N; Washington.C; Wilson. C.G. Physiological Pharmaceutics. 2ª Edició, pp. 37-58 Editorial Taylor and Francis,

Welsh, E.M.; Baxter, P.; Nolan, A.M. Pharmacokinetics of carprofen administered intravenously to sheep. *Res. Vet. Sci.* **1992**, *53*, 264–266.

Williams, P.; Baninster, L.H.; Ferguson, M.W.; Berry, M.; Collins, P.; Dyson, M. Gray's anatomy. 3ª Edició, pp. 375–412/1353–1366. Editorial Elsevier. **1995**.

Wilson, D.E.; Phillips, C.; Levine, R.A. Inhibition of gastric secretion in man by prostaglandin A1. *Gastroenterology.* **1971**, *61*, 201–206.

Wongrakpanich S, Wongrakpanich A, Melhado K, Rangaswami J. A Comprehensive Review of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug Use in The Elderly. *Aging Dis.* **2018**, *19*(1), 143-150.

X

Xie, W.L.; Chipman, J.G.; Robertson, D.L.; Erikson, R.L.; Simmons, D.L. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *PNAS*. **1991**, *88*, 2692–2696.

Y

Yasojima, K.; Schwab, C.; McGeer, E.G.; McGeer, P.L. Distribution of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 mRNAs and proteins in human brain and peripheral organs. *Brain research*. **1999**, *830*, 226–236.

Younan M.; Atkinson T. J.; Fundin J. A Practical Approach to Discontinuing NSAID Therapy Prior to a Procedure. *PPM*. **2013**, *13 (10)*, 45-51.

Yü, T. F.; Perel, J. Pharmacokinetic and Clinical Studies of Carprofen in Gout. *J. Clin. Pharmacol*. **1980**, *20(5-6)*, 347-351.

Z

Zimmerman J.J.; Karriker L. A.; Ramirez A.; Schwartz K. J.; Stevenson F. W.; Zhang J. Diseases of Swine. Edición 11. Section 1: Behavior and Welfare. Editorial Wiley Blackwell. **2019**.

Zizzadoro, C.; Caruso, M.; Putignano, C.; Crescenzo, G.; Ormas, P.; Belloli, C. Effects of endotoxin and influence of cyclooxygenase-2 on β -adrenergic mediated relaxation in isolated equine digital artery. *Vet. J*. **2011**, *190*, 48–53.

Yan-Feng Zhang Y.F.; Sun C.C.; Duan J.; Yang H.H; Zhang C.Y.; Xiong J.B.; Zhong W.J; Cheng Zu, Guan X.X; Jiang H.L.; Hammock B.D; Hwang S.H.; Yong Zhou, Guan C.X.A COX-2/sEH dual inhibitor PTUPB ameliorates cecal ligation and puncture-induced sepsis in mice via anti-inflammation and anti-oxidative stress, *Biomedicine & Pharmacotherap*. **2020**, *126*, 109907.

