

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA



MÁSTER: CONDICIONANTES GENÉTICOS, AMBIENTALES Y NUTRICIONALES PARA EL DESARROLLO Y CRECIMIENTO.

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER:

Patrón de presión arterial obtenida mediante monitorización ambulatoria de la presión arterial (MAPA) y momento de administración del tratamiento sustitutivo con dexametasona en un paciente con hiperplasia suprarrenal congénita.

Director: Domingo Gonzalez-Lamuño Leguina

Autor: Sergio Cazcarra Bellostas

Santander, 2018



Agradecimientos.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis padres todo el esfuerzo que han realizado para que yo haya podido llegar aquí. Ellos me han inculcado valores muy importantes que me han ayudado a superarme cada día. Así pues, gracias a la confianza depositada en mí soy lo que soy ahora.

Agradecer también la labor de Teresa Amigo por haberme dado la oportunidad de estar en su laboratorio y empaparme de todo su conocimiento. Ha sido una persona que me ha ayudado muchísimo en el Máster y solo tengo palabras de gratitud. Por último, hay que destacar que es una gran profesional que ama lo que hace.

Por otro lado, agradecer a otro gran profesional de la sanidad y docencia, como es Domingo González, que se esfuerza enormemente cada día para mejorar la vida de sus pacientes y transmitir conocimiento de gran calidad a sus alumnos. Todo lo que he aprendido este año sobre la Hiperplasia Suprarrenal Congénita y enfermedades metabólicas se lo debo a él.

Índice

1. Resumen.....	4
2. Introducción.....	7
2.1. Hiperplasia Suprarrenal Congénita.....	8
2.2. Ritmos circadianos.....	9
2.3. Tratamiento esteroideo.....	10
2.4. Farmacocinética.....	11
2.5. Biomarcadores.....	11
2.6. Hipertensión en pacientes con HSC.....	12
3. Hipótesis y Objetivos.....	18
4. Material y Métodos.....	20
5. Resultados.....	22
6. Discusión.....	24
7. Conclusiones.....	29
8. Bibliografía.....	30

TITULO: Patrón de presión arterial obtenida mediante Monitorización ambulatoria de la presión arterial (MAPA) y momento de administración del tratamiento sustitutivo con dexametasona en un paciente con hiperplasia suprarrenal congénita.

1.- RESUMEN

Existe una falta de consenso en relación a la pauta de administración del tratamiento glucocorticoide oral en los pacientes con hiperplasia suprarrenal congénita (HSC). En los tratamientos corticoideos crónicos, el objetivo es minimizar la dosis y adecuarla a los ritmos fisiológicos de secreción de cortisol. Tanto el exceso de glucocorticoides exógenos como el exceso de ACTH por una supresión inadecuada, pueden asociarse a cambios clínicos, bioquímicos, hormonales, de la densidad mineral ósea o de las cifras de presión arterial con el consiguiente aumento de riesgo de deshidratación, endocrino-metabólico, óseo o cardiovascular. En este trabajo hemos estudiado en un paciente con HSC si la monitorización ambulatoria de la presión arterial (MAPA) se modifica con la hora de administración del tratamiento con dexametasona oral.

El estudio es un ensayo cruzado (*cross-over*) en un único sujeto en el que se realiza de forma simultánea un estudio analítico y de MAPA en la situación habitual (ingesta de dexametasona nocturna) y posteriormente tomando el mismo preparado y a la misma dosis pero a primera hora de la mañana. Ambos periodos se llevan a cabo tras una fase de blanqueo de 3 semanas para asegurar la desaparición de los efectos del tratamiento en los diferentes horarios.

Observamos que en este paciente con HSC sin déficit de aldosterona, la pauta nocturna y a dosis bajas de dexametasona es eficaz a la hora de controlar la ACTH y no presenta hipertensión arterial en el MAPA. El paciente presenta además un patrón dipper nocturno normal (descenso nocturno de los valores de presión arterial). Sin embargo, aunque con una pauta más adecuado con el ritmo fisiológico de liberación de cortisol endógeno, la administración de la misma dosis de dexametasona a primera hora de la mañana no consigue controlar los niveles de ACTH y el paciente presenta una hipertensión arterial con potencial

significado clínico asociado a un elevado índice aldosterona/actividad de renina (IAR) característico del exceso de mineralocorticoides (hiperaldosteronismo).

Concluimos que la monitorización ambulatoria de la presión arterial es una herramienta potencialmente útil para optimizar la pauta de tratamiento esteroideo en pacientes con HSC.

TITLE: Blood pressure pattern obtained by ambulatory blood pressure monitoring (ABPM) and time of administration of dexamethasone replacement therapy in a patient with congenital adrenal hyperplasia

There is a lack of consensus regarding the administration regimen of oral glucocorticoid treatment in patients with congenital adrenal hyperplasia (CAH). In chronic corticosteroid treatments, the objective is to minimize the dose and adapt it to the physiological rhythms of cortisol secretion. Both the excess of exogenous glucocorticoids and the excess of ACTH due to inadequate suppression can be associated with clinical, biochemical, hormonal changes in bone mineral density or blood pressure figures, with the consequent increased risk of dehydration, endocrine-metabolic, bone or cardiovascular. In this work we have studied in a patient with HSC if the ambulatory blood pressure monitoring (ABPM) is modified with the time of administration of the treatment with oral dexamethasone.

The study is a cross-over trial in a single subject in which an analytical and ABPM study is performed simultaneously in the usual situation (nocturnal dexamethasone intake) and subsequently taking the same preparation and at the same dose but at first hour of the morning. Both periods are carried out after a 3-week laundering phase to ensure the disappearance of the effects of the treatment in the different schedules.

We observed that in this patient with HSC without aldosterone deficiency, the nocturnal and low dose dexamethasone regimen is effective in controlling ACTH and does not present arterial hypertension in ABPM. The patient also has a normal nocturnal dipper pattern (nocturnal decrease in blood pressure values).

However, although with a more adequate pattern with the physiological rate of endogenous cortisol release, administration of the same dose of dexamethasone in the early morning does not control ACTH levels and the patient has high blood pressure with potential significance associated with a high aldosterone / renin activity (RAI) characteristic of mineralocorticoid excesses (hyperaldosteronism). We conclude that ambulatory blood pressure monitoring is a potentially useful tool to optimize the steroid treatment regimen in patients with HSC.

2.- INTRODUCCIÓN

Los pacientes con Hiperplasia Suprarrenal Congénita (HSC) requieren ser tratados con glucocorticoides de forma crónica, cada día y durante toda su vida. Como en todos los tratamientos crónicos, es especialmente significativo evitar posibles efectos secundarios en la salud cardiovascular, que es uno de los grandes riesgos a los que se exponen estas personas.

Los pacientes que padecen esta enfermedad son controlados mediante monitorización de marcadores hormonales y bioquímicos que incluyen la hormona adrenocorticotropa (ACTH), aldosterona, renina, actividad de renina, índice aldosterona/actividad de renina, sodio en orina y sangre, y potasio en orina y sangre.

A pesar de disponer de estos biomarcadores, no existe consenso sobre el tipo de corticoide, dosis o pauta de administración. En este sentido, existen diferentes propuestas de búsqueda de un marcador capaz de monitorizar los efectos de una adecuada administración de los esteroides, con la finalidad de determinar la dosis adecuada, la hora de ingesta y el tipo de glucocorticoide que se utiliza. Además de ser sensible y específico, el marcador candidato debe permitirnos observar resultados significativos en cuestión de muy poco tiempo. La densitometría mineral ósea (DMO) es un marcador que monitoriza la administración de corticoides, pero tiene el inconveniente de que se tarda mucho tiempo en ver resultados. Puesto que si comparamos dos DMO del mismo paciente se necesitarían varios años entre una y otra para poder contrastar.

Habida cuenta con los cambios en las cifras de presión arterial asociados a la ingesta de sodio, la acción de los mineralocorticoides y el tratamiento crónico con esteroides con acción mineralocorticoidea, consideramos que la monitorización ambulatoria de la presión arterial (MAPA) puede ser de utilidad en el control de ciertas variables asociadas al tratamiento esteroideo crónico. En este trabajo de investigación pretendemos determinar si mediante el procedimiento de monitorización ambulatoria de la presión arterial (MAPA) podemos identificar cambios ligados al momento de administración del

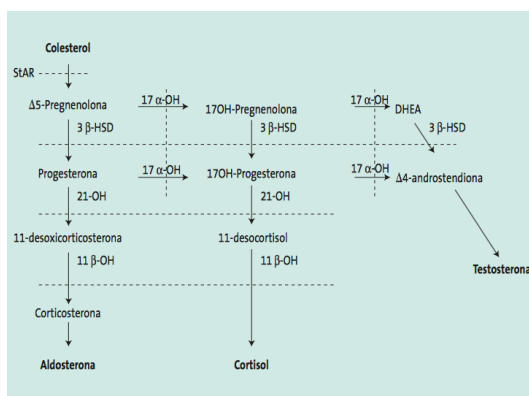
tratamiento esteroideo en un corto periodo de tiempo (3 semanas). Entre las virtudes del método destacamos que es económico, y no-invasivo

La determinación de las cifras de presión arterial mediante monitorización continua pueden tener utilidad en la optimización de tratamiento esteroideo de los pacientes con HSC. Tanto el exceso de glucocorticoides exógenos como el exceso de ACTH por una supresión inadecuada pueden asociarse a cambios en los patrones de presión arterial con el consiguiente aumento de riesgo cardiovascular.

2.1 Hiperplasia Suprarrenal Congénita.

La Hiperplasia Suprarrenal Congénita (HSC) es una enfermedad genética mendeliana que se hereda de forma autosómica recesiva, y afecta a las glándulas suprarrenales. Es ahí donde tiene lugar la producción de las hormonas cortisol, aldosterona y testosterona a través de las rutas glucocorticoides, mineralocorticoides, y andrógenos respectivamente, tomando como precursor el colesterol. En cada una de estas rutas se encuentra una serie de enzimas encargadas de obtener estos esteroides.

Figura 1. Esteroidogénesis suprarrenal¹.



El problema de esta enfermedad reside en que la síntesis de estas hormonas se ve alterada de manera total o parcial por el bloqueo enzimático de estas rutas, en función de cual sea la enzima deficiente. Entre las distintas formas de la HSC se encuentra la deficiencia de la enzima 11 β -hidroxilasa (11 β -OH) que va a ser

objeto de estudio en esta investigación. Estos pacientes requieren la ingesta de glucocorticoides exógena puesto que no son capaces de sintetizar de forma innata cortisol (**ver Figura 1**). Dependiendo de la mutación, existe una producción de aldosterona variable.

2.2 Ritmos circadianos.

De forma fisiológica, en sujetos sanos el pico de cortisol alcanza su máximo en torno a las 8 de la mañana, como mostramos en la **figura 2**. Desde el punto de vista teórico, con la administración de glucocorticoides por la noche no se podría imitar el pico de cortisol matutino, lo cual puede tener cierto impacto en pacientes que reciben corticoides exógenos de forma crónica. De acuerdo a los ritmos circadianos de producción de cortisol endógena, si se administrase el fármaco en las primeras horas de la madrugada (por ejemplo, a las 5:30 de la mañana) se conseguirían dos objetivos: 1) supresión de la elevación de la hormona ACTH que se incrementa considerablemente a partir de las 5:30, 2) imitar el ritmo circadiano del cortisol, obteniendo un pico máximo de esta hormona a las 8 de la mañana, como sucede en individuos sanos.

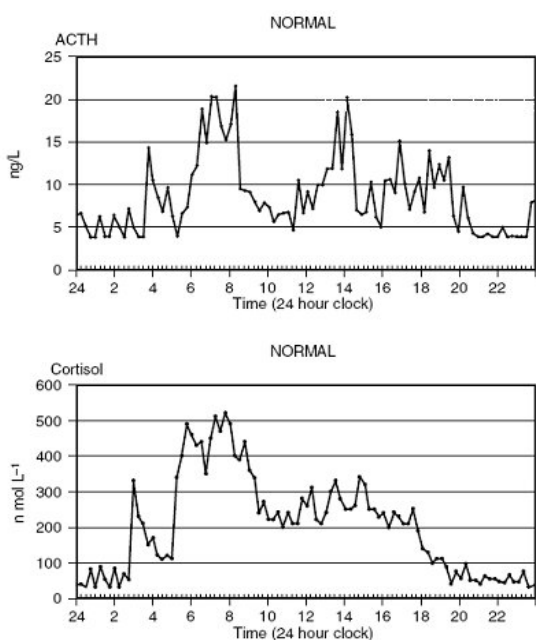


Figura 2. Ritmo circadiano del Cortisol y ACTH en sujetos sanos.

El ritmo circadiano de la ACTH posee un pico máximo entre las 6-8 de la mañana, por lo que para reducir niveles altos de esta hormona se requiere la ingesta de glucocorticoides en horario nocturno (**ver Figura 2**).

Los niveles de ACTH se utilizan en la monitorización de la HSC, aunque no debe considerarse como único criterio de control¹³, ya que existen otras variables que deben ser tenidas en cuenta como las necesidades de mineralocorticoides, edad del paciente, etc.

2.3 Tratamiento esteroideo.

Los corticoides que produce el organismo de forma natural (hormonas) desarrollan su actividad en diferentes procesos, entre los que están aquellos que regulan la inflamación, el sistema inmunitario, el metabolismo de los hidratos de carbono, la transformación de las proteínas en moléculas sencillas, así como la respuesta frente al estrés del organismo. Los corticoides semisintéticos se obtienen mediante la modificación de la estructura química de los naturales, cortisona o hidrocortisona. Así se incrementa su potencia, disminuyendo la actividad mineralocorticoide y mejorando la glucocorticoide. Los glucocorticoides orales que habitualmente se administran en la HSC son la dexametasona, hidrocortisona, prednisolona o prednisona. Es necesario señalar que la dexametasona es de naturaleza muy potente por lo que inhibe el crecimiento del niño, así que no se debe tomar en este periodo. De esta forma la hidrocortisona es el fármaco indicado en la etapa de crecimiento. Tan sólo es habitual el uso de dexametasona en la etapa adulta de los pacientes con HSC. Hayek y col.² fueron los primeros en introducir el uso de dexametasona para el tratamiento de la Hiperplasia Suprarrenal Congénita.

Como hemos adelantado, los glucocorticoides poseen efectos adversos a largo plazo como son: la obesidad, hipercolesterolemia, resistencia a la insulina, osteopenia y osteoporosis³. En los pacientes con HSC sometidos a tratamientos durante toda la vida, es de vital importancia ajustar la dosis adecuada y tipo de corticoide para cada paciente. Varios estudios han reportado una relación de la dosis alta del glucocorticoide con una disminución de la densidad mineral ósea (DMO)^{4,5}, siendo por ello necesario monitorear la DMO en pacientes con HSC para mantener la salud óptima de los huesos. Otro estudio identifica la presencia de obesidad hasta en un 35% de pacientes con HSC tratados con glucocorticoides durante un largo periodo de tiempo⁶.

Los dos principales objetivos de la ingesta de glucocorticoides en pacientes con HSC es 1) reemplazar la deficiencia de la hormona cortisol, para así evitar una posible crisis de insuficiencia adrenal y 2) evitar la sobreproducción de la

hormona adrenocorticotropa (ACTH). El exceso de ACTH puede asociarse a restos adrenales testiculares, traducándose en el desarrollo de tumores locales, y pudiendo ser además una causa de infertilidad⁷.

Todavía no existe clara evidencia científica acerca del beneficio de tomar una única dosis del glucocorticoide dexametasona o bien por la mañana o bien por la noche en pacientes con HSC en edad adulta. Algunos autores reportan que la ingesta de dexametasona por la noche permitiría reducir la producción de andrógenos suprarrenales por la mañana, aunque ellos mismos afirman que existe una asociación entre tomar el glucocorticoide por la noche y el sobretratamiento¹⁰. Igualmente, otros autores afirman que la administración por la noche reduce el aumento de ACTH¹¹ y hormonas adrenales 17 hidroxiprogesterona y androstenediona por la mañana¹². Aunque por la tarde este efecto disminuye, y se obtienen niveles más altos de estas hormonas. Además, la ingesta por la noche en este estudio no afecta a la alteración del sueño en ninguno de los pacientes.

2.4 Farmacocinética.

La farmacocinética del glucocorticoide, dexametasona, presenta una gran relevancia. El fármaco se encuentra en la sangre durante 16 horas después de su administración, teniendo un tiempo de vida media de 4 horas. Su nivel máximo se alcanza transcurridos 90 minutos desde su administración. Aunque varía en cada paciente.

2.5 Biomarcadores

Los parámetros clínicos y hormonales que actualmente se usan para controlar la enfermedad son: edad ósea, peso, talla y velocidad de crecimiento, 17 hidroxiprogesterona (17-OHP), testosterona, 4 androstendiona y la actividad de la renina plasmática (ARP)^{8,9}.

También es importante hacer un seguimiento longitudinal mediante densitometría, para conocer el estado de los huesos del paciente. En este

proyecto de investigación hemos utilizado la monitorización ambulatoria de la presión arterial (MAPA) como método no invasivo, barato, cortoplacista y eficaz en el seguimiento de esta enfermedad en la edad adulta.

2.6 Hipertensión en pacientes con HSC.

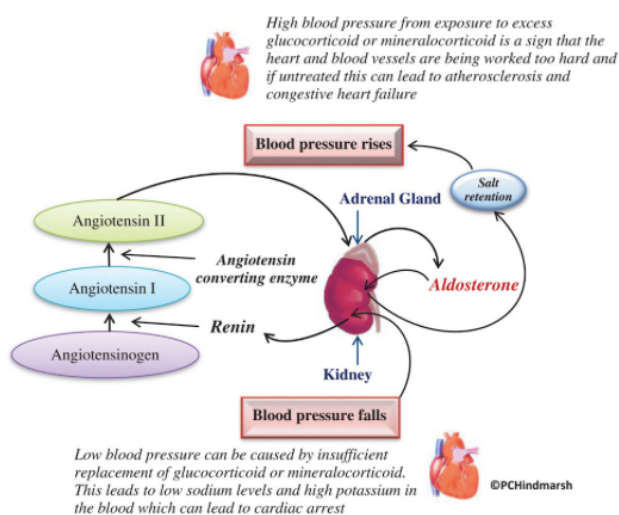
Las causas de la hipertensión son múltiples, habitualmente multifactoriales, pero en algunos casos es secundaria a una enfermedad metabólica-genética o al tratamiento farmacológico de una patología congénita, como es la HSC.

En la actualidad, se considera que la hipertensión arterial es un factor clave en la predicción de riesgo en las enfermedades cardiovasculares, por lo que se han generalizado las tomas de presión arterial en los controles de salud desde la edad pediátrica, y en los controles periódicos de las enfermedades crónicas con riesgo cardiovascular. En este contexto, se ha generalizado la determinación de la monitorización ambulatoria de la presión arterial (MAPA). Mediante esta prueba es posible identificar patrones anómalos en la variación de la presión arterial nocturna respecto de la diurna (dipper nocturno), dado que mide la presión arterial 24 horas. Verdecchia et al¹⁴ definieron el concepto de “no-dippers” como aquellas personas que no tienen una caída superior al 10% en la presión arterial diastólica y sistólica nocturna con respecto a la diurna, y “riser” las que poseen una presión arterial nocturna mayor. En cambio, tienen patrón “dipper” aquellas cuya diferencia entre la presión arterial nocturna y diurna es mayor al 10%, este último afirma que el paciente goza de buena salud cardiovascular. El patrón “no-dipper” es un valioso predictor en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, puesto que los pacientes con este patrón tienen casi el doble de riesgo de morbilidad cardiovascular¹⁴, también son nueve veces más propensos a sufrir muerte por enfermedad cardiovascular¹⁵, en comparación con aquellos que presentan patrón “dipper”.

El conocimiento de este tipo de patrones permite conocer sus efectos adversos y actuar en consecuencia lo antes posible. Como se puede observar, la presión arterial en esta enfermedad genética-endocrina juega un papel clave.

Regulación de la presión arterial.

La regulación de la presión arterial se realiza a través del sistema renina-angiotensina-aldosterona, en el que participa de forma importante los riñones. Estos son capaces de detectar el declive de la presión arterial, volumen de sangre y adrenalina, y posteriormente aumentan la concentración de renina. Si por el contrario los niveles de sodio y aldosterona disminuyen, consecuentemente los niveles de renina aumentan. Ésta es liberada por el riñón, y se propaga a través de la sangre descomponiendo el angiotensinógeno, que es producido por el hígado, en angiotensina I que a su vez da lugar a angiotensina II a través de la hidrólisis por una enzima ubicada en los pulmones. La angiotensina II induce la síntesis de la hormona aldosterona en las glándulas



suprarrenales, y además juega un papel clave en la vasoconstricción. Tanto la angiotensina II como la aldosterona contribuyen al incremento de la presión arterial mediante el estrechamiento de los vasos sanguíneos y un mayor bombeo del corazón.

Figura 3. Sistema renina-angiotensina-aldosterona y cómo reacciona ante la presión arterial alta y baja¹⁶.

La aldosterona juega un papel clave en la regulación de la presión arterial, dado que envía señales al riñón para retener sodio y agua, y de esta forma aumentar el volumen de sangre y presión arterial. Pero la concentración de sodio se regula mediante su retención en los riñones o eliminación por la orina. En este caso los glucocorticoides y mineralocorticoides tienen una función relevante en la regulación de la presión arterial¹⁶.

En el caso de los pacientes con HSC, una presión arterial alta puede indicar sobreexposición a estos fármacos. En cambio, una presión arterial baja es sinónimo de un mayor requerimiento de corticoides¹⁶ **(ver figura 3)**.

La aldosterona es una hormona esteroidea que se produce en la zona glomerular de la corteza adrenal, aunque no es almacenada en las células glomerulares. Por lo que a partir de diversos reguladores se controla su secreción.

Regulación de la secreción de aldosterona.

Su secreción se controla principalmente por varios reguladores: angiotensina II, niveles de potasio y la hormona adrenocorticotropa (ACTH)¹⁷, aunque este último es un regulador secundario. Elevados niveles de aldosterona se asocian a un mayor riesgo de padecer hipertensión¹⁸, infarto de miocardio¹⁹, insuficiencia cardíaca^{20,21} y renal²².

Sistema renina-angiotensina-aldosterona.

El sistema renina-angiotensina-aldosterona es importante en la regulación de la aldosterona. Aunque es la actividad de la renina plasmática la que juega un papel clave en la producción de Angiotensina I, y acto seguido mediante una glicoproteína ubicada en el hígado se da lugar a la Angiotensina II²³. Esta última controla la secreción de aldosterona y aumenta la actividad del sistema simpático, por lo que posee un efecto vasoconstrictor.

La angiotensina II se une al receptor angiotensina II tipo 1 (ATR1), y a su vez se acopla a la fosfolipasa efectora C- α (PLC α), Gq/11. La cual hidroliza fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) para dar lugar a dos mensajeros: inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). A su vez DAG activa la proteína quinasa C (PKC). IP3 se une a sus receptores en el retículo endoplasmático y se produce un incremento de los niveles de calcio intracelular. Este aumento se traduce en una activación de la cadena de proteínas quinasas dependientes de calcio/calmodulina (CaMK).

Las quinasas Src (las cuales son activadas por la Angiotensina II) y las PKC estimulan la transfosforilación y consecuentemente la activación de la proteína

kinasa D (PKD), que a su vez activa y fosforila los factores de transcripción y respuesta (ATF) / (CREB) respectivamente. Así pues, se induce la expresión de la proteína reguladora aguda esteroidogénica (StAR). CaMK también tiene la capacidad de fosforilar y activar los factores ATF/CREB, que a su vez estimulan la expresión de la enzima responsable de la síntesis de aldosterona, aldosterona sintasa (**ver Figura 4**).

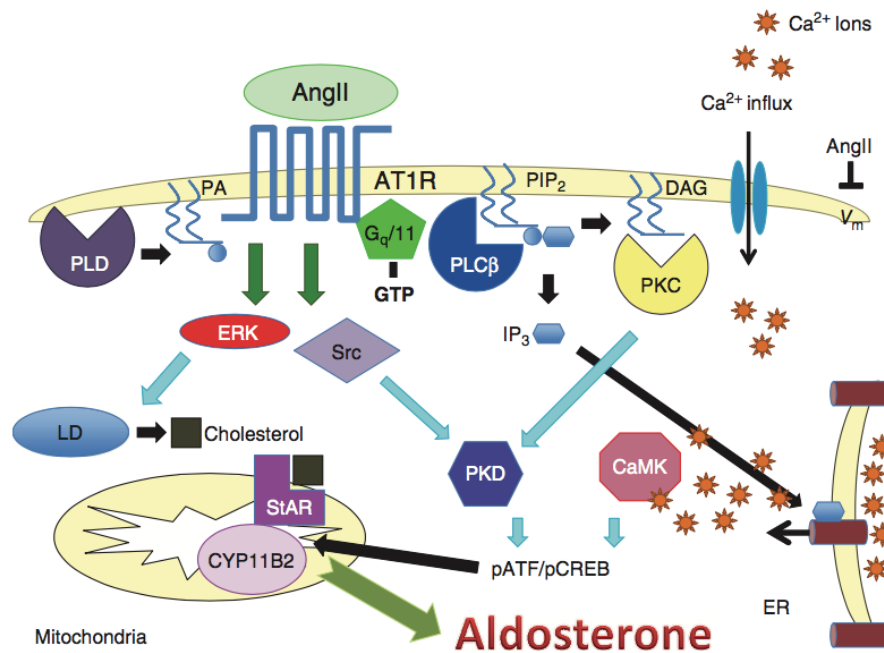


Figura 4. Mecanismo de la regulación de la secreción de aldosterona a través de la Angiotensina II²⁴.

Niveles de potasio.

Elevadas concentraciones de potasio en el espacio extracelular ejercen una despolarización del potencial de membrana, ya que se reduce el gradiente electroquímico. Como consecuencia de este cambio de polarización se activan los canales de calcio por lo que se aumentan los niveles de calcio intracelular activando la CaMK.

Por otro lado, un incremento de cAMP puede ser debido a una alta concentración de potasio, al inducir la actividad del adenilato ciclasa. El aumento de cAMP induce la actividad de la proteína kinasa A.

Tanto la proteína quinasa A como el CaMK fosforila los factores de transcripción ATF / CREB y de esta forma estimulan la expresión de StAR y CYP11B2 dando lugar a la síntesis de aldosterona (**ver Figura 5**).

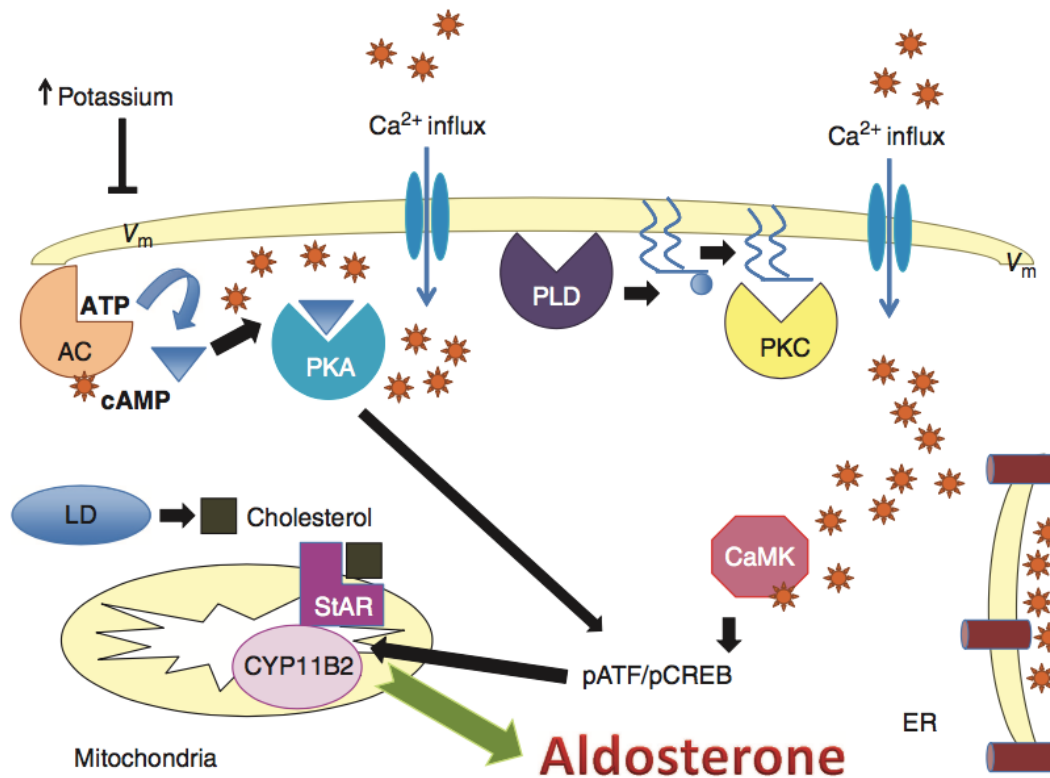


Figura 5. Mecanismo de la regulación de la secreción de aldosterona a través de los niveles de potasio extracelular²⁴.

Hormona adrenocorticotropa (ACTH).

Esta hormona estimula la producción de Desoxicorticosterona (DOC), que a su vez es el precursor de la Aldosterona²⁵. La ACTH se une a su receptor melanocortina tipo 2 (MCR2) en la zona glomerulosa, y como consecuencia se produce la activación de la proteína G estimulante (Gs). Cuya subunidad alfa estimula el adenilato ciclasa, y esta a su vez transforma el ATP en cAMP, por lo que se incrementa sus niveles, dando lugar a la estimulación de proteína quinasa A (PKA). Esta aumenta la concentración de calcio intracelular y activa CaMK. Tanto CaMK como PKA activan mediante fosforilación los factores de transcripción ATF / CREB y consecuentemente se induce la expresión de STAR y CYP11B2. Un incremento en la fosforilación y transcripción StAR estimula la síntesis de aldosterona (**ver Figura 6**).

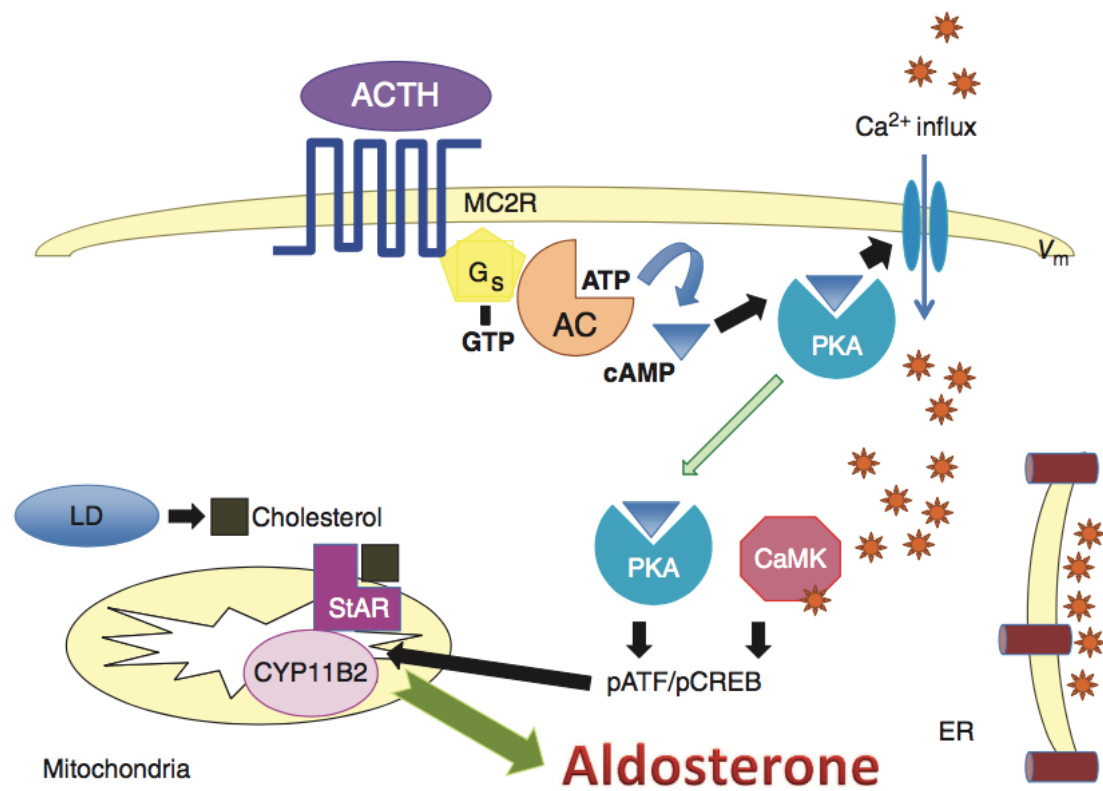


Figura 6. Mecanismo de la regulación de la secreción de aldosterona a través de la hormona ACTH²⁴.

3.- Hipótesis y Objetivos.

La HSC es una entidad clínica que requiere un tratamiento crónico con glucocorticoides. Dicho tratamiento asocia una serie de efectos adversos relacionados con salud ósea, metabólica y cardiovascular. Tanto el tipo de corticoide como la dosis y momento de administración tienen diferentes efectos en la regulación del eje adrenal de estos pacientes. Estos efectos pueden ser medidos en diferentes variables biológicas que incluyen la presión arterial. Los objetivos del estudio son, por un lado, establecer una relación directa entre la hora de la ingesta del glucocorticoide dexametasona y posibles enfermedades cardiovasculares a largo plazo en pacientes con Hiperplasia Suprarrenal Congénita (HSC) y por otro proponer el MAPA como una herramienta útil en el seguimiento de los pacientes con HSC. La hipótesis de este estudio es que “el comportamiento de la presión arterial objetivado mediante el procedimiento de monitorización ambulatoria de la presión arterial (MAPA) cambia en relación al momento de administración de la dexametasona oral en un sujeto con HSC por déficit de 11 beta hidroxilasa”. Estos cambios pueden objetivarse en un corto periodo de tiempo (3 semanas).

Si se cumple la hipótesis del estudio, proponemos que la Monitorización Ambulatorio de la Presión Arterial (MAPA) es una herramienta válida para evaluar y optimizar el tratamiento en pacientes que toman el glucocorticoide de forma permanente, y de esta forma minimizar riesgos en la salud cardiovascular.

Objetivos

- 1.- Evaluar posibles cambios en el compartamiento de la presión arterial obtenida mediante MAPA de 24 horas en un paciente con HSC que recibe secuencialmente tratamiento sustitutivo con dexametasona en horario nocturno y diurno.
- 2.- Analizar si el tratamiento crónico con dexametasona asocia cambios en el patrón dipper o non-dipper.

3.- Evaluar posibles cambios en bio-marcadores relacionados con el funcionalismo del eje adrenal en relación a la hora de administración del tratamiento sustitutivo dexametasona.

4.- Correlacionar los posibles cambios en los patrones de presión arterial con otras variables biológicas y la hora de administración del tratamiento con dexametasona.

4.- Material y Métodos.

El paciente objeto de estudio padece una HSC con la forma 11β -hidroxilasa (11β -OH). Fue diagnosticado al año y medio de edad y no disponemos del tipo de mutación. Tampoco conocemos los niveles de aldosterona. Ha seguido tratamiento sustitutivo desde el nacimiento y no ha presentado descompensaciones significativas. Actualmente toma dexametasona oral en dosis única nocturna, tiene 23 años, género masculino y origen español.

El estudio es analítico-experimental y pertenece a un ensayo no controlado, puesto que hay un control del factor de estudio y no hay grupo control. Se propone un ensayo cruzado (cross-over) en el que el sujeto actúa como su propio control. Se realiza un estudio analítico y de MAPA en la situación habitual (ingesta de dexametasona nocturna) y posteriormente tomando el mismo preparado y a la misma dosis pero a primera hora de la mañana (5:30 am). Ambos periodos se llevan a cabo tras una fase de blanqueo de 3 semanas para asegurar la desaparición de los efectos del tratamiento en los diferentes horarios. Finalmente se realiza un nuevo cruce volviendo a la situación inicial y repitiendo nuevamente el estudio. Este diseño garantiza la no existencia de variabilidad interindividual.

La población de estudio es un único paciente con la enfermedad. Cuyo requisito de inclusión era gozar de buena salud para que no pudiera interferir con los resultados propios de la enfermedad.

El fármaco glucocorticoide utilizado es dexametasona, y cada cápsula contiene 0,25 mg.

El paciente ha tomado la medicación durante más de 20 años por la noche, por lo que al inicio del estudio se ha procedido a medir los distintos marcadores en sangre y orina, y monitorear la presión arterial 24 horas del paciente con HSC. Después se cambió la hora de tomar el glucocorticoide a las 5:30 de la mañana durante 20 días. Una vez transcurrido este tiempo se cuantificaron los mismos parámetros en orina y sangre que la vez primera, y también se realizó el MAPA.

De esta forma se puede comparar los resultados tomando a una hora u otra el fármaco. Acto seguido observamos diferencias muy significativas en la renina y presión arterial, por lo que decidimos hacer una tercera prueba tomando el glucocorticoide por la noche durante 21 días. Se realizó el MAPA y determinación de los distintos marcadores en orina y sangre.

Para ello se va a cuantificar aquellos marcadores característicos en el seguimiento de la enfermedad HSC, los cuales son: ACTH, renina, aldosterona, actividad de la renina, índice aldosterona/actividad de la renina, cociente de sodio/creatinina en orina, y sodio y potasio tanto en sangre como en orina. El lugar donde se determina todos estos marcadores es en el laboratorio del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Santander). También se llevará a cabo un MAPA, el cual fue prestado por el departamento de Nefrología del mismo Hospital.

5. Resultados.

Los resultados obtenidos se recogen a continuación de forma resumida en la tabla siguiente:

	Admin. Mañana	Admin. Noche (1)	Admin. Noche (2)
ACTH (pg/ml)	182	51	62
P.A. sistólica media día (mmHg)	157	130	132
P.A. diastólica media día(mmHg)	90	75	76
P.A. sistólica media noche (mmHg)	138	118	125
P.A. diastólica media noche (mmHg)	73	64	71
Aldosterona (ng/dL)	28,1	29,7	28,9
Renina ($\square$ UI/mL)	27,2	43,3	39,4
Actividad de renina (ng/ml/hr)	1,12	1,64	1,76
Indice Aldosterona / Actividad de Renina	25	18	16
Sodio en orina (mEq/L)	17	14	73

Sodio en sangre (mEq/L)	137	138	136
Potasio en orina (mEq/L)	12	53	130
Potasio en sangre (mEq/L)	3,9	4,3	Interferencia por hemólisis
Cociente sodio/creatinina en orina (mEq/mg)	0,02	0,01	0,04

La tabla recoge los resultados obtenidos con la administración del glucocorticoide por la mañana y por la noche. Existe variabilidad significativa en las cifras de hormona adrenocorticotropa (ACTH), P.A. sistólica y diastólica media durante el día, P.A. sistólica media durante la noche, renina, actividad de la renina e índice aldosterona / actividad de Renina. Los cambios en la excreción urinaria de sodio y potasio no se acompañan de cambios en la natremia ni kalemia. Son significativas las diferencias en el índice aldosterona actividad de renina (IAR) mayor o menor de 20. Un valor de IAR > 20 permite discriminar entre sujetos normales y pacientes hipertensos con hiperaldosteronismo. En el caso que nos ocupa indica una mala regulación mineralocorticoide por exceso de ACTH.

6. Discusión.

Hasta el momento no se ha abordado cómo repercute la hora de la ingesta del glucocorticoide en los patrones de presión arterial recogida mediante la monitorización ambulatoria de la presión arterial (MAPA). Nuestro estudio, aunque limitado a una única observación, es el primero que aporta nueva información sobre cuando puede ser mejor administrar el glucocorticoide dexametasona basados en la monitorización ambulatoria de la presión arterial. De acuerdo a nuestro estudio el uso de MAPA permitiría ayudar en la optimización del tratamiento.

Desde el punto de vista de los biomarcadores, hemos observado una correlación directa entre los niveles de ACTH y el aumento considerable de la presión arterial al tomar la dexametasona por la mañana. Esto concuerda con un estudio realizado por Jackson RV, et al²⁶ donde se administraba ACTH por vía oral y una vez transcurridas 24 horas se obtenían valores elevados de la presión arterial. Este fenómeno puede también ser explicado mediante el mecanismo de la regulación de secreción de la aldosterona, ya que la ACTH es un regulador de la aldosterona. Por lo que elevados niveles de ACTH se traduce en una mayor síntesis de aldosterona (**ver Figura 6**) y esta última es responsable de un incremento de la presión arterial (**ver Figura 3**).

El índice aldosterona / actividad de la renina (IAR) es útil en el diagnóstico de hiperaldosteronismo primario (HAP), desde que Hiramatsu en 1981 estableciera esta relación²⁷, son muchos los estudios actuales que afirman esta asociación aunque existe una amplia controversia acerca de que valor de corte manifiesta la detección de HAP. McKenna²⁸ afirmó la asociación de valores de IAR superiores de 33 ng/mL/h en pacientes con HAP, Young Jr ²⁹ para valores de IAR $\geq$ 20 ng/mL/h y aldosterona plasmática $\geq$ 15 ng/dL. Igualmente, en otro estudio³⁰ el valor de corte en la HAP de la aldosterona sería superior a 40 ng/dL y un IAR $\geq$ 20 ng/mL/h. Por lo que teniendo en cuenta lo anterior se podría afirmar que al tomar la medicación por la mañana podría existir un posible hiperaldosteronismo primario, ya que se obtiene un valor de 25 en el índice

aldosterona /actividad de la renina (IAR) y una aldosterona plasmática de 28,1 (ng/dL).

La actividad de la renina plasmática (ARP) expresa la capacidad que posee la renina en la producción de angiotensina I, y se emplea para estimar el nivel de activación del sistema renina-angiotensina (SRA). La elevada actividad de la renina plasmática (ARP) se relaciona con un mayor riesgo de padecer infarto agudo de miocardio³¹⁻³⁴, deterioro de la función renal^{35,36} y un incremento de mortalidad cardiovascular^{37,38}. Aunque la relación del ARP y una mayor incidencia de enfermedad coronaria no se justificó en pacientes normotensos³⁹. Por lo que solo parece ser un marcador importante en personas hipertensas. También Simran y sus colaboradores reportaron en un estudio⁴⁰ una mayor incidencia de enfermedad isquémica del corazón y fallo cardíaco congestivo en personas con alta ARP y presión arterial sistólica por encima de 144 mmHg. Si la actividad de la renina plasmática (ARP) se encuentra disminuida en pacientes con hipertensión que presentan bajos niveles de renina, habrá un aumento de la actividad angiotensina II en tejidos como: riñones, cerebro, endotelio vascular y glándulas suprarrenales⁴¹.

Una ratio elevado de aldosterona / actividad de la renina plasmática junto con altos niveles de aldosterona no determina el diagnóstico del hiperaldosteronismo primario. Por lo que hay que medir los niveles de aldosterona cuando se ha hecho una ingesta alta de sodio, generalmente 5 gramos durante 3 días, en este tercer día el sodio en orina debería superar 200 mEq/L para confirmar que se ha realizado correctamente la carga de sodio. Si los niveles de aldosterona en orina son superiores a 12 mcg se podría diagnosticar el hiperaldosteronismo primario, ya que en este caso los niveles de aldosterona serían independientes del sistema renina-angiotensina⁴¹.

En 3 semanas es posible identificar cambios en los efectos ligados a la hora de administración por lo que es recomendable incorporar marcadores que permitan tener resultados en un corto período de tiempo. Otros métodos de monitorización como la densitometría ósea pueden cambiar de forma apreciable cada 2-3 años.

La terapia con glucocorticoides es un tratamiento sustitutivo en pacientes con HSC, es por ello por lo que muchos autores dan más importancia a suprimir la sobreproducción de ACTH matutina y para ello recomiendan tomar la dexametasona por la noche. En cambio, en aquellos pacientes que toman glucocorticoides y requieren un tratamiento inmunosupresivo o antiinflamatorio toman el glucocorticoide por la mañana.

En este paciente existe una relación directa entre tomar el glucocorticoide por la mañana y posibles enfermedades cardiovasculares a largo plazo. Por lo que será recomendable tomarlo por la noche, aunque de esta forma no se imite el ritmo circadiano del cortisol.

Aunque no es objeto de este estudio, a partir de nuestros resultados proponemos el uso del MAPA en la optimización del tratamiento esteroideo basado en la modificación de la galénica o uso de nanopartículas que permitan una liberación controlada de los glucocorticoides. El principal inconveniente que presenta el fármaco administrado de forma convencional es que, transcurridas unas horas desde su administración, el organismo agota el corticoide, y posteriormente es desechado por la orina. Si la galénica del fármaco fuese de liberación prolongada esta pérdida del efecto no tendría lugar.

Así pues, la farmacocinética del glucocorticoide es muy limitada si la comparamos con nanopartículas de liberación prolongada. Ya que como hemos mencionado anteriormente el tiempo de vida media y el tiempo que el glucocorticoide se encuentra en la sangre son 4 y 16 horas respectivamente, desde su ingesta. Este novedoso método sería capaz de imitar mejor el ritmo circadiano del cortisol en pacientes con Hiperplasia Suprarrenal Congénita (HSC), y a su vez poseer un efecto terapéutico mucho mas prolongado, como podría ser en aquellas personas que poseen Artritis Reumatoide, lo que mejoraría considerablemente el estado de salud del paciente.

Nanopartículas (NPs).

El objetivo de las nanopartículas que contienen el glucocorticoide es liberar de forma sostenida el fármaco para así conseguir un efecto muy positivo en el tratamiento de la enfermedad.

Actualmente la aplicación de nanopartículas en enfermedades que requieren terapia de glucocorticoide parece ser muy prometedor por las numerosas ventajas que presenta, tales como: una mejora de la solubilidad, biodisponibilidad, inmunocompatibilidad y citotoxicidad⁴², en comparación con los fármacos de uso convencional. También supera muchas limitaciones de estos medicamentos tradicionales dado que tienen un mayor tiempo de vida media y mejor estabilidad, además de incrementar la actividad terapéutica y al mismo tiempo disminuye los efectos secundarios, dado que su administración es de forma controlada⁴³. El control de liberación del fármaco hace que se produzca una mayor efectividad, así pues, tendría un papel destacado la dosis de glucocorticoide encapsulada, tamaño de la nanopartícula, su morfología y las características superficiales del compuesto.

Cuanto mayor sea el tamaño de la nanopartícula, mayor será su núcleo, por lo que se podrá introducir una mayor dosis de glucocorticoide, y consecuentemente su liberación será más prolongada. Por otro lado, pueden darse interacciones de tipo iónico entre el fármaco y los aditivos que están contenidos en el encapsulado, por lo que se dará lugar a un complejo, el cual tendrá una menor solubilidad en agua. Todo ello hará que el corticoide se libere más lentamente⁴⁴. Además, uno de los grandes avances en las nanopartículas es que podría no suprimirse el eje HHA (hipotalámico-hipofisario-adrenal). Por ello cada vez más existe un notorio interés en la nanomedicina, ya que será un pilar importante en la medicina individualizada y farmacología.

Hay algunas indicaciones a tener en cuenta en el proceso de fabricación de muchas nanopartículas, ya que si se producen en condiciones no estériles se pueden contaminar a través de bacterias o lipopolisacáridos, generando así pues una respuesta antiinflamatoria en el organismo. Por lo que es de vital importancia

eliminar cualquier posible sustancia interferente en su fabricación^{45,46}. Por consiguiente, es importante priorizar en la seguridad de la nanopartícula en los ensayos clínicos, y evitar cualquier respuesta inflamatoria. A continuación, se exponen medidas que pueden ayudar a prevenir estos posibles efectos secundarios como puede ser: el uso de material biocompatible, biodegradable y no inmunogénico^{47,48}.

Actualmente se están obteniendo resultados prometedores en ratones a los que se les administra dexametasona en forma de nanopartículas liposomas. En un estudio⁴⁹ en ratones que tenían artritis inflamatoria se comparó la acción de 1) dexametasona contenida en liposomas (L-Dex), 2) dexametasona en micelas reticuladas (M-Dex), 3) dexametasona en polímeros de liberación lenta (P-Dex-slow) y 4) dexametasona en polímeros de liberación rápida (P-Dex-fast) (**Ver Figura 4**).

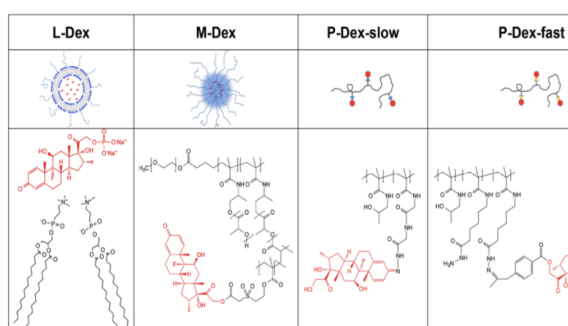


Figura 4. Estructura química de las nanopartículas que contienen la dexametasona (en color rojo).

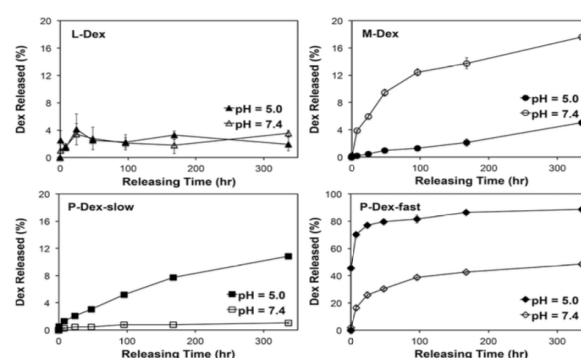


Figura 5. Liberación del fármaco en función del tiempo y pH del medio.

Dependiendo de cual sea el tipo de nanopartícula que contiene el glucocorticoide, su porcentaje de liberación va a ser más o menos sostenido. Otro factor importante es el pH del medio al que se encuentra el fármaco (**ver Figura 5**).

7. Conclusiones.

- 1.- La monitorización ambulatoria de la presión arterial permite identificar cambios en la presión arterial en función del momento de administración de la dexametasona.
- 2.- El patrón de presión arterial es dipper a pesar de la administración de dexametosa crónica.
- 3.- Variaciones en la hora de administración de dexametasona asocia cambios en las cifras de presión arterial, ACTH e índice IAR.
- 4.- En el paciente estudiado, la administración de dexametasona nocturna es mas favorable desde el punto de vista estudiado. Se consigue mejor control de presión arterial y hormonal.
- 5.- En 3 semanas es posible identificar cambios en los efectos ligados a la hora de administración.

8. Referencias bibliográficas.

- [1] Labarta Aizpún JI, de Arriba Muñoz A, Ferrández Longás A. Hiperplasia Suprarrenal Congénita. *Protoc Diagn Ter Pediatr*. 2011; 1: 117-28.
- [2] Hayek A, Crawford JD, Bode HH. Single dose dexamethasone in treatment of congenital adrenocortical hyperplasia. *Metabolism*. 1971; 20: 897-901.
- [3] Arlt W, Willis DS, Wild SH, Krone N, Doherty EJ, Hahner S, et al. Health status of adults with congenital adrenal hyperplasia: a cohort study of 203 patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010; 95: 5110-21.
- [4] Cameron FJ, Kaymakci B, Byrt EA, Ebeling PR, Warne GL, Wark JD. Bone mineral density and body composition in congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995; 80: 2238-43.
- [5] Jaaskelainen J, Voutilainen R. Bone mineral density in relation to glucocorticoid substitution therapy in adult patients with 21-hydroxylase deficiency. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1996; 45: 707-13.
- [6] Finkelstein GP, Kim MS, Sinaii N, Nishitani M, Van Ryzin C, Hill SC, et al. Clinical characteristics of a cohort of 244 patients with congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012; 97: 4429-38.
- [7] Ahmad IC, Yilmaz TF, Kocakoç E. Doppler ultrasonography and magnetic resonance imaging findings of testicular adrenal rest tissue in a patient with 11 β hydroxylase deficiency. Case report. *Med Ultrason*. 2014; 16: 383-5.
- [8] Gotoh H, Kusakabe M, Shiroishi T, Moriwaki K. Survival of steroid 21-hydroxylase-deficient mice without endogenous corticosteroids after neonatal treatment and genetic rescue by transgenesis as a model system for treatment of congenital adrenal hyperplasia in humans. *Endocrinology*. 1994; 135: 1470-6.

- [9] Hughes IA. Management of congenital adrenal hyperplasia. Arch Dis Child. 1988; 63: 1399-404.
- [10] Young MC, Hughes IA. Dexamethasone treatment for congenital adrenal hyperplasia. Arch Dis Child. 1990; 65: 312-14.
- [11] Winterer J, Chrousos GP, Loriaux DL, Cutler GB. Effect of hydrocortisone dose schedule on adrenal steroid secretion in congenital adrenal hyperplasia. Ann NY Acad Sci. 1985; 458: 182-92.
- [12] Dauber A, Feldman HA, Majzoub JA. Nocturnal Dexamethasone versus Hydrocortisone for the treatment of children with Congenital Adrenal Hyperplasia. Int J Pediatr Endocrinol. 2010; 2010: 347636.
- [13] LaFranchi S. Plasma adrenocorticotrophic hormone in congenital adrenal hyperplasia. Importance in long-term management. Am J Dis Child. 1980; 134: 1068-72.
- [14] Verdecchia P, Porcellati C, Schillaci G, Borgioni C, Ciucci A, Bastistelli M, et al. Ambulatory blood pressure: an independent predictor of prognosis in essential hypertension. Hypertension. 1994; 24: 793-801.
- [15] Liu M, Takahashi H, Morita Y, Maruyama S, Mizuno M, Yuzawa Y, et al. Non-dipping is a potent predictor of a cardiovascular mortality and is associated with autonomic dysfunction in haemodialysis patients. Nephrol Dial Transplant. 2003; 18: 563-9.
- [16] Hindmarsh P, Geertsma K. Congenital Adrenal Hyperplasia. A comprehensive guide. Londres: Academic Press; 2017.
- [17] Oberleithner H, Ludwig T, Riethmüller C, Hillebrand U, Albermann L, Schafer C, et al. Human endothelium, target for aldosterone. Hypertension 2004; 43: 952-6.

- [18] Vasan RS, Evans JC, Larson MG, Wilson PW, Meigs JB, Rifai N, et al. Serum aldosterone and the incidence of hypertension in nonhypertensive persons. *N Engl J Med*. 2004; 351: 33-41.
- [19] Beyqui F, Collet JP, Benoliel JJ, Vignolles N, Dumaine R, Barthelemy O, et al. High plasma aldosterone levels on admission are associated with death in patients presenting with acute ST-elevation myocardial infarction. *Circulation*. 2006; 114: 2604-10.
- [20] Tsutamoto T, Sakai H, Tanaka T, Fujii M, Yamamoto T, Wada A, et al. Comparison of active renin concentration and plasma renin activity as a prognostic predictor in patients with heart failure. *Circ J*. 2007; 71: 915-21.
- [21] Guder G, Bauersachs J, Frantz S, Weismann D, Allolio B, Ertl G, et al. Complementary and incremental mortality risk prediction by cortisol and aldosterone in chronic heart failure. *Circulation*. 2007; 115: 1754-61.
- [22] Tylicki L, Larczynski W, Rutkowski B. Renal protective effects of the renin–angiotensin–aldosterone system blockade: from evidence-based approach to perspectives. *Kidney Blood Press Res*. 2005; 28: 230-42.
- [23] Nishiyama A, Kim-Mitsuyama S. New approaches to blockade of the renin–angiotensin–aldosterone system: Overview of regulation of the renin–angiotensin–aldosterone system. *J Pharmacol Sci*. 2010; 113: 289-91.
- [24] Bollag WB. Regulation of aldosterone synthesis and secretion. *Compr Physiol*. 2014; 4: 1017-55.
- [25] Williams GH. Aldosterone biosynthesis, regulation, and classical mechanism of action. *Heart Fail Rev*. 2005; 10: 7-13.
- [26] Jackson RV, Nye EJ, Grice JE, Hockings GI, Strakosch CR, Walters MM, et al. Early rise in blood pressure following administration of adrenocorticotrophic hormone-[1-24] in humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2001; 28: 773-5.

- [27] Hiramatsu K, Yamada T, Yukimura Y, Komiya I, Ichikawa K, Ishihara M. A screening test to identify aldosterone-producing adenoma by measuring renin activity. Results in hypertensive patients. *Arch Intern Med.* 1981; 141: 1589-93.
- [28] McKenna TJ, Sequeira SJ, Heffernan A, Chambers J, Cunningham S. Diagnosis under random conditions of all disorders of renin-angiotensin-aldosterone axis, including primary hyperaldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab.* 1991; 73: 952-7.
- [29] Young WF Jr. Primary aldosteronism: a common and curable form of hypertension. *Cardiol Rev.* 1999; 7: 207-14.
- [30] Yáñez-Jácome JC, Vergara-López A, Joya-Galeana J, Juárez-Rico MS, Martínez-Elizondo G. Valor del índice aldosterona plasmática/actividad de renina plasmática (IAR) en individuos sanos del CMN "20 de Noviembre". *Rev Endocrinol Nutr.* 2009; 17: 148-52.
- [31] Alderman MH, Madhavan S, Ooi WL, Cohen H, Sealey JE, Laragh JH. Association of the renin-sodium profile with the risk of myocardial infarction in patients with hypertension. *N Engl J Med.* 1991; 324: 1098-104.
- [32] Alderman MH, Ooi WL, Cohen H, Madhavan S, Sealey JE, Laragh JH. Plasma renin activity: a risk factor for myocardial infarction in the hypertensive patients. *Am J Hypertens.* 1997; 10: 1-8.
- [33] Blumenfeld JD, Sealey JE, Alderman MH, Cohen H, Lappin R, Catanzaro DF, et al. Plasma renin activity in the emergency department and its independent association with acute myocardial infarction. *Am J Hypertens.* 2000; 13: 855-63.
- [34] Alderman MH, Cohen HW, Sealey JE, Laragh JH. Plasma renin activity levels in hypertensive persons: their wide range and lack of suppression in diabetic and in most elderly patients. *Am J Hypertens.* 2004; 17: 1-7.
- [35] Baldoncini R, Desideri G, Bellini C, Valenti M, De Mattia G, Santucci A, et al. High plasma renin activity is combined with elevated urinary albumin excretion in essential hypertensive patients. *Kidney Int.* 1999; 56: 1499-504.

- [36] Candido R, Carraro M, Fior F, Artero ML, Zennaro C, Burrell LM, et al. Glomerular permeability defects in hypertension is dependent on renin angiotensin system activation. *Am J Hypertens*. 2005; 18: 844-50.
- [37] Brunner HR, Laragh JH, Baer L, Newton MA, Goodwin FT, Krakoff LR, et al. Essential hypertension: renin and aldosterone, heart attack and stroke. *N Engl J Med*. 1972; 286: 441-9.
- [38] Alderman MH. Is there a link between the circulating renin-angiotensin system and coronary disease? A buoyant view. *Heart*. 1996;76 Suppl 3:18-22.
- [39] Meade TW, Cooper JA, Peart WS. Plasma renin activity and ischemic heart disease. *N Engl J Med*. 1993; 329: 616-9.
- [40] Bhandari SK, Batech M, Shi J, Jacobsen SJ, Sim JJ. Plasma renin activity and risk of cardiovascular and mortality outcomes among individuals with elevated and nonelevated blood pressure. *Kidney Res Clin Pract*. 2016; 35: 219-28.
- [41] Sahay M, Sahay RK. Low renin hypertension. *Indian J Endocrinol Metab*. 2012; 16: 728-39.
- [42] Oropesa-Nuñez R, Jaúregui-Haza UJ. Nanoparticles as drug carriers: characteristics and perspectives. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 2012; 43.
- [43] Qiu LY, Bae YH. Polymer architecture and drug delivery. *Pharm Res*. 2006; 23: 1-30.
- [44] Moddarese M, Brown MB, Zhao Y, Tamburic S, Jones SA. The role of vehicle nanoparticle interactions in topical drug delivery. *Int J Pharm*. 2010; 400: 176-182.
- [45] Oberdorster G, Maynard A, Donaldson K, Castranova V, Fitzpatrick J, Ausman K, et al. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Part Fibre Toxicol*. 2005; 2: 8.

[46] Schulze C, Kroll A, Lehr CM, Schäfer UF, Becker K, Schnekenburger J, et al. Not ready to use – overcoming pitfalls when dispersing nanoparticles in physiological media. *Nanotoxicology*. 2008; 2: 51-61.

[47] Liu C, Zhang N. Nanoparticles in gene therapy: principles, prospects, and challenges. In: Villaverde A, editor. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. San Diego, CA, USA: Academic Press; 2011. p. 509-62.

[48] Tinkle S, McNeil SE, Mühlebach S, Bawa R, Borchard G, Barenholz YC, et al. Nanomedicines: addressing the scientific and regulatory gap. *Ann NY Acad Sci*. 2014; 1313: 35-56.

[49] Quan L, Zhang Y, Crielard BJ, Dusad A, Lele SM, Rijcken CF4, et al. Nanomedicines for inflammatory arthritis: head-to-head comparison of glucocorticoid-containing polymers, micelles, and liposomes. *ACS Nano*. 2014; 8: 458-66.

