

Desarrollo de implantes subcutáneos de liberación controlada de Carvedilol para la reducción sostenida de la presión arterial en modelos experimentales de hipertensión arterial

Development of Subcutaneous Implants of Controlled Release Formulations of Carvedilol for Sustained Blood Pressure Reduction in Experimental Models of Hypertension

MIGUEL ÁNGEL ALLO¹, CAMILA MELODY BOQUETE¹, MARCELA ANALÍA MORETTÓN², LUCIANO PAROLA¹,
YANINA SANTANDER PLANTAMURA¹, FACUNDO MARTÍN BERTERA^{1,3}, DIEGO ANDRÉS CHIAPPETTA², CHRISTIAN HÖCHT^{1,3}

RESUMEN

Objetivo: El objetivo del presente estudio fue el desarrollo y la evaluación farmacocinética y farmacodinámica de la liberación *in vivo* de implantes subcutáneos de carvedilol capaces de aportar niveles tisulares estables en modelos experimentales de hipertensión arterial.

La incorporación del polímero hidrofílico SoluPlus (SP) en los implantes PCL:SP 150:150 y 50:250 favorece un incremento de la liberación de carvedilol dado que aporta concentraciones plasmáticas en el rango de 100-200 ng/mL durante 2 semanas, lo que tiene como resultado una reducción sostenida de la presión arterial sistólica indirecta en animales SHR.

Material y métodos: Se prepararon implantes subcutáneos de poli (epsilon-caprolactona) (PCL) con diferentes proporciones del polímero hidrofílico SoluPlus (300:0; 250:50; 150:150 y 50:250 mg) cargados con 100 mg de carvedilol. Se evaluó el perfil plasmático y el efecto sobre la presión arterial sistólica (PAS) luego del implante de cada formulación en el tejido subcutáneo de ratas espontáneamente hipertensas (REH) macho.

Resultados: Las formulaciones PCL:SP 50:250 y 150:150 aportaron niveles en el rango de 100-200 ng/mL. Las formulaciones PCL:SP 250:50 y 300:0 aportaron concentraciones inferiores de carvedilol comprendidas en el rango de los 0-100 ng/mL durante el transcurso del tratamiento. Los animales espontáneamente hipertensos tratados con PCL:SP 50:250 y 150:150 experimentaron un descenso significativo de la presión arterial sistólica (PCL:SP 50:250: DPAS: $-36,6 \pm 2,0$ mmHg; PCL:SP150:150: $35,7 \pm 2,2$ mmHg; $p < 0,05$ vs. basal).

Conclusiones: La incorporación del polímero hidrofílico SoluPlus en los implantes PCL:SP 150:150 y 50:250 favorece un incremento de la liberación de carvedilol, ya que aporta concentraciones plasmáticas del β -bloqueante que aseguran una reducción sostenida de la PAS indirecta en animales espontáneamente hipertensos.

Palabras claves: Carvedilol/administración y dosificación - Presión sanguínea - Preparaciones de acción retardada - Ratas

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was the development and pharmacokinetic/pharmacodynamic evaluation of the *in vivo* release of subcutaneous implants of carvedilol capable of providing stable tissue levels in experimental models of hypertension.

Methods: The subcutaneous implants were prepared with poly (epsilon-caprolactone) (PCL) and different proportions of the SoluPlus (SP) hydrophilic polymer (300:0; 250:50; 150:150 and 50:250 mg) loaded with 100 mg carvedilol. The plasma profile and the effect on systolic blood pressure (SBP) after subcutaneous implantation of each formulation was evaluated in male spontaneously hypertensive rats (SHR).

Results: The PCL:SP 50:250 and 150:150 formulations provided levels ranging from 100 to 200 ng/mL and the PCL:SP 250:50 and 300:0 formulations provided lower concentrations of carvedilol ranging from 0 to 100 ng/mL during the treatment period. Spontaneously hypertensive animals treated with the PCL:SP 50:250 and 150:150 implants presented a significant decrease in SBP (PCL:SP 50:250: DPAS: -36.6 ± 2.0 mm Hg; PCL:SP150:150: -35.7 ± 2.2 mmHg; $p < 0.05$ vs. baseline values)

Conclusions: The incorporation of the SoluPlus hydrophilic polymer in PC:SP 150:150 and 50:250 implants increases the release of carvedilol, since it provides plasma concentrations ranging from 100 to 200 ng/ml, resulting in a sustained reduction of indirect SBP in SHR.

Key words: Carvedilol/administration & dosage - Nanoparticles/Therapeutics use - Delayed-Action Preparations - Blood Pressure - Rats

REV ARGENT CARDIOL 2020;88:126-131. <http://dx.doi.org/10.7775/rac.es.v88.i2.17472>

Recibido: 14/12/2019 - Aceptado: 05/03/2020

Dirección para separatas: Miguel Allo - Cátedra de Farmacología. Facultad de Farmacia y Bioquímica - Universidad de Buenos Aires - Junín 956, (C1113AAD) Buenos Aires, Argentina - Tel: +(54-11)-4964-8265 - Fax: +(54-11)-4508-3645 - E-mail: miguelblues89@hotmail.com

¹ Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Departamento de Farmacología.

² Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Departamento de Tecnología Farmacéutica.

³ Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Instituto de Fisiopatología y Bioquímica Clínica, Buenos Aires, Argentina.

Abreviaturas

AUC	Área bajo la curva	REH	Ratas espontáneamente hipertensas
PAS	Presión arterial sistólica	SP	SoluPlus
PCL	Poliépsilon-caprolactona		

INTRODUCCIÓN

La hipertensión arterial continúa siendo la principal causa de muerte en el mundo y representa el principal factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. (1) En los últimos años, se ha establecido que la prevención de eventos cardiovasculares asociados a la hipertensión arterial no solo requiere de la reducción efectiva de la presión arterial, sino también de la atenuación de la variabilidad de la presión arterial a lo largo de las 24 h del día. (2-5) Un aspecto central de la terapia antihipertensiva es alcanzar y mantener un control persistente de la presión arterial durante 24 h, de manera tal de asegurar la atenuación de su incremento matinal. (6)

El carvedilol se destaca por ser un β -bloqueante no cardioselectivo con acción vasodilatadora secundaria al bloqueo α_1 -adrenérgico y acciones pleiotrópicas adicionales, entre ellas el efecto antioxidante, antiinflamatorio y antiapoptótico. (7) En comparación con agentes β -bloqueantes convencionales, carvedilol ha demostrado un mejor perfil hemodinámico y metabólico. (8) Sin embargo, una limitación del carvedilol en el tratamiento de la hipertensión arterial es su baja biodisponibilidad oral y la rápida eliminación sistémica, características que atentan contra la reducción sostenida de la presión arterial y la variabilidad de la presión arterial. En este contexto, carvedilol sufre un extenso efecto de primer paso luego de su administración oral que tiene como resultado una limitada biodisponibilidad oral (25%) y una semivida de eliminación de solo 2 h. (9)

Teniendo en cuenta estos antecedentes, diferentes grupos de investigación se han abocado al desarrollo de diferentes formulaciones de carvedilol con la finalidad de incrementar la biodisponibilidad y prolongar la permanencia del β -bloqueante en el organismo. En este contexto, se han desarrollado nanopartículas de carvedilol utilizando quitosán o el polímero Eudragit® RS100. (10, 11) Estas formulaciones han demostrado mejorar las características farmacocinéticas, aunque el impacto sobre el control de las variables hemodinámicas y la prevención del daño de órgano blanco no ha sido evaluado. (10, 11) En nuestro laboratorio, hemos desarrollado implantes subcutáneos de carvedilol con el objetivo final de establecer la utilidad de estos desarrollos farmacotécnicos en la optimización de la prevención del daño de órgano blanco asociado a la hipertensión experimental.

El objetivo del presente estudio fue el desarrollo y la evaluación farmacocinética/farmacodinámica de la liberación *in vivo* de diferentes implantes subcutáneos de carvedilol en ratas espontáneamente hipertensas (REH).

MATERIAL Y MÉTODOS

Implantes subcutáneos de carvedilol

Se prepararon implantes subcutáneos de poli (epsilon-caprolactona) (PCL) con diferentes proporciones del polímero hidrofílico SoluPlus (SP) (300:0; 250:50; 150:150 y 50:250 mg) cargados con 100 mg de carvedilol mediante el método de compresión/fusión en molde. Para preparar los implantes de PCL y SP cargados con carvedilol 100 mg, los polímeros y el fármaco en polvo fueron mezclados en diferentes relaciones de peso, se colocaron en un molde de acero inoxidable (diámetro 11 mm) para ser firmemente comprimidos con un punzón, calentados en un horno precalentado (70 °C, 1 h) para ser comprimidos (0,713 kg/cm²) durante todo el tratamiento térmico. Luego, los moldes fueron enfriados (4 °C, 30 min) y, finalmente, las muestras se removieron para obtener implantes con forma de disco (diámetro 11 mm).

Animales

Se emplearon ratas REH macho (200-220 g) que fueron entrenadas durante 2 semanas para la medición de la presión arterial sistólica (PAS) por el método indirecto de *tail-cuff* descrito anteriormente. (12) Luego de la estimación de la PAS basal durante 3 días, se colocó, bajo anestesia con ketamina/xilacina intraperitoneal 75/10 mg/kg, por debajo de la piel en la zona posterior de la base del cuello, uno de los siguientes implantes subcutáneos cargados con carvedilol: PCL:SP 300:0 ($n = 5$), PCL:SP 250:50 ($n = 5$), PCL:SP 150:150 ($n = 5$) y PCL:SP 50:250 ($n = 5$). Durante las 2 semanas posteriores a la colocación del implante se determinó la PAS indirecta y se realizó la extracción diaria de 100 μ L de sangre venosa de la vena lateral de la cola para la cuantificación de niveles sanguíneos de carvedilol.

La PAS indirecta fue registrada mediante el método no invasivo de *tail-cuff* usando un esfingomanómetro acoplado a un polígrafo Grass 7C (Grass Instrument Co., Quincy, MA, EE.UU.). Durante la medición, los animales fueron acondicionados en un cuarto termostatzado durante 60 min y colocados en un tubo especial de acrílico calentado a 37 ± 1 °C. La PAS indirecta fue calculada como el promedio de seis mediciones separadas durante el mismo día.

Los niveles plasmáticos de carvedilol se cuantificaron mediante la técnica de cromatografía líquida con detección fluorométrica utilizando un método analítico validado en el laboratorio. (13)

Análisis farmacocinético

El análisis farmacocinético del curso temporal de los niveles plasmáticos de carvedilol se llevó a cabo mediante la aplicación de un modelo no compartimental con eliminación de primer orden. Utilizando el *software* farmacocinético TOPFIT (versión 2.0, el Dr. Karl Thomae GmbH, Schering AG, Gödecke AG, Alemania), se estimaron los parámetros farmacocinéticos área bajo la curva (AUC), concentración plasmática máxima (C_{\max}), tiempo al cual se alcanza la C_{\max} (t_{\max}) y semivida de eliminación ($t_{1/2}$).

Análisis estadístico

La distribución normal de los datos y las variables del estudio se comprobaron mediante la prueba de Kolmogorov Smirnov. Los datos se expresaron como medias \pm EEM. La compara-

ción estadística entre los grupos de tratamiento fue realizada mediante ANOVA de una vía y la aplicación del método de Tukey como prueba *a posteriori* utilizando GraphPad Prism versión 6.0 (GraphPad Software, San Diego, California, EE. UU.). La significación estadística se definió como $p < 0,05$.

Consideraciones éticas

Los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con los "Principios de cuidado de los animales de laboratorio" (publicación de NIH N° 85-3, Revisión de 1985) y fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires (EXP-UBA N° 0037832/2019).

RESULTADOS

Los diferentes implantes de carvedilol desarrollados presentaron una forma de disco con diámetro de 11 mm (Figura 1). La colocación de los implantes de carvedilol por debajo de la piel en la zona posterior de la base del cuello fue exitosa en todos los casos sin evidenciarse

signos de dolor ni cambios en el comportamiento en los animales durante el período de evaluación.

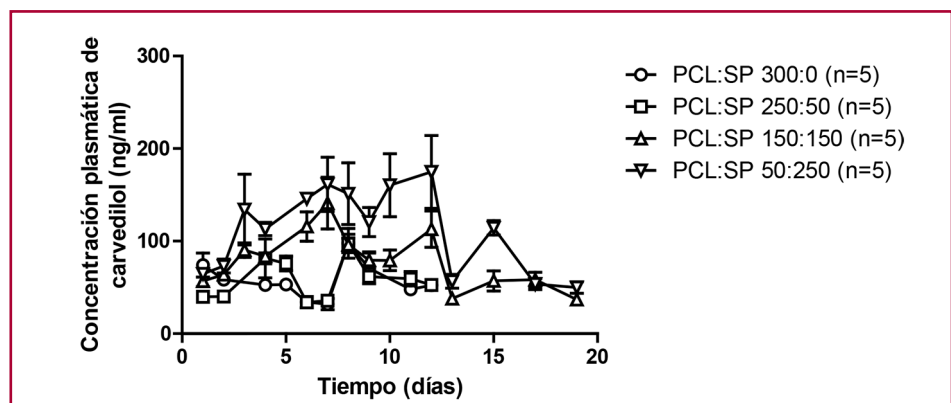
Los diferentes tipos de implantes de carvedilol desarrollados aportaron niveles relativamente estables del β -bloqueante durante 2 semanas (Figura 2). Las formulaciones PCL:SP 50:250 y 150:150 aportaron niveles en el rango de 100-200 ng/mL durante la mayor parte del período de seguimiento de 2 semanas (Figura 2). En el día 12 después de la colocación del implante, las concentraciones plasmáticas de carvedilol fueron de 174 ± 39 ng/mL y 113 ± 20 ng/mL con los implantes PCL:SP 50:250 y 150:150, respectivamente (Figura 2). Las formulaciones PCL:SP 250:50 y 300:0 aportaron concentraciones inferiores de carvedilol en el rango de los 0-100 ng/mL durante el transcurso del tratamiento (Figura 2).

En la Tabla 1 se muestran los principales parámetros farmacocinéticos de disposición obtenidos del análisis de los perfiles plasmáticos de carvedilol en

Fig. 1. Fotografía de un implante subcutáneo de carvedilol desarrollado en el laboratorio.



Fig. 2. Niveles plasmáticos de carvedilol luego de la colocación de diferentes tipos de implantes en ratas REH. Cada punto representa la media \pm EEM.



los diferentes grupos experimentales. La formulación PCL:SP 50:250 se asoció con mayor $C_{m\acute{a}x}$ y AUC de carvedilol en comparación con los otros implantes estudiados (Tabla 1). La biodisponibilidad de carvedilol alcanzada luego de la colocación del implante subcutáneo PCL:SP 150:150 fue superior a la documentada en los grupos PCL:SP 250:50 y 300:0 (Tabla 1).

El seguimiento de la PA indirecta luego de la colocación del implante subcutáneo de carvedilol documentó un descenso significativo de la PAS desde el día 3 hasta el día 15 en los animales REH tratados con PCL:SP 50:250 y PCL:SP 150:150 (Figura 3). En cambio, aquellos grupos tratados con los implantes PCL:SP 250:50 y PCL:SP 300:0 no experimentaron un descenso significativo de la PAS indirecta en relación con los valores basales (Figura 3).

DISCUSIÓN

En el presente estudio el desarrollo de implantes subcutáneos de carvedilol mediante el uso de diferentes proporciones de los polímeros PCL y SP ha demostrado ser una estrategia farmacotécnica efectiva para el man-

tenimiento de niveles sostenidos de carvedilol durante más de 2 semanas. Los implantes que incluyeron una mayor proporción de SP aportaron concentraciones plasmáticas estables más elevadas en comparación con las formulaciones PCL:SP 250:50 y PCL:SP 300:0, lo que permite la reducción sostenida de la PAS indirecta en ratas REH.

La prevención efectiva del desarrollo del daño de órgano blanco asociado a la hipertensión arterial requiere del control efectivo tanto de la presión arterial central como de la variabilidad sin la generación de alteraciones metabólicas adversas. (8) La sobreactivación del sistema nervioso simpático cumple un papel central en el desarrollo y el mantenimiento de la hipertensión arterial, por lo que la modulación de la actividad simpática exacerbada representa una meta importante del tratamiento. (14) A pesar de la reconocida importancia del sistema nervioso simpático en el desarrollo de la hipertensión, los β -bloqueantes han dejado de recomendarse como tratamiento de primera línea debido a la evidencia de estudios clínicos que establecen un menor efecto cardioprotector como resultado de sus limitados efectos sobre la presión arterial central y la

	PCL:SP 300:0	PCL:SP 250:50	PCL:SP 150:150	PCL:SP 50:250
$t_{m\acute{a}x}$ (h)	200 ± 6	120 ± 17	208 ± 28	168 ± 35
$C_{m\acute{a}x}$ (ng/mL)	109 ± 7	112 ± 12	168 ± 13 ^{#&}	243 ± 4 ^{*#&}
AUC (µg/mL.h)	17,2 ± 0,4	14,5 ± 0,5	35,1 ± 1,5 ^{#&}	46,9 ± 0,1 ^{*#&}
$t_{1/2}$ (h)	125 ± 27	198 ± 56	129 ± 37	91 ± 5

* $p < 0,05$ vs. PCL 150:150
 # $p < 0,05$ vs. PCL:SP 250:50
 & $p < 0,05$ vs. PCL:SP 300:0

Tabla 1. Parámetros farmacocinéticos para las diferentes formulaciones de carvedilol

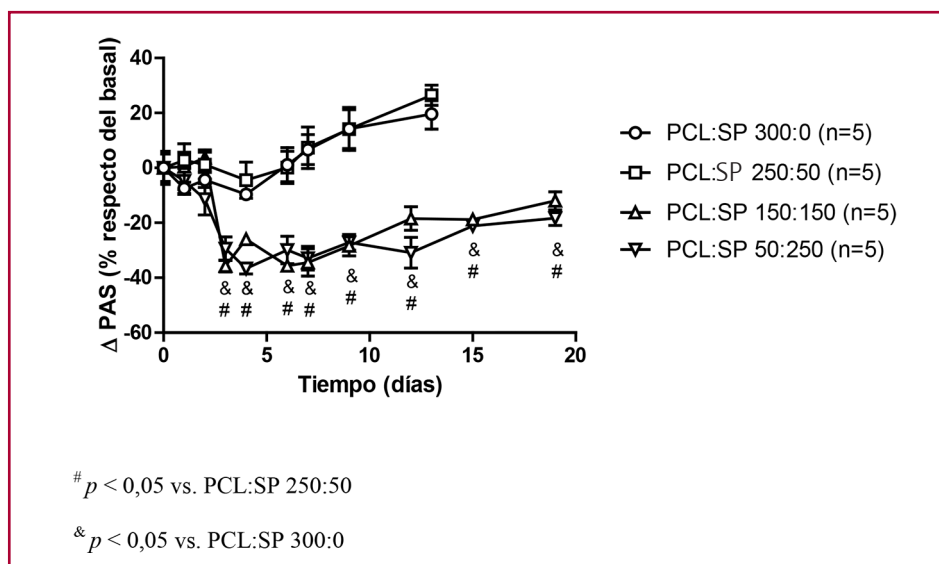


Fig. 3. Cambio en la PAS indirecta de ratas REH luego de la colocación de diferentes implantes subcutáneos con carvedilol.

variabilidad de la presión arterial, y el desarrollo de efectos adversos metabólicos. (15-17) Sin embargo, estas limitaciones son propias de los β -bloqueantes convencionales, en especial el atenolol, y no parecen ser extrapolables a β -bloqueantes vasodilatadores con acción pleiotrópica, como el carvedilol. (8) Los resultados de estudios clínicos y evaluaciones realizadas en modelos experimentales de hipertensión arterial han establecido que el tratamiento crónico con carvedilol es más efectivo que el atenolol en la reducción de la presión arterial central y de la variabilidad de la presión arterial, propiedades hemodinámicas que sugieren una mayor protección del daño de órgano blanco asociado a la hipertensión arterial. (8)

A pesar del mejor perfil hemodinámico de carvedilol, una limitación de este β -bloqueante vasodilatador es su rápida eliminación sistémica que afecta su capacidad de mantener una reducción sostenida de la presión arterial durante 24 horas. (9) Una medida clínica que cuantifica la cobertura terapéutica durante 24 h aportada por un agente antihipertensivo es la razón valle:pico, que representa la relación entre el descenso máximo de la presión arterial y su reducción antes de la administración de la siguiente dosis. (6) Así, un mayor índice valle:pico indica una duración de acción más prolongada que asegura una cobertura terapéutica óptima durante las primeras horas de la mañana con menor riesgo de eventos adversos. (6)

Si bien una razón valle:pico en torno de 0,5 a 0,75 es aceptable, un índice más cercano a 1 asegura el mantenimiento del efecto antihipertensivo a lo largo de todo el intervalo de dosis. (6) Estudios clínicos comparativos han demostrado que agentes antihipertensivos con índice valle:pico de 0,9 aseguran una mayor atenuación del incremento matinal de la presión arterial en comparación con aquellos con relación valle:pico en torno de 0,5. (18) En el caso del carvedilol, la razón valle:pico de las formulaciones comerciales de liberación inmediata como aquella de liberación extendida es inferior de 0,8. (6)

En este contexto, nos hemos planteado la necesidad del desarrollo de formulaciones de liberación prolongada de carvedilol mediante el método de compresión/fusión en molde del principio activo con polímeros. Los polímeros PCL y SP representan dos de los principales excipientes utilizados en el desarrollo de formulaciones de liberación prolongada. (19, 20) Dado que el PCL limita el acceso del medio acuoso circundante al interior del implante, lo que enlentece la disolución del fármaco y, por lo tanto, disminuye su liberación, se ha evaluado el impacto del reemplazo de una fracción del polímero por SP. El SP es un polímero anfifílico que mejora la solubilidad y biodisponibilidad de numerosas drogas poco solubles. (20) El agregado de este polímero a la formulación favorece el ingreso del solvente, ya que acelera el proceso de liberación, por lo que podría esperarse un incremento de los niveles plasmáticos de carvedilol de manera proporcional al aumento de la proporción de SP en el implante. En este contexto,

el análisis farmacocinético de los perfiles plasmáticos de carvedilol de los diferentes grupos experimentales establece que las formulaciones con mayor contenido de SP (PCL:SP 50:250 y PCL:SP 150:150) aportan concentraciones plasmáticas significativamente más altas en comparación con los implantes PCL:SP 250:50 y PCL:SP 300:0.

La evaluación farmacodinámica de los diferentes implantes subcutáneos de carvedilol detectó una reducción significativa de la PAS indirecta en ratas REH con colocación del implante PCL:SP 50:250 o PCL:SP 150:150. Aunque preliminares estos hallazgos establecen que el desarrollo de formulaciones de liberación sostenida de carvedilol que aseguren el mantenimiento de niveles plasmáticos estables en el rango de 100-200 ng/mL representaría una estrategia terapéutica racional para la optimización del tratamiento de la hipertensión arterial experimental con carvedilol. Futuros experimentos son necesarios para establecer si el mantenimiento de una reducción sostenida de la PAS con implantes subcutáneos de carvedilol aporta una mayor reducción del daño de órgano blanco en ratas REH en comparación con formulaciones convencionales de liberación inmediata.

CONCLUSIONES

El desarrollo de implantes subcutáneos de carvedilol utilizando diferentes proporciones de los polímeros PCL y SP permite la obtención de formas farmacéuticas que aseguran una liberación sostenida del β -bloqueante durante al menos 2 semanas. La incorporación del polímero hidrofílico SP en los implantes PCL:SP 150:150 y 50:250 favorece un incremento de la liberación de carvedilol, dado que aporta concentraciones plasmáticas en el rango de 100-200 ng/ml, lo que tiene como resultado una reducción sostenida de la PAS indirecta en animales REH.

Agradecimientos

Este trabajo fue respaldado por becas de la Secretaría de Ciencia y Técnica, Universidad de Buenos Aires, Argentina. (Proyecto UBACyT 2016 20020150100142BA). Diego Chiappetta y Marcela Moretton son investigadores de carrera de CONICET.

Declaración de conflicto de intereses

Los autores declaran que no poseen conflictos de intereses

BIBLIOGRAFÍA

1. Sociedad Argentina de Cardiología. Consenso Argentino de Hipertensión Arterial. *Rev Argent Cardiol* 2018; 86 (Suppl 2): 1-53.
2. Meredith PA. A chronotherapeutic approach to effective blood pressure management. *J Clin Hypertens* 2002;4(4 Suppl 1):15-9. <https://doi.org/10.1111/j.1524-6175.2002.01035.x>
3. Su DF, Miao CY. Reduction of blood pressure variability: a new strategy for the treatment of hypertension. *Trends Pharmacol Sci* 2005; 26: 388-90. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2005.06.003>
4. Parati G, Ochoa JE, Lombardi C, Bilo G. Blood pressure variability: assessment, predictive value, and potential as a therapeutic

- target. *Curr Hypertens Rep* 2015;17:537. <https://doi.org/10.1007/s11906-015-0537-1>
5. Stergiou GS, Palatini P, Asmar R, Bilo G, de la Sierra A, Head G, y cols. Blood pressure monitoring: theory and practice. European Society of Hypertension Working Group on Blood Pressure Monitoring and Cardiovascular Variability Teaching Course Proceedings. *Blood Press Monit* 2018;23:1-8. <https://doi.org/10.1097/MBP0000000000000301>
 6. Flack JM, Nasser SA. Benefits of once-daily therapies in the treatment of hypertension. *Vasc Health Risk Manag* 2011;7:777-87. <https://doi.org/10.2147/VHRM.S17207>
 7. Dandona P, Ghanim H, Brooks DP. Antioxidant activity of carvedilol in cardiovascular disease. *J Hypertens* 2007;25:731-41. <https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e3280127948>
 8. Höcht C, Bertera FM, Del Mauro JS, Santander Plantamura Y, Taira CA, Polizio AH. What is the Real Efficacy of Beta-Blockers for the Treatment of Essential Hypertension? *Curr Pharm Des.* 2017;23:4658-77. <https://doi.org/10.2174/1381612823666170608085109>
 9. El-Say KM, Hosny KM. Optimization of carvedilol solid lipid nanoparticles: An approach to control the release and enhance the oral bioavailability on rabbits. *PLoS One* 2018;13:e0203405. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203405>
 10. Sharma M, Sharma R, Jain DK, Saraf A. Enhancement of oral bioavailability of poorly water soluble carvedilol by chitosan nanoparticles: Optimization and pharmacokinetic study. *Int J Biol Macromol* 2019;135:246-60. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.162>
 11. Lal Pal S, Jana U, Mohanta GP, Manna PK. Preparation and Physico-Chemical Characterization of Carvedilol-Eudragit® RS100 Nanoparticles. *World J Pharmaceut Res* 2018;7:1436-51.
 12. Del Mauro JS, Prince PD, Donato M, Fernandez Machulsky NH, Moretton MA, González GE, Bertera FM, Carranza A, Gorzalczy SB, Chiappetta DA, Berg G, Morales C, Gelpi RJ, Taira CA, Höcht C. Effects of Carvedilol or Amlodipine on Target Organ Damage in L-Name Hypertensive Rats: Their Relationship with Blood Pressure Variability. *J Am Soc Hypertens* 2017;11:227-40. <https://doi.org/10.1016/j.jash.2017.02.007>
 13. Wegmann M, Parola L, Bertera FM, Taira CA, Cagel M, Buon-tempo F, Bernabeu E, Höcht C, Chiappetta DA, Moretton MA. Novel carvedilol paediatric nanomicelle formulation: in-vitro characterization and in-vivo evaluation. *J Pharm Pharmacol* 2017;69:544-53. <https://doi.org/10.1111/jphp.12605>
 14. Grassi G, Ram VS. Evidence for a critical role of the sympathetic nervous system in hypertension. *J Am Soc Hypertens* 2016;10:457-66. <https://doi.org/10.1016/j.jash.2016.02.015>
 15. Wiysonge CS, Bradley HA, Volmink J, Mayosi BM, Opie LH. Beta-blockers for hypertension. *Cochrane Database Syst Rev* 2017;1: CD002003. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD002003.pub5>
 16. Chen YJ, Li LJ, Tang WL, Song JY, Qiu R, Li Q, et al. First-line drugs inhibiting the renin angiotensin system versus other first-line antihypertensive drug classes for hypertension. *Cochrane Database Syst Rev* 2018;11:CD008170. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD008170.pub3>
 17. Dahlöf B, Sever PS, Poulter NR, Wedel H, Beevers DG, Caulfield M, et al.; ASCOT Investigators. Prevention of cardiovascular events with an antihypertensive regimen of amlodipine adding perindopril as required versus atenolol adding bendroflumethiazide as required, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial-Blood Pressure Lowering Arm (ASCOTBPLA): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet* 2005;366: 895-906. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67185-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67185-1)
 18. Gosse P, Neutel JM, Schumacher H, Lacourciere Y, Williams B, Davidai G. The effect of telmisartan and ramipril on early morning blood pressure surge: a pooled analysis of two randomized clinical trials. *Blood Press Monit* 2007;12:141-7. <https://doi.org/10.1097/MBP0b013e3280b10bbd>
 19. Carcaboso AM, Chiappetta DA, Höcht C, Blake MG, Boccia MM, Baratti CM, Sosnik A. In vitro/in vivo characterization of melt-molded gabapentin-loaded poly(epsilon-caprolactone) implants for sustained release in animal studies. *Eur J Pharm Biopharm* 2008;70:666-73. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.05.031>
 20. Linn M, Collnot EM, Djuric D, Hempel K, Fabian E, Kolter K, Lehr CM. Soluplus® as an effective absorption enhancer of poorly soluble drugs in vitro and in vivo. *Eur J Pharm Sci* 2012;45:336-43. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2011.11.025>