



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**LIBERACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO Y ANTAGONISMO DE LA
ENTRADA DE CALCIO INDUCIDA POR EL (\pm) METOPROLOL Y
ALGUNOS ANÁLOGOS DE SÍNTESIS RECIENTE EN ANILLOS DE
AORTA DE RATAS WISTAR**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A

JESSICA EDITH RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ

**Dr. Enrique Hong Chong
Director de tesis**

**M. en C. José Ignacio Regla Contreras
Asesor de tesis**

MARZO 2005



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

En especial agradezco al Dr. Enrique Hong que con su paciencia y apoyo, así como con el aporte de sus conocimientos y su ejemplo me permitió realizar mi trabajo de tesis.

Agradezco al profesor Ignacio Regla por el apoyo incondicional que me brindó para conseguir la estancia dentro del CINVESTAV y durante la realización de este trabajo.

Al Sr. Julio Sánchez por ser una persona excepcional que me dió su ayuda en todo momento. A los señores Gerardo Rivera, al M. en C. Miguel Ángel Rosas, al Dr. Santiago Villafaña, Marlene, Norma y Oyuki por su ayuda y por su invaluable amistad en el laboratorio 1 del CINVESTAV.

Al Q.F.B. Roberto Melgar por su colaboración para la realización de los compuestos análogos del Metoprolol.

Al Dr. Mario L. Calcagno y a la Q.F.B. Leticia Vázquez por permitirme la búsqueda de información dentro de sus instituciones.

Agradezco a la Q.F.B. Galia Martínez por su comprensión, su ayuda y por ser una excelente profesora en la FES Zaragoza.

A la profesora Estelita Valencia por ser una profesora que apoya incondicionalmente a sus alumnos y a la profesora Ma. Teresa Griselda Fuentes por sus comentarios sobre mi trabajo.

Quiero agradecer al CONACYT por la beca otorgada en el tiempo de realización de la tesis.

AGRADECIMIENTOS

A mis papás Ofelia y José Luis Rodríguez les dedico todo el esfuerzo de mi trabajo con mucho amor y respeto para ustedes, por todo el cariño, comprensión y paciencia que han tenido conmigo, que me permitieron salir adelante tanto en mis estudios como en mi vida.

A mis hermanos Cyntia, Adriana, José Luis y Edgar, a mis sobrinos Daniel y Erin por tantos momentos inolvidables.

A mis abuelitas Emilia y Ramoncita, a mi tía Meche.

A todos los amigos con quienes durante todo el recorrido he compartido un pedacito de mí, que lograron con su compañía y con todos los momentos felices que pasamos juntos que el camino fuera más sencillo. Gracias Azucena, Linda, Marcos, Oto, Araceli, Kari, Allan, Chivis, Ericka y Richard.

*Por que no hay forma de agradecer todo lo que has logrado en mí, y porque me das
los mejores momentos en mi vida. Por estar siempre conmigo y
porque te quiero como no te imaginas para ti **Juan Pablo**.*

CON AMOR Y RESPETO POR TODOS USTEDES

JESSICA E. RODRÍGUEZ

CONTENIDO

<i>CONTENIDO</i>	<i>PÁGINA</i>
1. Introducción	1
2. Resumen	2
3. Marco Teórico	3
3.1 Hipertensión	5
3.1.1 Clasificación de la Hipertensión	6
3.2 Tratamiento Farmacológico Antihipertensivo	9
3.2.1 Clasificación de los fármacos antihipertensivos de acuerdo a su mecanismo de acción	10
3.3 Antagonistas β-adrenérgicos	17
3.3.1 Clasificación de los bloqueadores adrenérgicos β	19
3.3.2 Actividad Simpaticomimética Intrínseca (ASI)	19
3.3.3 Metoprolol	21
3.3.4 Mecanismo de acción del Metoprolol	24
3.4 Factores Vasculares que regulan la presión sanguínea	25
3.4.1 Óxido Nítrico	26
3.4.2 Prostaglandinas	28
3.4.3 Factor Hiperpolarizante Derivado del Endotelio (FHDE)	30
4. Planteamiento del problema	32

CONTENIDO

<i>CONTENIDO</i>	<i>PÁGINA</i>
5. Objetivos	33
6. Hipótesis	34
7. Material, Reactivos y Equipo	35
8. Metodología Experimental	38
8.1 Procedimiento general para la preparación de anillos aórticos y aurículas de rata	38
8.2 Efecto del Metoprolol y los compuestos análogos 7D1,7D2 8D1 y 8D2 sobre la respuesta inducida por el Isoproterenol en aurículas de rata	39
8.3 Efecto de los inhibidores L-NAME, Indometacina, Clotrimazol y TEA en anillos de aorta precontraídos con fenilefrina 10^{-6} M	39
8.4 Efecto del Metoprolol y los análogos 7D1, 7D2, 8D1 y 8D2 en anillos precontraídos con potasio 80 mM	40
8.5 Curva concentración - respuesta a calcio en anillos despolarizados con potasio 80 mM en Krebs sin cloruro de calcio	40
9. Resultados	41
10. Discusión de Resultados	61
11. Conclusiones	66
12. Referencias	67

1. INTRODUCCIÓN

Se ha demostrado que los fármacos que bloquean los receptores adrenérgicos β_1 como el Metoprolol reducen la presión arterial sanguínea, por lo que se utilizan en el control de esta enfermedad; sin embargo, su mecanismo de acción es aún controvertido. Dentro de los efectos observados que expliquen este efecto se encuentran la disminución de la frecuencia cardiaca, la inhibición de la liberación de renina y la inhibición de la liberación de noradrenalina en las terminales nerviosas presinápticas, éstos efectos se presentan inmediatamente después de la administración del fármaco, pero el efecto antihipertensivo se observa hasta después de varios días de tratamiento, lo cual sugiere la existencia de algún otro mecanismo además de los propuestos anteriormente que explique el efecto antihipertensivo del Metoprolol.

En experimentos *in vivo* realizados recientemente se compararon los efectos de compuestos estructuralmente análogos a la molécula del Metoprolol¹, éstos disminuyen la frecuencia cardiaca y la presión arterial durante un tiempo breve, sin embargo, no ejercen una actividad antagonista de los receptores adrenérgicos β . Con el objeto de estudiar sus efectos cardiovasculares directos, se comprobó en aurículas de rata *in vitro* el efecto antagonista producido por el Metoprolol y los compuestos análogos (7D1, 7D2, 8D1 y 8D2) sobre la respuesta inducida por Isoproterenol; un agonista no selectivo de los receptores adrenérgicos β , encontrando que a diferencia del Metoprolol, los compuestos análogos solo producen dicho bloqueo en altas concentraciones.

2. RESUMEN

Se realizaron en este estudio experimentos con anillos de aorta torácica de ratas macho Wistar para evaluar los cuatro compuestos análogos (7D1, 7D2, 8D1 y 8D2) comparando su efecto con el producido por el Metoprolol en presencia de algunos inhibidores de mecanismos que participan en el efecto vasodilatador, como el éster metílico de la N-nitro-L-arginina (L-NAME); inhibidor de la sintasa de óxido nítrico, Indometacina; inhibidor de la liberación de prostaglandinas, Tetraetilamonio (TEA); inhibidor de los canales de potasio y Clotrimazol; inhibidor de la síntesis del factor hiperpolarizante inducido por Citocromo P₄₅₀. Así como también se observó la respuesta producida por el Metoprolol y los compuestos análogos al realizar una curva concentración-respuesta a calcio en un medio desprovisto de éste en anillos despolarizados con una solución de potasio 80 mM.

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que el Metoprolol en adición al bloqueo de los receptores β_1 , también induce la liberación de óxido nítrico y bloquea la entrada de calcio al músculo liso vascular; aunque éstos efectos se observaron a concentraciones altas, es posible que también contribuyan al efecto antihipertensivo del Metoprolol.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 HIPERTENSIÓN

Es bien conocido que el aumento de la presión arterial en condiciones naturales está influenciado por factores ambientales, como la ira, el miedo, dolor, el frío y el ejercicio, entre otras cosas; así como también tiende a decaer durante el sueño. A un aumento de la presión arterial fuera de estas condiciones se le conoce como *hipertensión arterial*².

La hipertensión arterial afecta aproximadamente al 16 % de la población mundial³. Es la principal causa de accidentes vasculares, cerebrales e insuficiencia cardiaca, provoca daños de las arterias coronarias con infarto al miocardio y muerte súbita, insuficiencia renal y aneurismas de la aorta, también produce hemorragias de la retina que disminuyen el campo visual.

En México, este grupo de enfermedades constituye un problema de salud pública, y al igual que ocurre en otros países del mundo, es el resultado de esta escalada epidemiológica; las enfermedades del corazón constituyen la primera causa de muerte y anualmente ocurren cerca de 70 000 defunciones por este motivo y 26,000 por enfermedades cerebrovasculares causadas predominantemente por la hipertensión arterial^{4,5} (Fig.1).

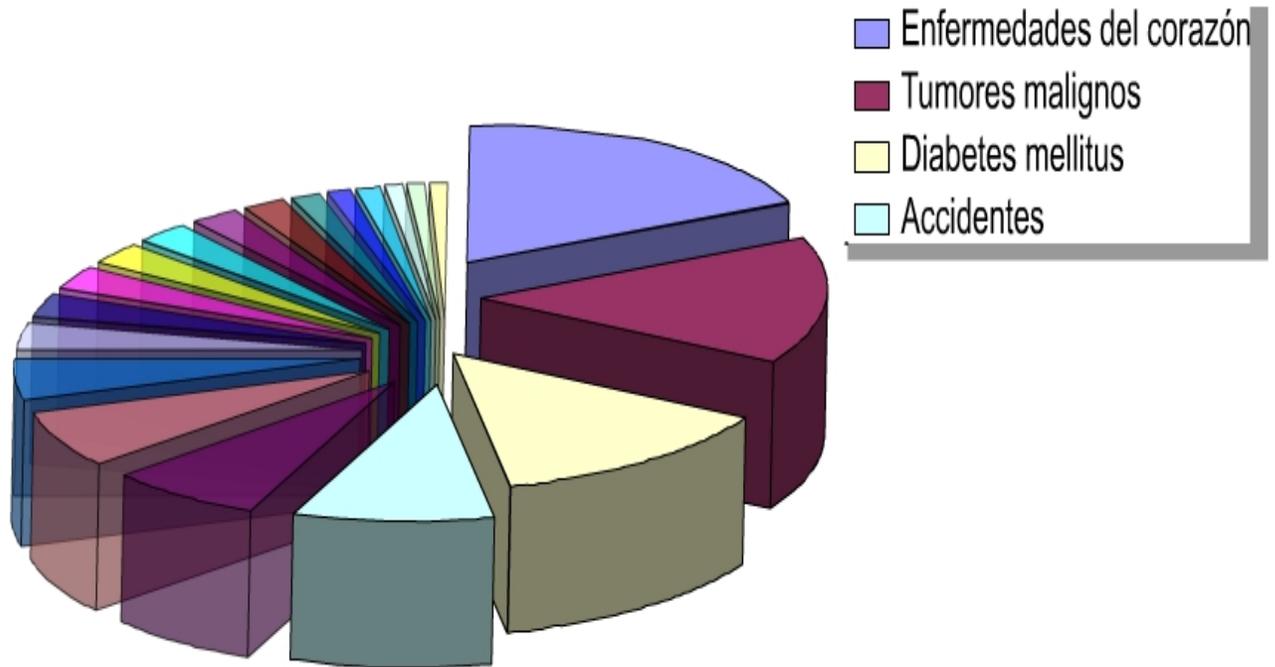


Fig. 1. Prevalencia de enfermedades del corazón causadas por la hipertensión arterial en México. Fuente: INEGI. 2003

3.1.1 Clasificación de la Hipertensión

La hipertensión se divide principalmente en dos tipos: *hipertensión secundaria*, cuando el aumento de presión arterial es consecuencia de otro trastorno o puede atribuirse a una causa claramente identificable; e *hipertensión esencial* cuando la causa fundamental se desconoce; en clínica, un 90 % de los casos se deben a este tipo de hipertensión⁶.

Clasificación de la hipertensión por tipo:

La presión arterial elevada causa varios trastornos graves; sin embargo, un aumento en la presión arterial sistólica es de mayor importancia y mayor riesgo que el aumento de la presión diastólica. Una causa importante de elevación de la presión sistólica es la capacidad de distensión disminuida de las arterias cuando sus paredes se tornan más rígidas. Al mismo valor de gasto cardiaco, la presión sistólica es mayor en ancianos que en jóvenes porque hay menor elasticidad².

- ◆ Hipertensión sistólica: solo existe aumento de la presión sistólica y puede ocurrir en las siguientes condiciones:
 - Incremento del gasto cardiaco por el ventrículo izquierdo (bloqueo completo del corazón, reflujo aórtico, fistula arteriovenosa, tirotoxicosis, etc.)
 - Incremento de la rigidez de la aorta con daño degenerativo de la pared.
 - Coartación de la aorta.

- ◆ Hipertensión en la cual ambas presiones sistólica y diastólica aumentan, se presenta en las patologías siguientes:
 - Enfermedades de los riñones y del tracto urinario.
 - Nefritis tipo I.
 - Nefritis tipo II.

Clasificación de la hipertensión por grado:

Las fases malignas y benignas de la hipertensión².

La hipertensión maligna ocurre a cualquier edad, pero se presenta más frecuentemente en jóvenes, se caracteriza por una neuroretinopatía y por una rápida disminución en la función renal. La presión de éstos pacientes es usualmente muy alta, mueren algunos meses o pocos años después de que se les diagnostica daño renal, daños vasculares o hemorragia cerebral.

La hipertensión benigna se presenta con la edad, su presión no tiende a ser tan alta como en la hipertensión maligna. La condición de estas personas es estable durante años hasta que finalmente mueren, principalmente por enfermedades cardiovasculares.

Tabla 1. Presión arterial para adultos de 18 años en adelante. Esta clasificación se basa en la media de dos o más mediciones de presión arterial³.

Clasificación P.A.	P.A. Sistólica(mmHg)	P.A. Diastólica(mmHg)
Normal	<120	y <80
Prehipertensión	120-139	ó 80-89
Hipertensión Fase 1	140-159	ó 90-99
Hipertensión Fase 2	≥ 160	ó ≥ 100

Existe controversia acerca de donde trazar el límite entre los valores de presión normal y elevada, particularmente en los pacientes de edad avanzada; sin embargo se ha observado que en pacientes aparentemente sanos, tanto la presión sistólica como la diastólica se elevan con la edad⁸, así a valores de presión arterial sistólica y diastólica mayores de 120/80 mmHg , pero menores que los valores de presión establecidos para la hipertensión en fase 1, se le ha denominado prehipertensión (Tabla 1).

Pacientes prehipertensos con valores de presión arterial entre 130-139 / 80-89 mmHg, tienen el doble de riesgo de desarrollar hipertensión, que aquellos pacientes con valores ligeramente más bajos.

La presión arterial sistémica, es la presión que impulsa la circulación capilar sanguínea a través del cuerpo. Estos niveles de presión sanguínea varían en cada individuo, en diferentes condiciones y diferentes tiempos. Disminuye durante el sueño y aumenta durante estrés emocional o ejercicio muscular intenso⁷.

3.2 TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO ANTIHIPERTENSIVO

La presión arterial es el producto del gasto cardiaco y la resistencia periférica, por lo que en hipertensión, la presión puede disminuirse con fármacos que tengan una acción directa sobre uno de estos dos mecanismos o en ambos. Los fármacos antihipertensivos reducen el gasto cardiaco por medio de la inhibición de la contractilidad miocárdica o por la reducción de la presión de llenado ventricular; ésta última, a su vez, puede llevarse a cabo por acciones sobre el tono venoso o por efectos sobre el volumen sanguíneo vía renal. Una reducción de la resistencia periférica puede llevarse a cabo mediante fármacos que actúen directamente sobre el músculo liso causando relajación, o, interfiriendo con la actividad de los mecanismos que producen vasoconstricción de los vasos sanguíneos resistentes⁹.

El paso inicial para el control de la hipertensión arterial debe ser un tratamiento no farmacológico, por lo que es necesario realizar ejercicio físico por lo menos 30 min. cuatro veces por semana, modificar hábitos alimenticios como la disminución en el consumo de sodio (70-100 meq por día), grasas y carbohidratos, además evitar el tabaco y el consumo de alcohol. Para un tratamiento farmacológico, la selección de algún fármaco debe ser de acuerdo a los niveles de presión sanguínea de cada paciente, si presenta o no otras enfermedades y la presencia de órganos dañados².

3.2.1 CLASIFICACIÓN DE LOS FÁRMACOS ANTIHIPERTENSIVOS DE ACUERDO A SU MECANISMO DE ACCIÓN^{9, 10, 11}.

DIURÉTICOS

Los diuréticos deben inducir inicialmente la natriuresis para reducir el volumen sanguíneo. Esto activa los diversos mecanismos responsables del mantenimiento del volumen de líquidos, en particular el sistema renina-angiotensina-aldosterona; a su vez, limitan el grado de depleción del volumen, disminuyendo la resistencia vascular periférica.

- a) Tiazidas. Son derivados de sulfonamidas que hacen que de un 5 a 8 % de la carga de sodio filtrada, sea excretada al bloquear la reabsorción en la porción inicial del túbulo distal en el segmento de dilución cortical.

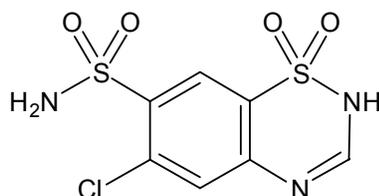


Fig. 2. Estructura de la Clorotiazida.

- b) Diuréticos de asa. Ejercen un efecto natriurético de tres o cuatro veces mayor que los diuréticos tiazídicos, bloqueando la reabsorción de cloruro de sodio en la porción ascendente del asa de Henle.

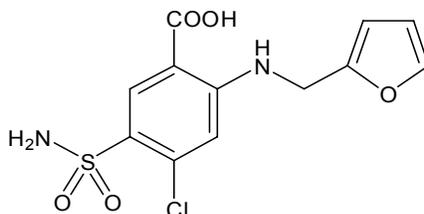


Fig. 3. Estructura de la Furosemida.

- c) Agentes ahorradores de Potasio. Reducen el desperdicio de potasio inducido por tiazida y tratan específicamente el hiperaldostronismo.

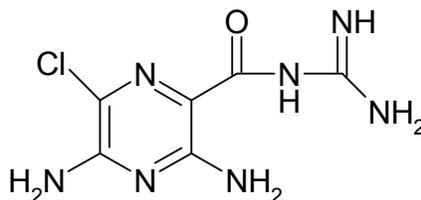


Fig. 4. estructura de la amilorida.

FÁRMACOS SIMPATOLÍTICOS

Estos fármacos disminuyen la presión sanguínea reduciendo la resistencia vascular periférica, inhibiendo la función cardíaca e incrementando la capacidad venosa (estos dos últimos efectos reducen el gasto cardíaco).

- a) Agonistas centrales. Actúan como agonistas de los receptores α_2 , principalmente en centros vasomotores dentro del cerebro (tracto solitario), disminuyendo el flujo simpático del Sistema Nervioso Central (SNC). El gasto cardíaco disminuye ligeramente pero el principal efecto hemodinámico es una disminución en la resistencia vascular periférica.

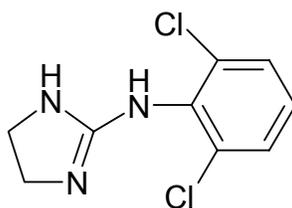


Fig. 5. Estructura de la clonidina.

- b) Bloqueadores Ganglionares. El bloqueo de los ganglios simpáticos interrumpe el control adrenérgico de las arteriolas resultando una vasodilatación; mejorando el flujo sanguíneo periférico en algunas camas vasculares y disminuyendo la presión sanguínea.

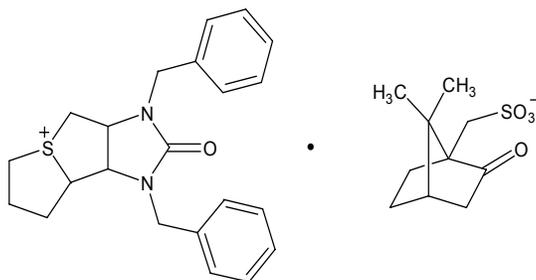


Fig. 6. Estructura del camsilato de Trimetafán.

- c) Inhibidores Adrenérgicos Periféricos. Inhiben la actividad del sistema nervioso adrenérgico (simpático). Los lugares primarios de acción varían desde el cerebro hasta las neuronas periféricas. Actúan como antagonistas competitivos de los receptores α y β adrenérgicos.

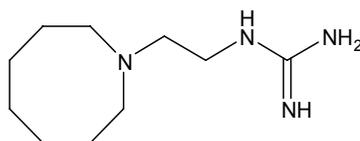


Fig. 7. Estructura de la guanetidina.

- d) Antagonistas adrenérgicos β . Reducen el gasto cardiaco, inhiben la liberación de renina, reducen la liberación de noradrenalina de las terminales nerviosas, disminuyen la actividad vasomotora central.

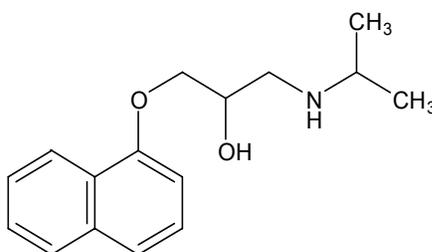


Fig. 8. Estructura del Propranolol.

- e) Antagonistas adrenérgicos α . El bloqueo de los receptores α_1 inhibe la fijación de catecolaminas por parte de las células del músculo liso inhibiendo la vasoconstricción e induciendo la vasodilatación periférica.

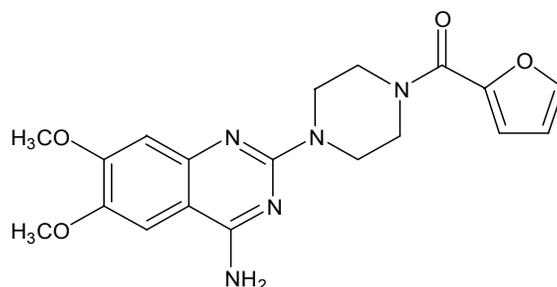


Fig. 9. Estructura de la Prazocina.

VASODILATADORES

Estos fármacos reducen la presión arterial sanguínea por medio de la relajación del músculo liso vascular, dilatando los vasos de resistencia e incrementando la capacidad venosa.

- a) Acción Directa. Actúan directamente sobre las arteriolas, abriendo los canales de potasio. Inducen una dilatación importante de las arteriolas de resistencia con una disminución en la resistencia periférica.

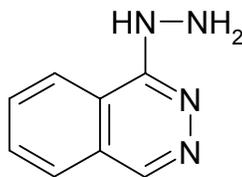


Fig. 10. Estructura de la Hidralazina.

- b) Bloqueadores de la entrada de calcio. Disminuyen la presión sanguínea reduciendo la entrada de calcio en las células vasculares del músculo liso. La disminución en el calcio intracelular libre reduce el tono y la contractilidad vascular. Disminuye la resistencia periférica y la presión sanguínea.

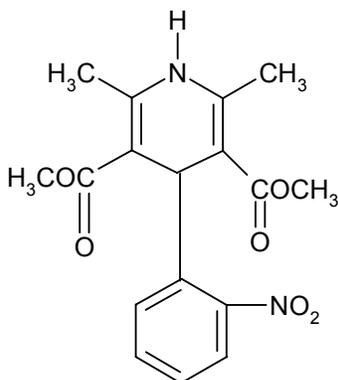


Fig. 11. Estructura de la Nifedipina.

- c) Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina. La conversión de la angiotensina inactiva (A-I) a la angiotensina II (A-II), vasoconstrictora potente se logra mediante la acción de la enzima convertidora de angiotensina (ECA). Los inhibidores de ECA bloquean la síntesis de A-II disminuyendo la presión arterial. Se inhibe la síntesis de aldosterona mediada por A-II, por lo que se reduce la retención de sodio y la pérdida de potasio.

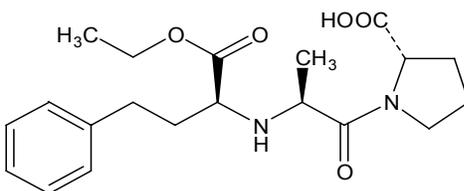


Fig. 12. estructura del Enalapril.

- d) Antagonistas del receptor a Angiotensina I (AT1). Los fármacos bloqueadores del receptor AT1 disminuyen la presión arterial sanguínea revirtiendo los efectos de la A-II: 1) respuestas presoras lentas y rápidas, 2) efectos estimulantes en el sistema nervioso simpático, 3) todos los efectos del SNC (liberación de vasopresina p.ej.), 4) liberación de catecolaminas, etc.

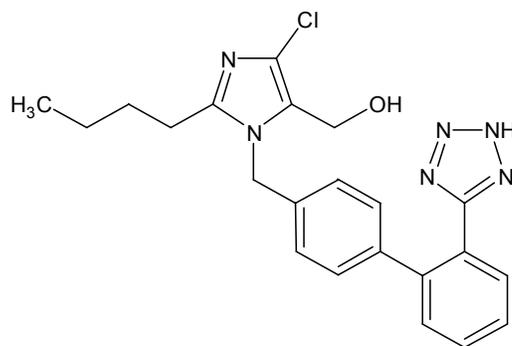


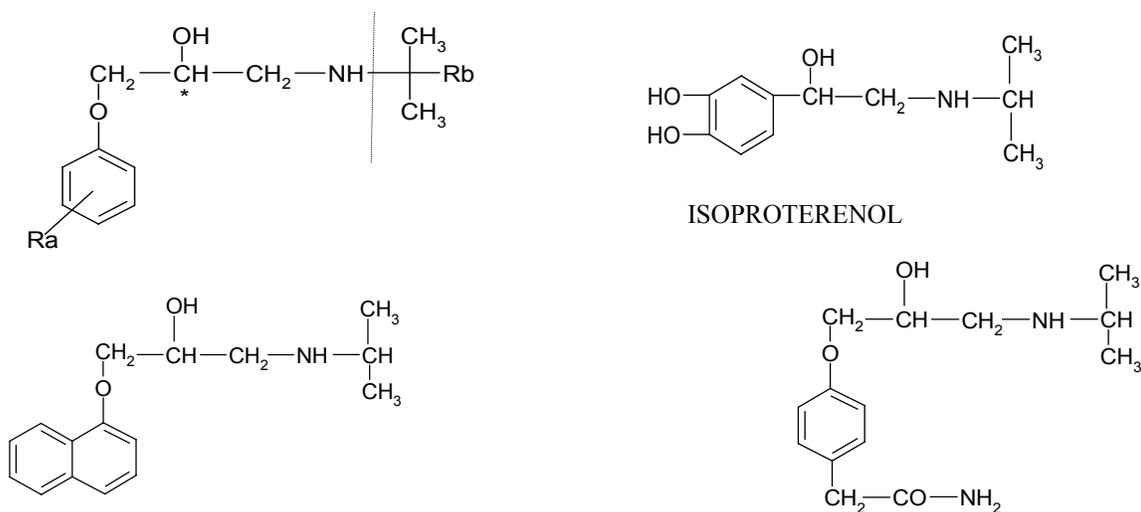
Fig. 13. Estructura del Losartán.

3.3 ANTAGONISTAS ADRENÉRGICOS β

Los antagonistas adrenérgicos β son fármacos que inhiben competitivamente los efectos de las catecolaminas causando relajación del músculo liso y consecuentemente vasodilatación, broncodilatación y estimulación cardiaca.

Los bloqueadores β son estructuralmente similares a las catecolaminas y al Isoproterenol, con el cual tienen en común un anillo aromático con una cadena alifática. La posición del grupo hidroxilo en el átomo de carbono asimétrico influye en la afinidad con el receptor β (Fig. 14). Los sustituyentes en el anillo aromático determinan los cambios en sus propiedades farmacológicas; la actividad agonista intrínseca, propiedades de estabilización de membrana y la selectividad por los receptores β_1 o β_2 ¹¹⁻¹³.

La actividad antagonista de los receptores adrenérgicos β se limita al isómero *levorotatorio* del compuesto, pero para propósitos clínicos se utilizan preparaciones racémicas.



PROPRANOLOL

BLOQUEADOR NO SELECTIVO

ATENOLOL

BLOQUEADOR SELECTIVO β_1

Fig. 14. La estructura básica de los bloqueadores β consiste en una cadena alifática y una estructura aromática (arriba izquierda) similar a la estructura del Isoproterenol. El sustituyente en el radical Ra determina la potencia del efecto beta-bloqueador. La parte central de la molécula muestra un carbono asimétrico. La sustitución del radical Rb por un hidrógeno resulta en un grupo isopropilo y la sustitución por un metilo, en un grupo terbutilo que determina la afinidad del bloqueador por el receptor β adrenérgico. La parte inferior de la figura muestra la estructura de dos bloqueadores-beta para demostrar la similitud que existe con el Isoproterenol.

3.3.1 CLASIFICACIÓN DE LOS ANTAGONISTAS ADRENÉRGICOS β

Los antagonistas β se clasifican de acuerdo a su selectividad por los receptores, siendo no selectivos cuando presentan afinidad por ambos receptores β_1 y β_2 y cardioselectivos cuando solo tienen afinidad por los receptores β_1 . Así como también si poseen actividad simpaticomimética intrínseca (ASI), es decir que tienen un efecto inicial agonista beta adrenérgico (Tabla 2).

Los bloqueadores del receptor adrenérgico β_1 disminuyen la frecuencia cardíaca y reducen la contractilidad del miocardio, reduciendo el gasto cardíaco y el consumo de oxígeno, así como también la liberación de renina. Los receptores adrenérgicos β_2 antagonizan la relajación en el músculo liso vascular y bronquial inducida por las catecolaminas produciendo una vasoconstricción, por lo que el bloqueo de éstos receptores no participa en el efecto antihipertensivo.

3.3.2 ACTIVIDAD SIMPATICOMIMÉTICA INTRÍNSECA (ASI)

Los fármacos que bloquean los receptores adrenérgicos β actúan como antagonistas competitivos, previniendo el acceso de las catecolaminas al sitio receptor. Algunos de estos fármacos provocan una respuesta agonista cuando interactúan con el receptor β , esta respuesta es inversamente proporcional a la dosis del fármaco, a medida que la dosis aumenta, el efecto agonista es relativamente menor comparado con la acción antagonista del beta bloqueador. La actividad agonista es competitiva y puede bloquearse con dosis altas de un bloqueador que no posea esta propiedad.

Tabla 2. Clasificación de los antagonistas adrenérgicos β

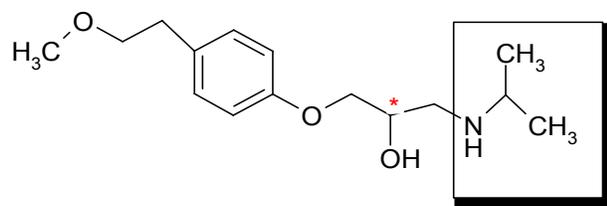
	Con ASI	Sin ASI
Cardioselectivo (β_1)	Acebutolol	Atenolol Metoprolol
No Cardioselectivo $(\beta_1 + \beta_2)$	Pindolol Oxprenolol	Nadolol Propranolol Timolol Sotalol
Bloqueadores $\alpha + \beta$	Labetalol	Bucindolol

ASI: actividad simpaticomimética intrínseca

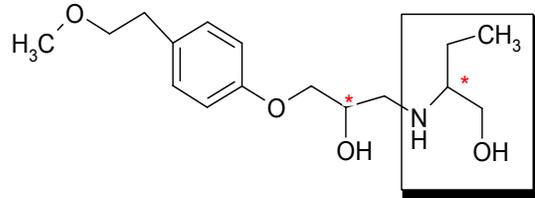
3.3.3 (±) METOPROLOL

El (±) Metoprolol es un compuesto lipofílico, reconocido como bloqueador β con afinidad por los receptores adrenérgicos β_1 que predominan en el músculo cardíaco, también presenta afinidad aunque en menor grado por los receptores β_2 que se localizan en los tejidos bronquial y vascular. La eficacia de Metoprolol en el tratamiento de la hipertensión y angina de pecho está asociada al bloqueo β de las catecolaminas; sustancias que producen incremento en la fuerza, frecuencia y la velocidad contráctil del miocardio⁶.

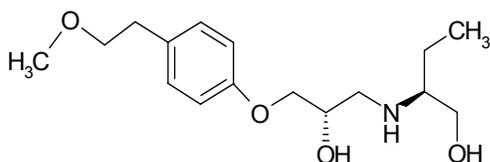
El Metoprolol se administra como mezcla racémica para el tratamiento de la hipertensión, los dos enantiómeros presentan diferentes afinidades en el bloqueo de los receptores adrenérgicos β_1 , en donde el enantiómero (S) es más activo farmacológicamente. Recientemente se describió la síntesis y evaluación de la actividad antihipertensiva de 4 nuevos análogos del Metoprolol que incorporan en su estructura un nuevo centro estereogénico¹ (Fig.15). Estos análogos son capaces de disminuir la presión arterial y la frecuencia cardíaca por un periodo de tiempo breve, sin antagonizar los receptores adrenérgicos β , por lo que se supone que el Metoprolol al ser la molécula original de la síntesis de estos nuevos compuestos, posee un mecanismo de acción adicional al bloqueo de los receptores adrenérgicos β_1 que provoca la caída en la presión arterial.



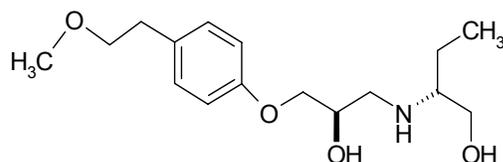
METOPROLOL



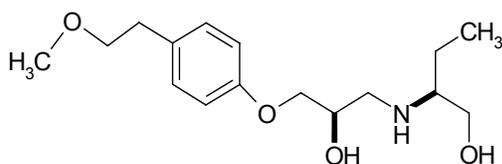
ANÁLOGOS



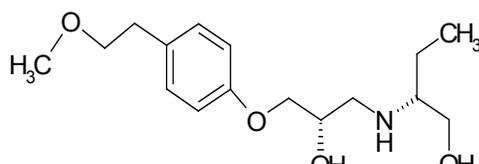
(2S, 2'S)-7 7D1



(2R, 2'R)-8 8D1



(2R, 2'S)-7 7D2



(2S, 2'R)-8 8D2

Fig.15. Análogos del Metoprolol. El grupo metilo de la molécula original del Metoprolol, se sustituyó por un grupo etilo, en tanto que, el grupo metilo de la parte inferior de la figura es hidroxilado, formando un nuevo centro estereogénico en la molécula.

El Metoprolol después de su administración oral se absorbe casi completamente, sin embargo, su biodisponibilidad es relativamente baja (40 % aproximadamente). Su unión con proteínas plasmáticas es de poca importancia (12 %) y su volumen de distribución es de aproximadamente 4.5 L / Kg. El Metoprolol se elimina principalmente por metabolismo hepático incluyendo reacciones de α -hidroxilación (α -hidroximetoprolol) y O-dealquilación O-dimetilmetoprolol¹⁵.

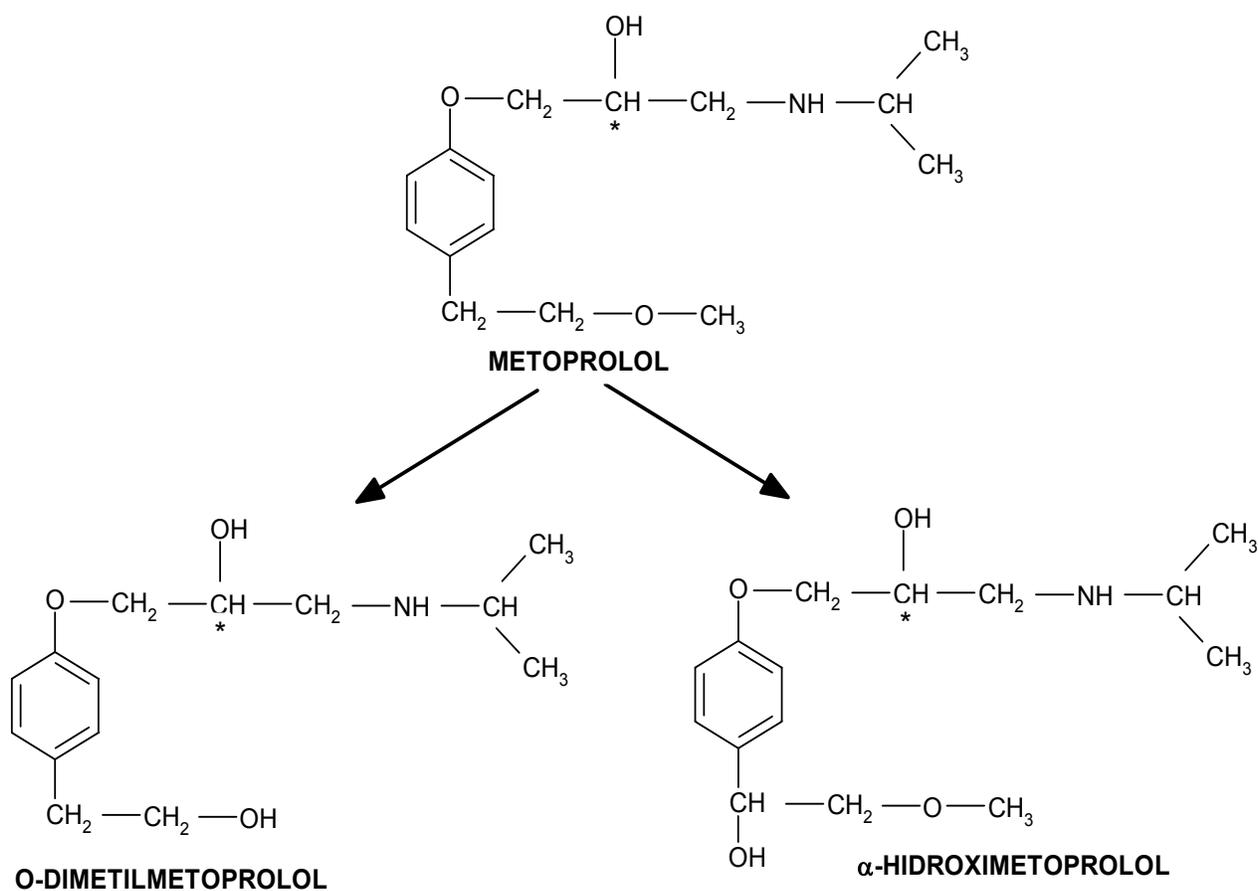


Fig. 16. Principales metabolitos del Metoprolol.

3.3.4 MECANISMO DE ACCIÓN DEL METOPROLOL

El mecanismo de acción del Metoprolol aun no se encuentra del todo dilucidado. Hasta ahora se ha observado que el efecto antihipertensivo no se presenta con el enantiómero (R) por lo que se responsabiliza principalmente al bloqueo de los receptores adrenérgicos β_1 con el enantiómero (S), así como también se involucran algunos otros mecanismos que podrían participar en dicho efecto como son: la disminución de la frecuencia y fuerza de contracción cardiaca, la supresión de la liberación de renina y el bloqueo de los receptores β presinápticos.

REDUCCIÓN DEL GASTO CARDIACO

La administración de Metoprolol disminuye el gasto cardiaco y la contractilidad miocárdica, como resultado del bloqueo de los receptores adrenérgicos β_1 por la inhibición competitiva de la acción de las catecolaminas en el miocardio, el nodo sinoauricular y posiblemente los vasos de capacitancia venosa. Inicialmente esta disminución del gasto cardiaco no se acompaña de una reducción paralela de la presión arterial, ya que la activación del reflejo simpático está mediada por los receptores adrenérgicos α_1 y α_2 en el músculo liso vascular, la resistencia vascular aumenta impidiendo la vasodilatación. El descenso de la presión arterial se produce tras varios días de tratamiento, cuando las resistencias vasculares vuelven a los valores basales y se mantiene el gasto cardiaco disminuido¹².

SUPRESIÓN DE LA LIBERACIÓN DE RENINA

El Metoprolol antagoniza la liberación de renina mediada a través de la activación de receptores β_1 ubicados en las células yuxtaglomerulares renales. Aunque se ha encontrado supresión de la renina plasmática, no ha sido posible demostrar su relación con la disminución de la presión sanguínea. Para inhibir la liberación de renina las dosis necesarias son inferiores a las dosis precisas para obtener un efecto hipotensor¹².

BLOQUEO DE RECEPTORES ADRENÉRGICOS β PRESINÁPTICOS

Estos receptores facilitan la liberación de noradrenalina por la terminal nerviosa simpática, por lo que su bloqueo reduciría el tono α -adrenérgico vascular favoreciendo la vasodilatación¹².

3.4 FACTORES VASCULARES QUE REGULAN LA PRESIÓN SANGUÍNEA

La respuesta de los vasos sanguíneos a una gran variedad de agonistas vasoactivos está modulada por la presencia de células endoteliales. Estas células pueden liberar sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras. El factor más importante de relajación derivado del endotelio es el óxido nítrico¹⁶.

El endotelio vascular desempeña un importante papel en la homeostasis modulando el tono vascular del músculo liso y es el blanco principal en la hipertensión y en la arterosclerosis. Las células endoteliales producen varias sustancias vasodilatadoras como el óxido nítrico, factores hiperpolarizantes derivados del endotelio y prostaglandinas vasodilatadoras¹⁷.

3.4.1 ÓXIDO NÍTRICO

El óxido nítrico (ON) es un radical libre que puede actuar como una sustancia reguladora intra o extracelularmente ya sea como neurotransmisor, autacoide o una sustancia paracrina. El ON tiene diversas funciones fisiológicas, entre ellas, la de regular la relajación del músculo liso vascular, la agregación plaquetaria, la neurotransmisión ganglionar y la secreción de insulina, entre otras³.

El ON se sintetiza a partir de uno de los átomos de nitrógeno guanidino terminales de la L-arginina, por acción de la sintasa de óxido nítrico (SON), siendo los productos terminales de la reacción el ON y la L-citrulina. La enzima utiliza como cofactores al NADPH, FAD, tetrahidrobiopterina y hierro. Algunas isoformas de la SON son dependientes de calcio y calmodulina¹⁶⁻²¹ (Fig.17).

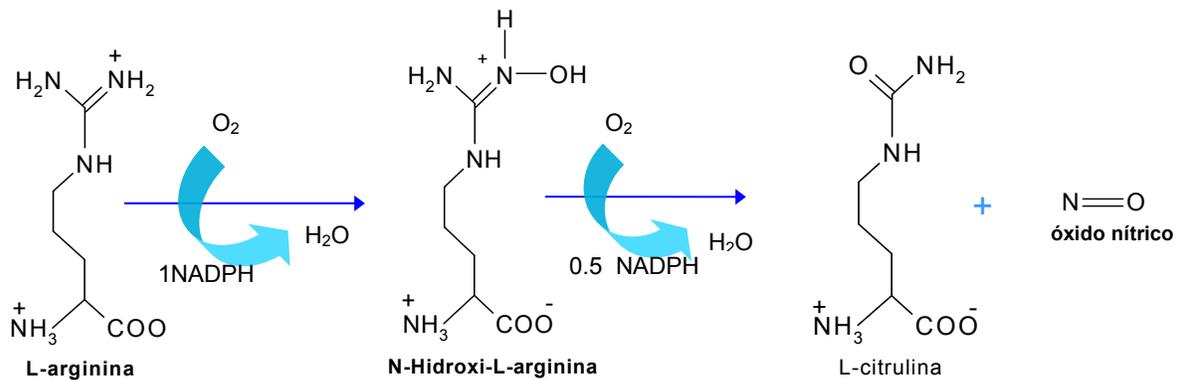


Fig.17. Producción de ON a partir de L-arginina.

El mecanismo intracelular más común de la acción de ON sobre el músculo liso vascular, es mediante la intervención del segundo mensajero GMPc. El ON se une al grupo hemo de la enzima guanilato ciclasa, el cual convierte el GTP a GMPc. El incremento de GMPc en tan solo unos segundos de exposición al ON activa a la proteína cinasa que fosforila varias proteínas involucradas en el mecanismo de la relajación del músculo liso vascular por alguno de los siguientes mecanismos: 1) la inhibición de los canales de calcio y la liberación de calcio de los almacenes intracelulares, provocando una disminución en los niveles de calcio citosólico; 2) estimulación de la ATPasa de sodio-potasio; 3) estimulación de la membrana de plasma asociada a la ATPasa de calcio; 4) inhibición de la fosfolipasa C y 5) fosforilación de las proteínas contráctiles y regulatorias por proteína cinasa G. La producción y acumulación de GMPc puede ser bloqueada por el azul de metileno, un compuesto capaz de inhibir la activación de la guanilato ciclasa citosólica por el ON²².

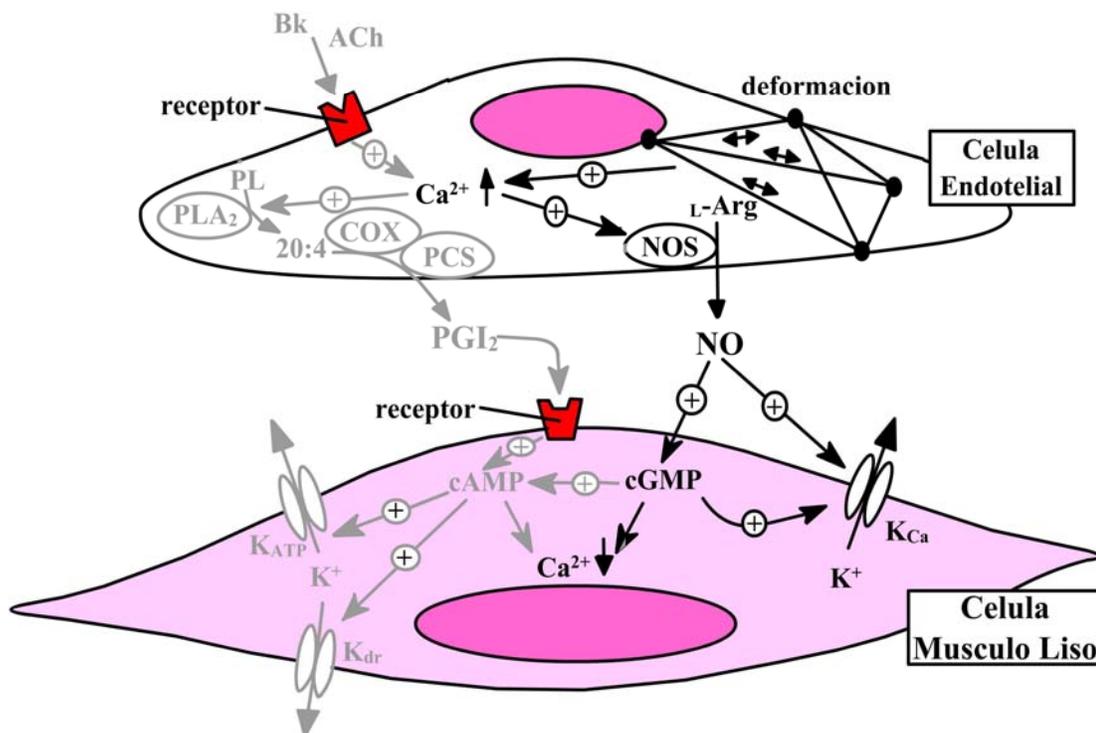


Fig. 18. Mecanismo de acción del Óxido Nítrico

3.4.2 PROSTAGLANDINAS

El ácido araquidónico (AA) se libera de algunos tejidos fosfolipídicos. Una vez libre es procesado por la ciclooxigenasa (COX), citocromo P₄₅₀ (CYP), oxigenasas o lipooxigenasas que producen una gran cantidad de eicosanoides capaces de modificar las funciones vasculares y renales.

La forma constitutiva de la COX, COX-1 está presente en la mayoría de los tejidos, la COX cataboliza el metabolismo del AA a prostaglandina H₂ (PGH₂), la cual es convertida a tromboxano A₂ (TxA₂) por la tromboxano sintasa, a prostaglandina I₂ (PGI₂ o prostaciclina) por la prostaciclina sintasa, o a prostaglandinas E₂ (PGE₂), D₂ (PGD₂) o F_{2α} (PGF_{2α}) por isomerasas específicas.

Una gran variedad de fármacos, así como también sustancias endógenas, estimulan la liberación de PGI₂. Dentro de las sustancias endógenas se incluyen: bradicinina, ésteres de colina, factor de crecimiento derivado de las plaquetas, sustancia P, ácido araquidónico, PGH₂, trombina, tripsina, factor de crecimiento epidérmico, interleucina I y nucleótidos de adenina²³.

Las PGE₂ y PGI₂ dilatan los vasos de resistencia, reducen la liberación de noradrenalina de los nervios simpáticos, atenúan las respuestas vasoconstrictoras a angiotensina II y otras hormonas vasoconstrictoras y facilitan la excreción renal de sodio y agua³.

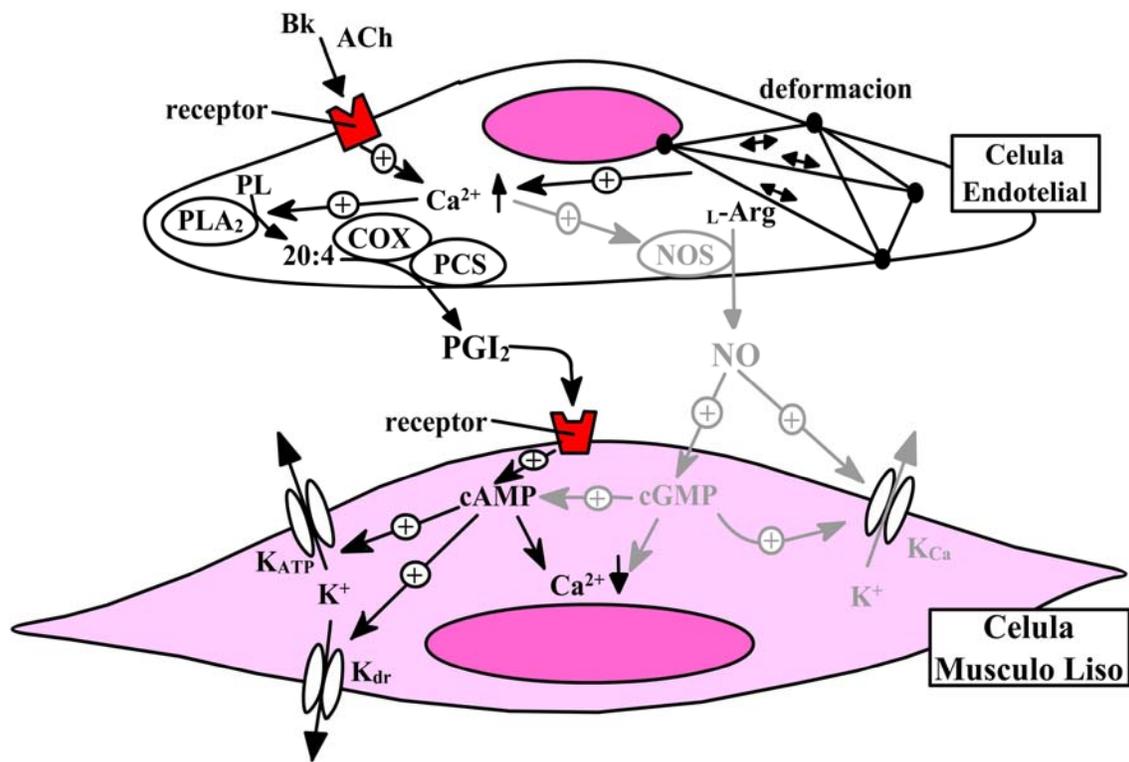


Fig.19. Mecanismo de acción de la Prostaciclina.

3.4.3 FACTOR HIPERPOLARIZANTE DERIVADO DEL ENDOTELIO (FHDE)

El endotelio vascular libera un factor difusible que hiperpolariza y relaja las células del músculo liso vascular, predominantemente a través de la activación de los canales de potasio activados por calcio. En la circulación coronaria, este factor hiperpolarizante derivado del endotelio aparece como un epóxido del citocromo P₄₅₀ derivado del ácido araquidónico. Su liberación juega un papel crucial en el mantenimiento del flujo sanguíneo coronario en la arteriosclerosis²⁴.

En las arterias coronarias de muchas especies (incluyendo al humano) y posiblemente en las arterias renales, carótida y mesentérica; un metabolito del ácido araquidónico derivado del citocromo P₄₅₀ y un ácido epoxieicosatrienoico (EET) se libera después de su estimulación con bradicinina o acetilcolina. Las células endoteliales metabolizan el ácido araquidónico por las vías de ciclooxigenasa, lipooxigenasas y citocromo P₄₅₀. La hiperpolarización por medio del FHDE comparte con el ON el hecho de que su liberación se asocia a un incremento en la concentración de calcio en las células endoteliales. Las sustancias liberadas activan los canales de potasio inducidos por calcio e hiperpolarizan y relajan el músculo liso vascular^{25,26}.

La relajación y la hiperpolarización no se altera por análogos de arginina, que inhiben la liberación de óxido nítrico o por inhibidores de la liberación de las ciclooxigenasas o lipooxigenasas; puede inhibirse por bloqueadores de los canales de potasio inducidos por calcio como el Tetraetilamonio o la caribdotoxina, pero no por inhibidores de ATP sensible a los canales de potasio como la glibenclamida²⁷.

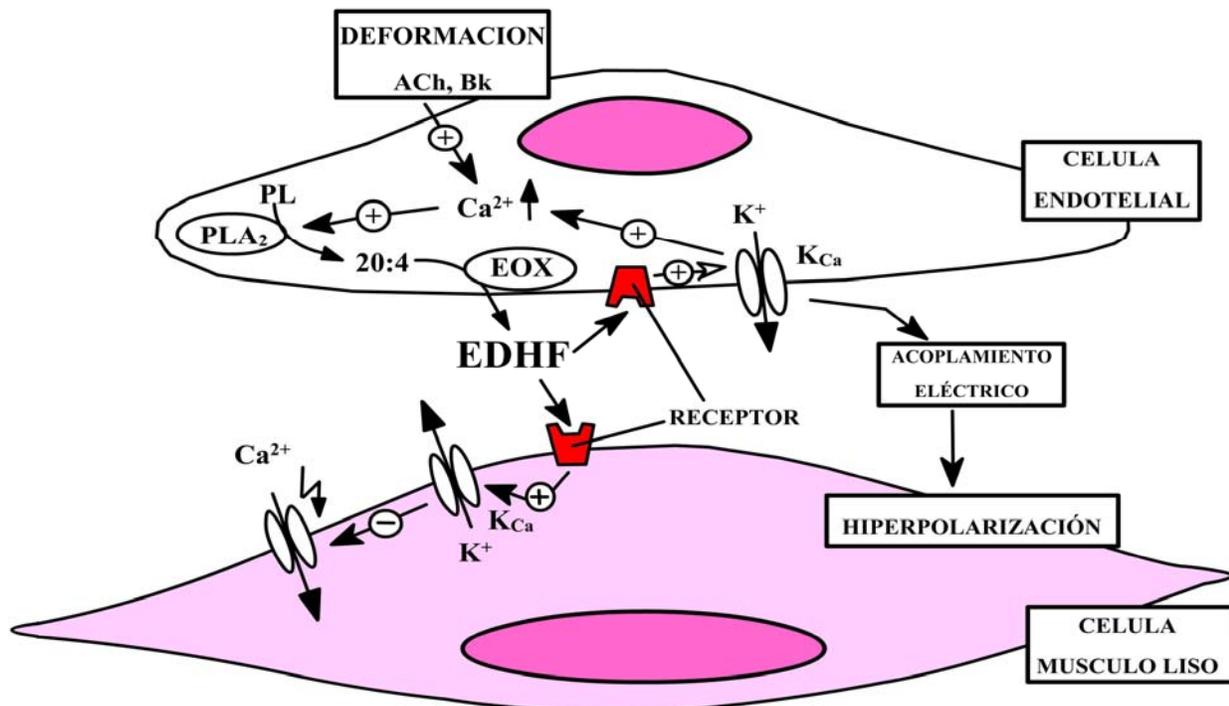


Fig.20. Síntesis del Factor Hiperpolarizante Derivado del Endotelio.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El (\pm) Metoprolol es el fármaco de elección para el tratamiento de la presión arterial en pacientes hipertensos; sin embargo, su mecanismo de acción aún es controvertido. Todos los efectos hasta ahora conocidos (la disminución de la frecuencia y fuerza de contracción cardiaca, la supresión de la liberación de renina y el bloqueo de los receptores β presinápticos) se presentan inmediatamente después de la administración del fármaco, observándose el efecto antihipertensivo hasta después de varios días de tratamiento.

Se observó en un estudio reciente que fármacos estructuralmente análogos al Metoprolol, disminuyen la presión arterial y la frecuencia cardiaca durante un tiempo breve; aun sin tener actividad antagonista de los receptores adrenérgicos β_1 , lo que sugiere que el Metoprolol además de bloquear dichos receptores y provocar el efecto agudo observado con su administración, tiene un mecanismo adicional que podría explicar el efecto hipotensor tras dosis repetidas de éste fármaco.

5. OBJETIVOS

GENERALES

- ◆ Sugerir un mecanismo de acción que explique el efecto antihipertensivo de instalación lenta producido por el Metoprolol mediante la comparación con compuestos análogos que reducen la presión arterial y la frecuencia cardiaca con un mecanismo de acción diferente al bloqueo de los receptores adrenérgicos β .

PARTICULARES

- ◆ Comprobar el efecto antagonista del Metoprolol y de los compuestos análogos sobre los receptores adrenérgicos β en aurículas de rata.
- ◆ Estudiar el efecto relajante de los compuestos estructuralmente análogos al Metoprolol en el músculo liso vascular de anillos de aorta de rata.
- ◆ Investigar el efecto de varios inhibidores, que disminuyen la síntesis de sustancias endógenas, o bien, que inhiben los canales de potasio.
- ◆ Estudiar el efecto del Metoprolol y de los compuestos análogos 7D1, 7D2, 8D1 y 8D2 sobre los canales de calcio del músculo liso vascular de anillos de aorta de rata.

6. HIPÓTESIS

El efecto hipotensor observado al administrar el Metoprolol o los compuestos análogos 7D1, 7D2, 8D1 y 8D2 no se debe únicamente al bloqueo de los receptores adrenérgicos β , por lo que es posible que exista algún otro mecanismo de acción como podría ser el bloqueo de los canales de calcio, la liberación de óxido nítrico, la liberación de prostaglandinas, la síntesis del factor hiperpolarizante inducido por citocromo P₄₅₀, o la apertura de los canales de potasio; que participen en la relajación del músculo liso vascular de anillos de aorta de rata.

7. MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO

MATERIAL BIOLÓGICO

Ratas Wistar macho de entre 250 y 300 g de peso, las cuales se mantuvieron en jaulas dentro del bioterio en un cuarto con temperatura constante (22 ± 2 °C), ciclo de luz-oscuridad de 12 / 12 horas, se alimentaron con alimento estándar *rat purina* y agua discrecionalmente.

REACTIVOS Y FÁRMACOS

Compuestos análogos 7D1, 7D2, 8D1 y 8D2	Provistos por el M.enC. Ignacio Regla de la FES Zaragoza
Bicarbonato de Sodio	J.T. Baker
Cloruro de Acetilcolina	SIGMA
Cloruro de calcio dihidratado	J.T. Baker
Cloruro de potasio	Merck
Cloruro de sodio	Merck
Cloruro de Tetraetilamonio	SIGMA
Clotrimazol	RBI
Dextrosa	J.T.Baker
EDTA disódico	SIGMA
Éter Etilico	Fermont

MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPO

Fosfato diácido de potasio	J.T.Baker
Indometacina	SIGMA
Isopropil arterenol (Isoproterenol)	SIGMA
L-Fenilefrina	SIGMA
L-NAME	SIGMA
Sulfato de Magnesio heptahidratado	J.T.Baker
Tartrato de Metoprolol	CIBA-GEIGI

EQUIPO

Balanza Analítica	<i>DENVER INSTRUMENTS COMPANY®</i>
Equipo para órgano aislado	<i>BIOPAC SYSTEMS. INC®</i>
Micropipetas	<i>GILSON®</i> capacidades de 100-1000 μ L
Polígrafo	<i>GRASS®</i>

**REACTIVOS PARA LA PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN BICARBONATADA
KREBS**

REACTIVO	mM / L	g / L
NaCl	118.0	6.89
Dextrosa	11.7	2.1
NaHCO ₃	25.0	2.1
KCl	4.8	0.35
MgSO ₄ *7H ₂ O	1.2	0.29
KH ₂ PO ₄	1.2	0.16
CaCl*2H ₂ O	2.5	0.36
EDTA	0.026	0.01

Los reactivos se disuelven por litro de agua destilada, dejando en último lugar al cloruro de calcio para evitar precipitación de las sales. Posteriormente se oxigena por 20 min con la mezcla del carbógeno (95 % O₂ y 5 % CO₂).

PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN DESPOLARIZANTE KCl 80 mM

REACTIVO	mM / L	g / L
NaCl	43.0	2.51
KCl	80	5.96

Nota: la solución despolarizante se prepara de la misma manera que la solución Krebs, únicamente sustituyendo las cantidades de NaCl y KCl indicadas.

8. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

8.1 Procedimiento general para la preparación de anillos aórticos y aurículas

Los animales se anestesiaron con éter etílico, se extrajo inmediatamente la aorta torácica y se colocó en solución de Krebs bicarbonatada para quitar el tejido adiposo y el tejido conectivo circundante. Las arterias se cortaron en anillos (3-4 mm de longitud) y se colocaron en cámaras para órgano aislado de 5 mL que contenían de la misma solución Krebs a 37 °C, pH 7.4 y burbujeado con una mezcla de 95 % O₂ y 5 % CO₂. Los anillos se montaron en dos ganchos de Nicrom, los cuales a través de hilos permitieron fijar la preparación por un extremo al fondo de la cámara y por el otro al transductor de tensión del equipo *Biopac Systems, Inc*®. para registrar los cambios de tensión en la preparación.

A los anillos aórticos se les dio una tensión inicial de 4 g y se les permitió estabilizarse por 2 h, tiempo durante el cual se les contrajo con fenilefrina (10⁻⁶ M) para evaluar su viabilidad. En los experimentos se evaluó la integridad del endotelio farmacológicamente con acetilcolina (10⁻⁵ M) y se descartaron los anillos con una relajación menor al 80 %.

Para la preparación de aurículas, los animales se anestesiaron con éter etílico. Se les extrajo el corazón íntegro, el cual se colocó en solución de Krebs; éste se sujetó por la parte inferior del lóbulo y se cortó el músculo hasta llegar a las aurículas, con precaución con un hilo y unas pinzas de punta fina se ató por un extremo la aurícula que no tiene latido (izquierda) sin dañar el nodo sinoauricular; de igual manera la aurícula que late espontáneamente (derecha) se ató también del extremo opuesto con un hilo y se colocaron en cámaras para tejido aislado de igual manera que con los anillos aórticos. Se dio tensión hasta que la respuesta registrada con el polígrafo *Grass*® fue estable y se registró la frecuencia cardíaca con el tacógrafo.

8.2 Efecto del Metoprolol y los compuestos análogos 7D1, 7D2, 8D1 y 8D2 sobre la respuesta inducida por Isoproterenol en aurículas de rata.

Después del periodo de estabilización requerido para tener una respuesta de frecuencia cardiaca constante de las aurículas se realizó una curva, utilizando como agonista de los receptores adrenérgicos β al Isoproterenol (10^{-8} M).

Se realizó una curva de concentración-respuesta de frecuencia cardiaca con el Isoproterenol hasta alcanzar la respuesta máxima y se decidió utilizar una concentración de 10^{-8} M de agonista como dosis de prueba. Las respuestas a Isoproterenol 10^{-8} M se observaron antes y después de la incubación de las preparaciones con concentraciones logarítmicas crecientes de Metoprolol (10^{-8} , $10^{-7.5}$, 10^{-7} , $10^{-6.5}$ M) y los compuestos análogos (10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M) incubados por 20 min. Se registró el incremento de frecuencia cardiaca en presencia de éstos fármacos hasta observar el bloqueo de la respuesta inducida por el Isoproterenol.

8.3 Efecto de los inhibidores L-NAME, Indometacina, Clotrimazol y TEA en anillos de aorta precontraídos con fenilefrina 10^{-6} M.

Después del periodo de estabilización de 120 min hasta alcanzar la máxima respuesta a fenilefrina, se realizó una curva control concentración – respuesta de Metoprolol y los compuestos análogos ($10^{-3.5}$, 10^{-3} , $10^{-2.5}$ M) hasta obtener la máxima relajación del tejido. Después de un periodo de 45 a 60 min con lavados periódicos, los anillos por espacio de 20 min se incubaron con L-NAME (10^{-4} M), Indometacina (10^{-5} M), Clotrimazol (10^{-5} M) y TEA (10 mM), se indujo nuevamente la contracción con fenilefrina y se repitió otra curva concentración -respuesta a Metoprolol y los análogos estructurales 7D1, 7D2, 8D1 y 8D2 ($10^{-3.5}$, 10^{-3} , $10^{-2.5}$ M).

8.4 Efecto del Metoprolol y los análogos 7D1, 7D2, 8D1 y 8D2 en anillos precontraídos con potasio 80 mM.

Después del periodo de estabilización de 120 min se despolarizaron los anillos con 80 mM de potasio hasta alcanzar su respuesta máxima y se realizó una curva concentración - respuesta al Metoprolol y los análogos estructurales 7D1, 7D2, 8D1 y 8D2 ($10^{-3.5}$, 10^{-3} , $10^{-2.5}$ M) hasta registrar la relajación máxima alcanzada.

8.5 Curva concentración - respuesta a calcio en anillos despolarizados con potasio 80 mM en Krebs sin cloruro de calcio.

Se colocaron anillos de aorta en una solución Krebs en ausencia de calcio en las mismas condiciones que en los protocolos anteriores. Se despolarizó el tejido con la solución de potasio 80 mM cada 30 min (120 min de periodo de estabilización) hasta alcanzar la respuesta contráctil máxima, lavando frecuentemente con el Krebs sin calcio. Después de este periodo se despolarizó nuevamente el tejido y se realizó la curva control concentración - respuesta a calcio (10^{-4} M – 10^{-1} M) hasta alcanzar la respuesta máxima. Con lavados frecuentes después de la curva se permitió al tejido recuperarse por espacio de 45 min, nuevamente se despolarizó el tejido con potasio 80 mM y se incubó con Metoprolol y los análogos 7D1, 7D2, 8D1 y 8D2 en una concentración de $10^{-3.5}$ M por 20 min, y se procedió a realizar la curva de calcio en las mismas concentraciones logarítmicas crecientes. Con el mismo procedimiento para las curvas siguientes, se incubaron los fármacos en concentraciones 10^{-3} y $10^{-2.5}$ M por 20 min.

9. RESULTADOS

Efecto de los inhibidores L-NAME, Indometacina, Clotrimazol y TEA en anillos de aorta, sobre la relajación producida por Metoprolol

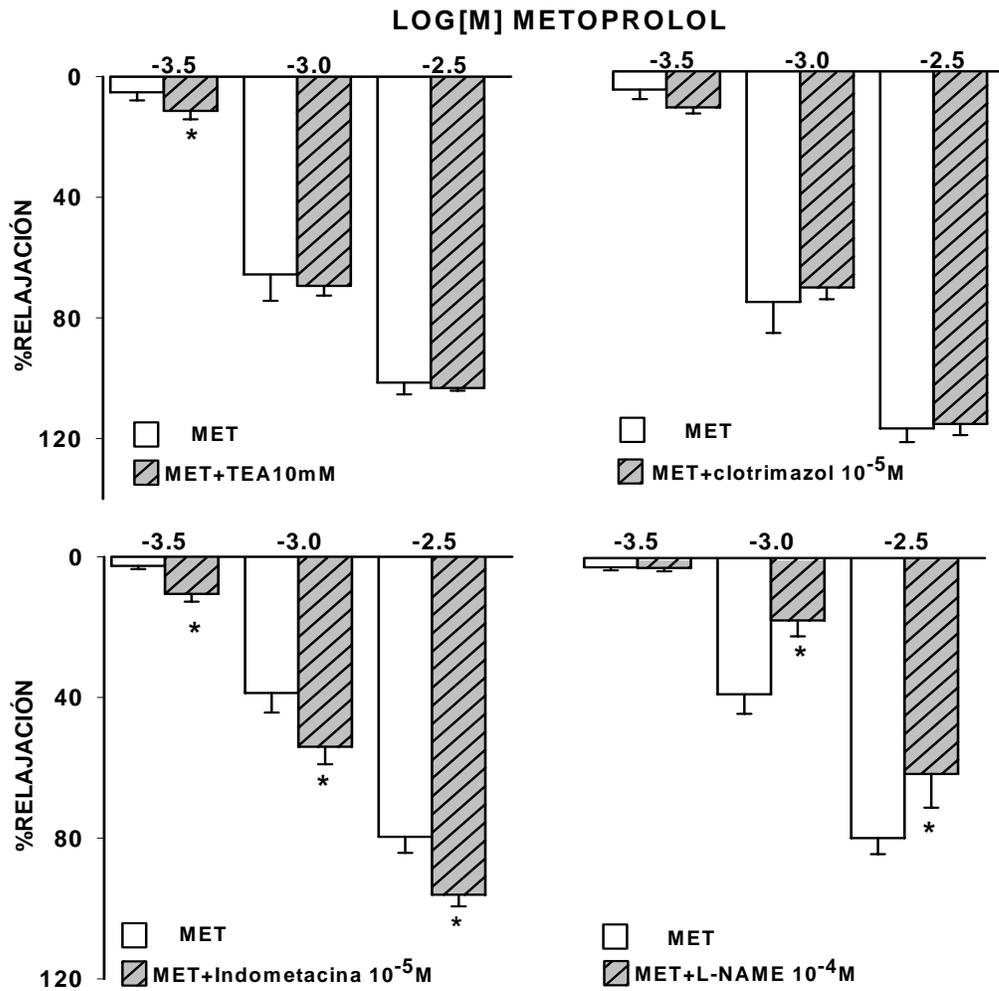


Fig. 21. Efecto de los inhibidores TEA (10 mM), Clotrimazol (10⁻⁵ M), Indometacina (10⁻⁵ M) y L-NAME (10⁻⁴ M) en la relajación producida por Metoprolol (MET) en anillos de aorta de rata precontraídos con fenilefrina (10⁻⁶ M). *p ≤ 0.05 vs Metoprolol.

RESULTADOS

En los anillos incubados con TEA (inhibidor de los canales de potasio inducidos por calcio), la respuesta producida por el Metoprolol en una concentración $10^{-3.5}$ M muestra un leve incremento de la relajación que es estadísticamente significativo al compararlo con su control, sin embargo, en las concentraciones 10^{-3} y $10^{-2.5}$ M de Metoprolol no se observa ningún cambio que sea diferente a las relajaciones de los anillos únicamente tratados con Metoprolol.

Los anillos de aorta que se incubaron con Clotrimazol (inhibidor de la síntesis de Factor Hiperpolarizante inducido por citocromo P450) no mostraron diferencias estadísticamente significativas en presencia y ausencia de éste inhibidor (Fig. 21).

En los anillos incubados con Indometacina (inhibidor de la liberación de Prostaglandinas) se observa un incremento de la respuesta relajante al administrar concentraciones logarítmicas crecientes de Metoprolol; estas respuestas son estadísticamente significativas, al compararse con anillos relajados en ausencia del inhibidor (Fig. 21).

En presencia de L-NAME (inhibidor de la liberación de óxido nítrico) la relajación producida por el Metoprolol en una concentración $10^{-3.5}$ M no presenta diferencias estadísticas en comparación con el control; sin embargo, la relajación con concentraciones mayores de Metoprolol 10^{-3} y $10^{-2.5}$ M se observa claramente disminuida, siendo estadísticamente diferente al compararse con los anillos relajados únicamente con Metoprolol (Fig.21).

La CE_{50} de L-NAME en anillos incubados, no es estadísticamente diferente con respecto a los anillos relajados únicamente con Metoprolol, aunque se observe una disminución significativa de la respuesta con este inhibidor. Los demás inhibidores; TEA, Clotrimazol e Indometacina tampoco producen cambios estadísticamente significativos en la CE_{50} del Metoprolol. (Tabla 3)

Efecto del Tetraetilamonio (TEA) en anillos de aorta, sobre la relajación producida por los análogos estructurales 7D1, 8D1, 7D2, 8D2.

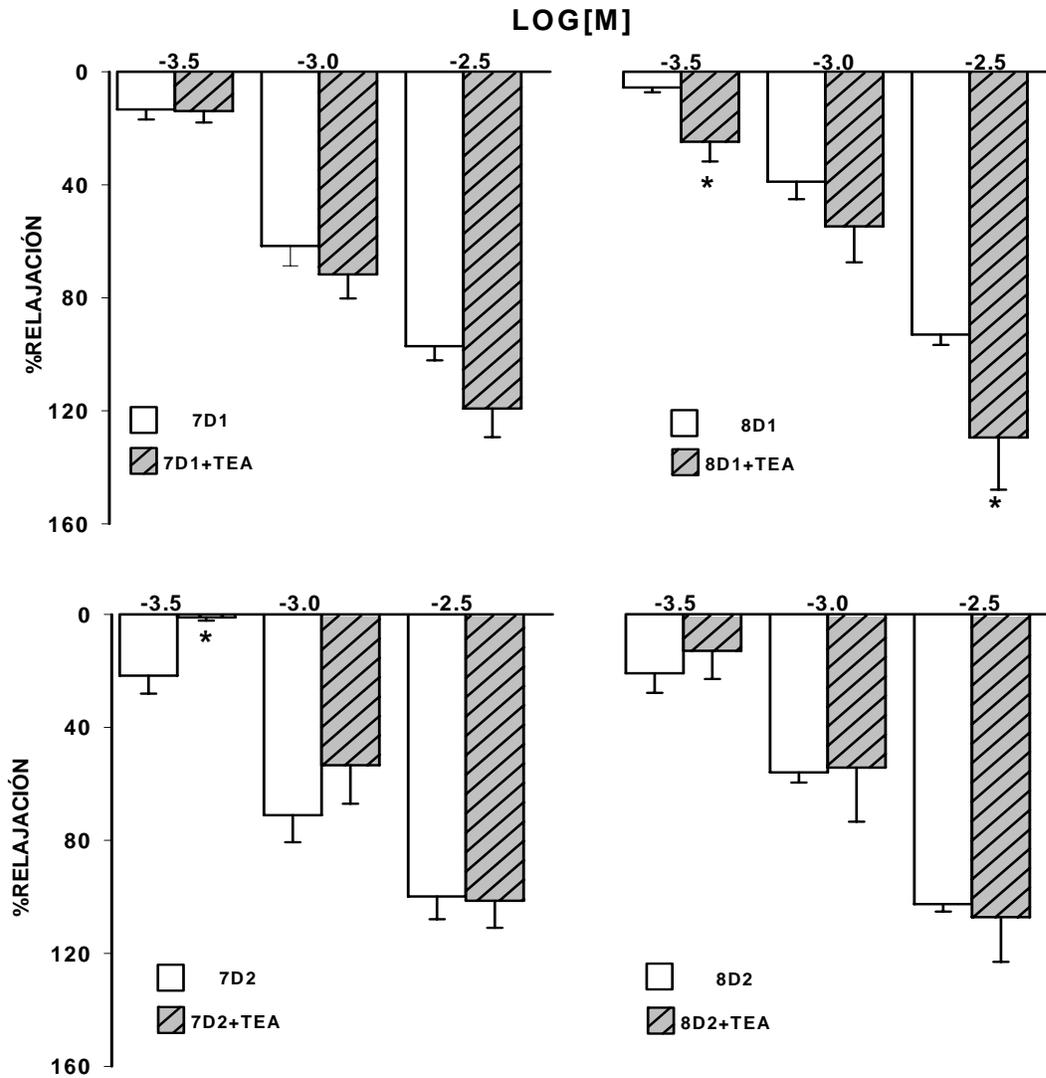


Fig. 22. Efecto de TEA (10 mM) en la respuesta producida por los compuestos análogos 7D1, 8D1, 7D2 y 8D2 en anillos de aorta de rata precontraídos con fenilefrina (10^{-6} M). * $p \leq 0.05$ vs compuestos análogos.

Efecto del Clotrimazol en anillos de aorta, sobre la relajación producida por los

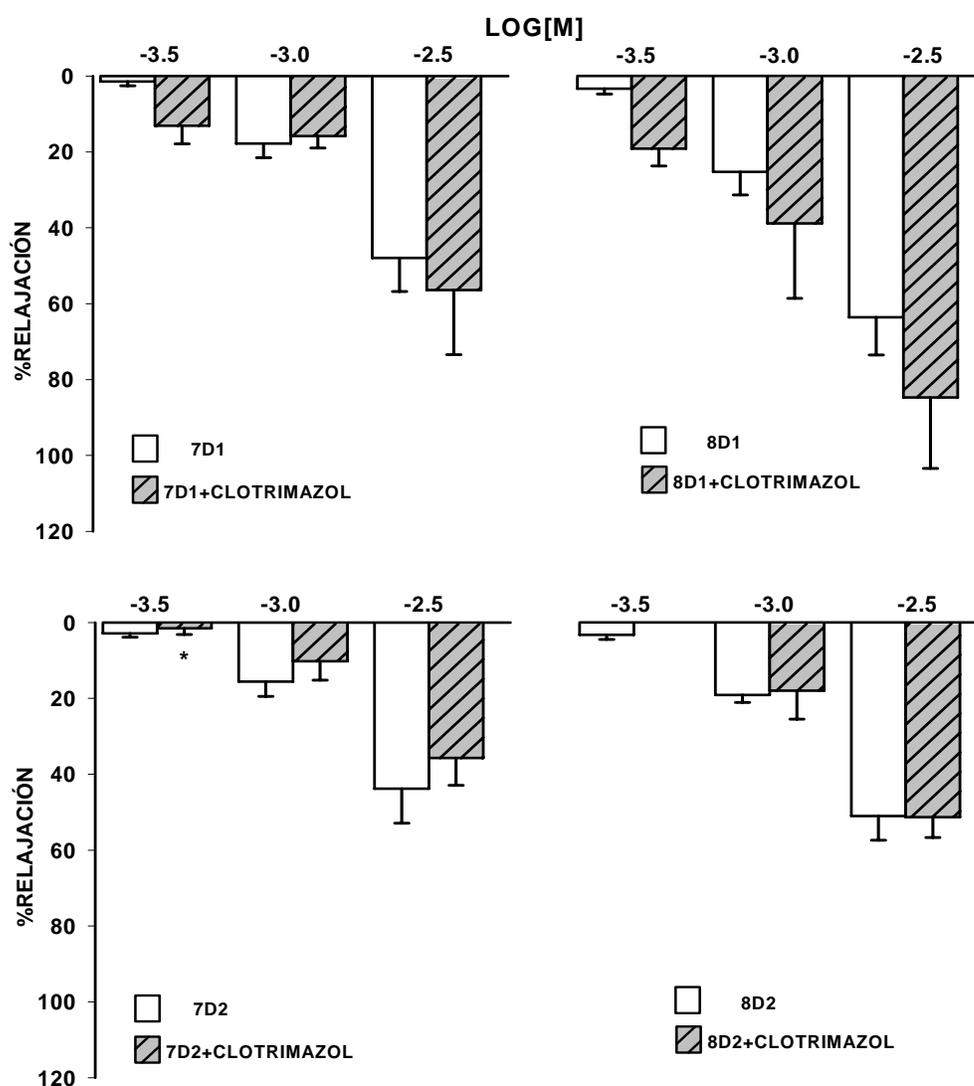


Fig. 23. Efecto de Clotrimazol (10^{-5} M) en la respuesta producida por los compuestos análogos 7D1, 8D1, 7D2 y 8D2 en anillos de aorta de rata precontraídos con fenilefrina (10^{-6} M). * $p \leq 0.05$ vs compuestos análogos.

RESULTADOS

Efecto de la Indometacina en anillos de aorta, sobre la relajación producida por

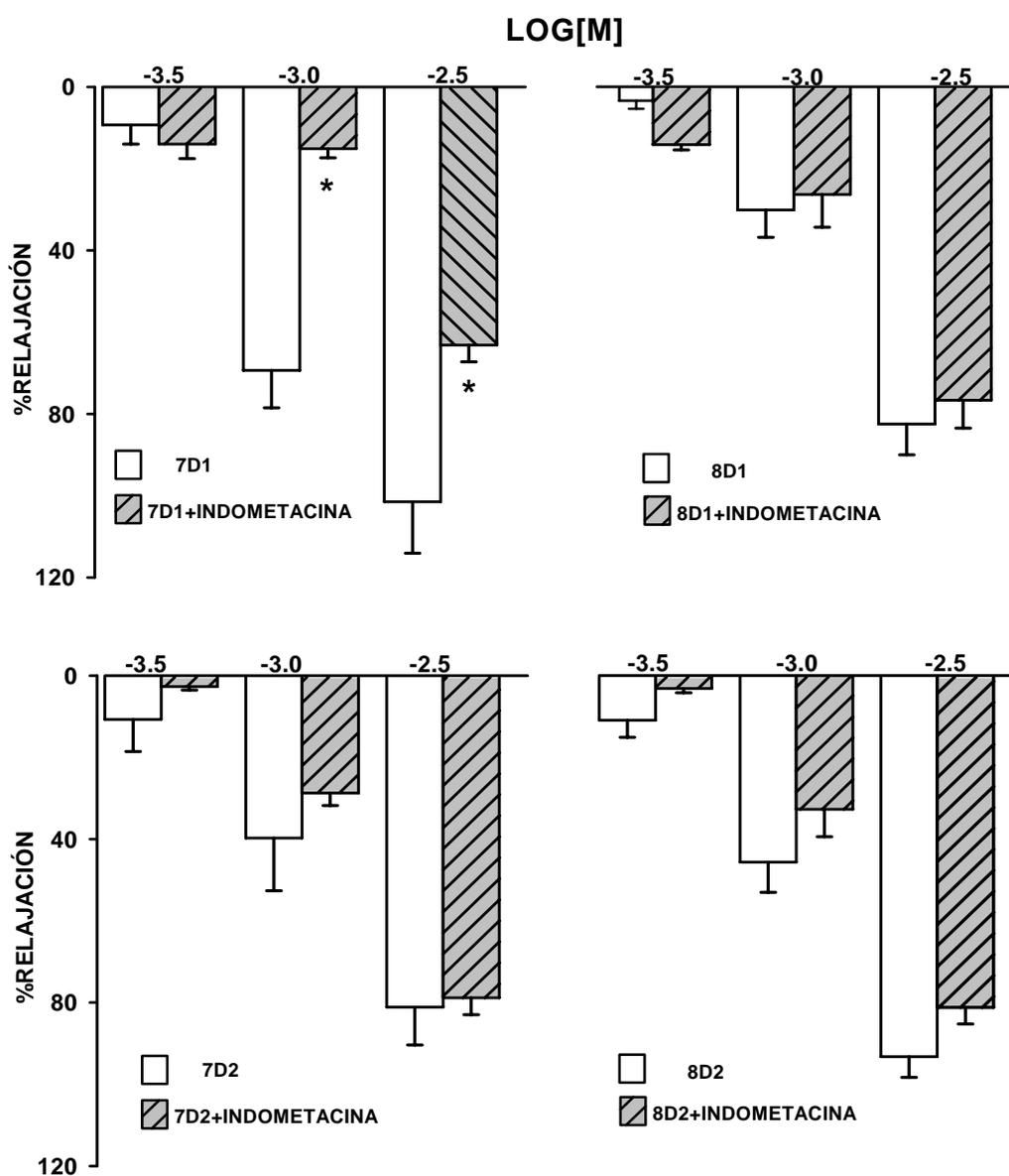


Fig.

-5

análogos 7D1, 8D1, 7D2 y 8D2 en anillos de aorta de rata precontraídos con fenilefrina (10^{-6} M). * $p \leq 0.05$ vs compuestos análogos.

RESULTADOS

Efecto del L-NAME en anillos de aorta. sobre la relajación producida por los

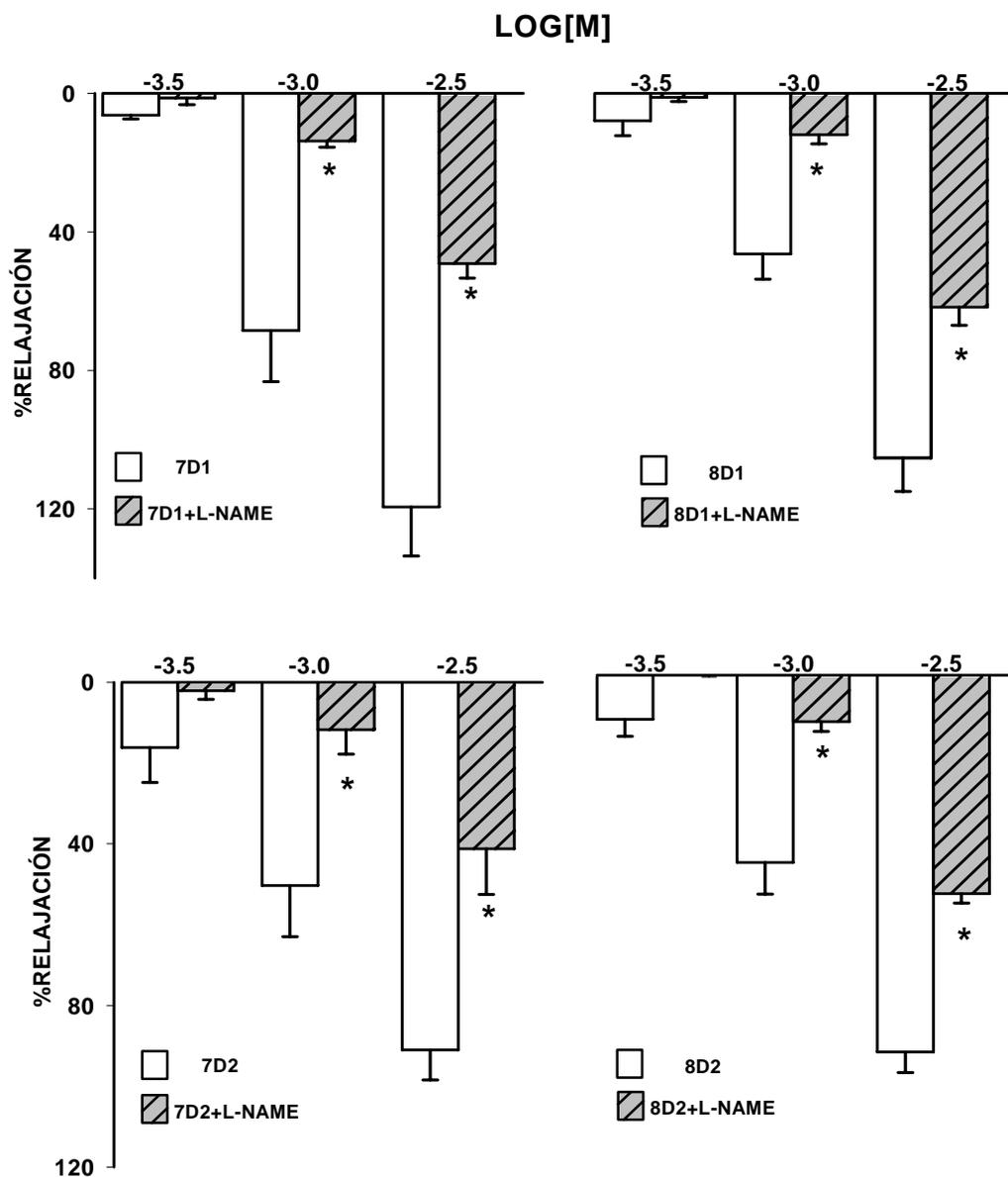


Fig. 25. Efecto de L-NAME (10^{-4} M) en la respuesta producida por los compuestos análogos 7D1, 8D1, 7D2 y 8D2 en anillos de aorta de rata precontraídos con fenilefrina (10^{-6} M).

* $p \leq 0.05$ vs compuestos análogos.

RESULTADOS

Tabla 3. Valores de pD_2 (-Log CE_{50}) de las respuestas a Metoprolol y los compuestos análogos en presencia y ausencia de Inhibidores en anillos de aorta precontraídos con fenilefrina $10^{-6}M$. * $p \leq 0.05$

	Metoprolol pD_2		7D1 pD_2		8D1 pD_2		7D2 pD_2		8D2 pD_2	
	Met	Met+Inh	7D1	7D1+Inh	8D1	8D1+Inh	7D2	7D2+Inh	8D2	8D2+Inh
L-NAME $10^{-4}M$	2.86	2.63	3.15	2.50*	2.91	2.54*	3.01	>2.5*	2.97	2.55*
Indometacina $10^{-5}M$	2.86	3.05	3.17	2.64*	2.81	2.76	2.88	2.79	2.96	2.82
Tetraetilamonio 10mM	3.13	3.17	3.13	3.20	2.93	3.08	3.22	3.03	3.05	3.09
Clotrimazol $10^{-5}M$	3.13	3.11	>2.5	2.58	2.68	2.88	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5

RESULTADOS

La relajación con los compuestos 7D1, 8D1 y 8D2 en anillos incubados con TEA no presenta cambios estadísticamente significativos al incrementar las concentraciones de éstos compuestos, sin embargo, con el análogo 7D2 se observa una disminución de la respuesta relajante en presencia del inhibidor en comparación con su control a una concentración $10^{-3.5}$ M, esta disminución de la respuesta no se presenta al incrementar la concentración (Fig. 22).

En anillos incubados con Clotrimazol, la relajación producida por concentraciones crecientes de los compuestos análogos 7D1, 8D1, 7D2 y 8D2 no presenta diferencias estadísticamente significativas con respecto a los anillos controles. (Fig.23)

La relajación producida por el compuesto análogo 7D1 en concentraciones de 10^{-3} y $10^{-2.5}$ M sobre anillos incubados con Indometacina es estadísticamente diferente a la relajación producida por el compuesto en ausencia del inhibidor. Las respuestas relajantes inducidas por los otros compuestos 8D1, 7D2 y 8D2 no se alteraron en los anillos incubados con Indometacina. (Fig.24)

El L-NAME produjo una disminución en la relajación inducida por los cuatro compuestos análogos 7D1, 8D1, 7D2 y 8D2 estadísticamente diferente a los anillos controles en concentraciones de 10^{-3} y $10^{-2.5}$ M, pero no en la concentración menor de $10^{-3.5}$ M en todos los casos. (Fig. 25)

La CE_{50} de los compuestos análogos 7D1, 8D1, 7D2 y 8D2 en los anillos relajados no se modifica en la relajación en presencia de los inhibidores TEA, Clotrimazol e Indometacina, con excepción del análogo 7D1 que sí presenta cambios estadísticamente significativos en presencia de este último inhibidor. La CE_{50} de éstos compuestos en presencia de L-NAME, con respecto a los anillos controles es estadísticamente diferente para todos los compuestos análogos. (Tabla 3)

Efecto del Metoprolol sobre la respuesta inducida por Isoproterenol en aurículas de rata y la respuesta observada en anillos precontraídos con potasio 80 mM

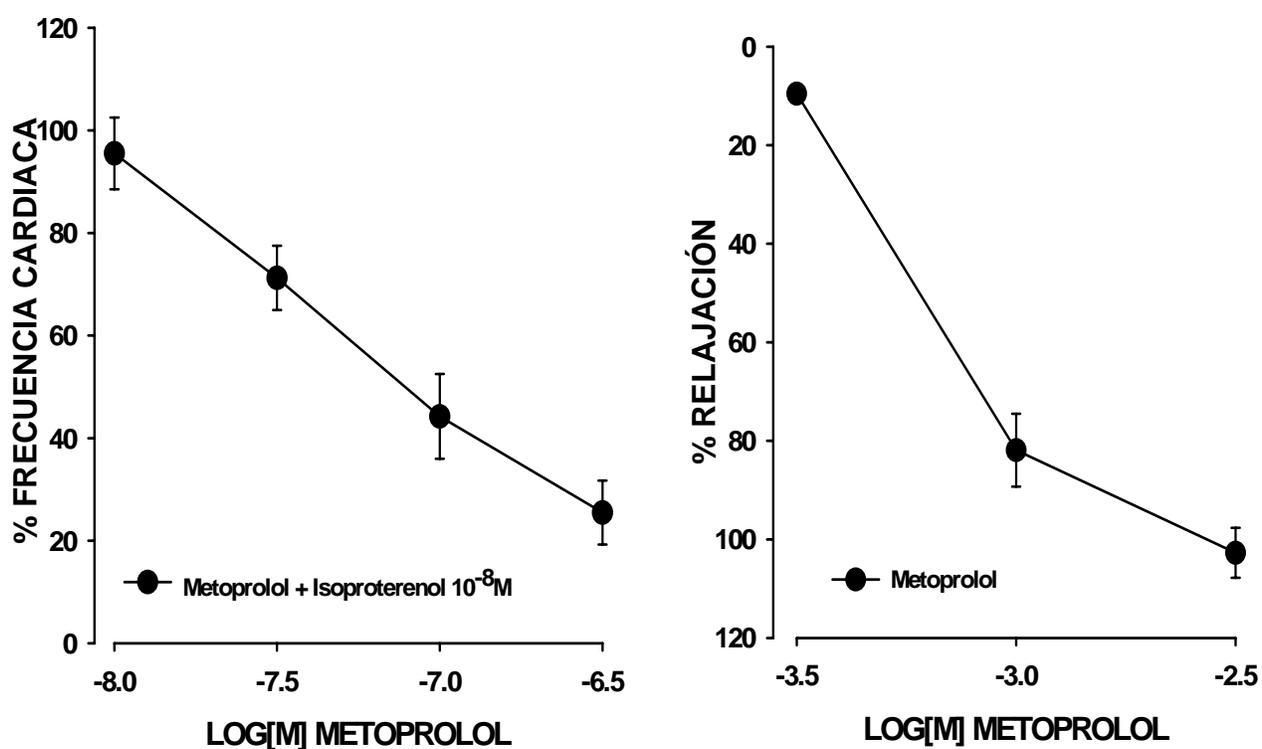


Fig.26. (Izquierda) Efecto sobre la Frecuencia cardiaca provocada por concentraciones logarítmicas crecientes de Metoprolol sobre la respuesta inducida por Isoproterenol (10^{-8} M) en aurículas de rata. (Derecha) Efecto del Metoprolol en la relajación de anillos de aorta de rata despolarizados con KCl 80 mM.

Efecto del 7D1 sobre la respuesta inducida por Isoproterenol en aurículas de rata y la respuesta observada en anillos precontraídos con potasio 80 mM

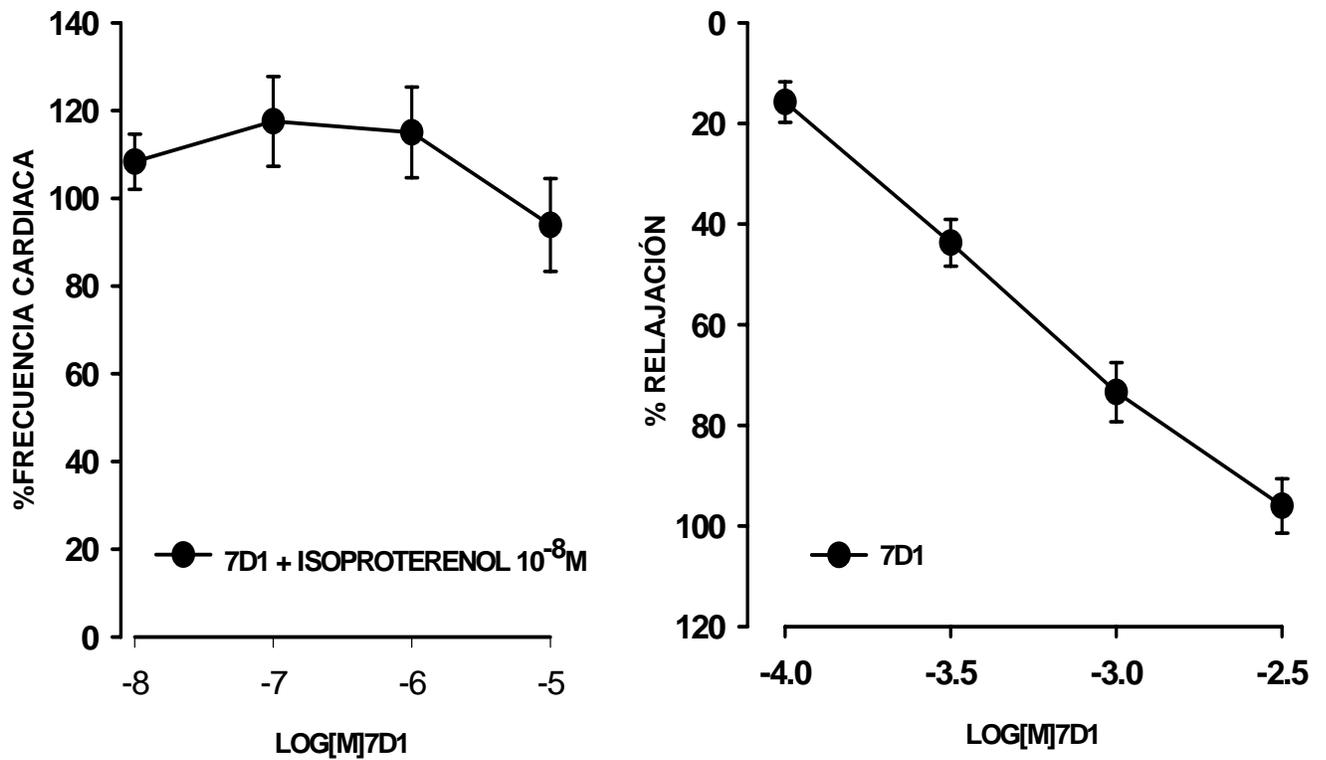


Fig. 27. (Izquierda) Efecto sobre la Frecuencia cardíaca provocada por concentraciones logarítmicas crecientes del compuesto análogo 7D1 sobre la respuesta inducida por Isoproterenol (10^{-8} M) en aurículas de rata. (Derecha) Efecto del análogo 7D1 en la relajación de anillos de aorta de rata despolarizados con KCl 80 mM.

Efecto del 8D1 sobre la respuesta inducida por Isoproterenol en aurículas de rata y la respuesta observada en anillos precontraídos con potasio 80 mM

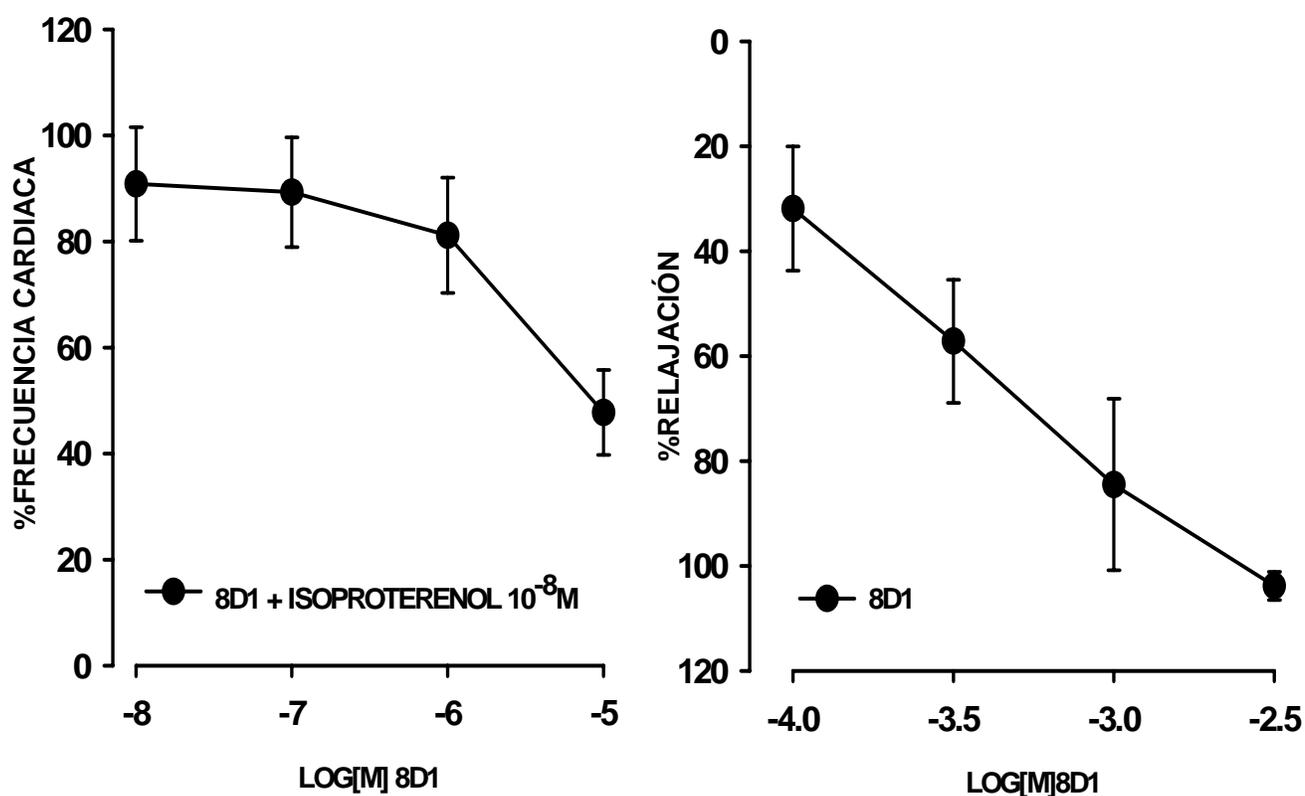


Fig. 28. (Izquierda) Efecto sobre la Frecuencia cardiaca provocada por concentraciones logarítmicas crecientes del compuesto análogo 8D1 sobre la respuesta inducida por Isoproterenol (10^{-8} M) en aurículas de rata. (Derecha) Efecto del análogo 8D1 en la relajación de anillos de aorta de rata despolarizados con KCl 80 mM.

Efecto del 7D2 sobre la respuesta inducida por Isoproterenol en aurículas de rata y la respuesta observada en anillos precontraídos con potasio 80 mM

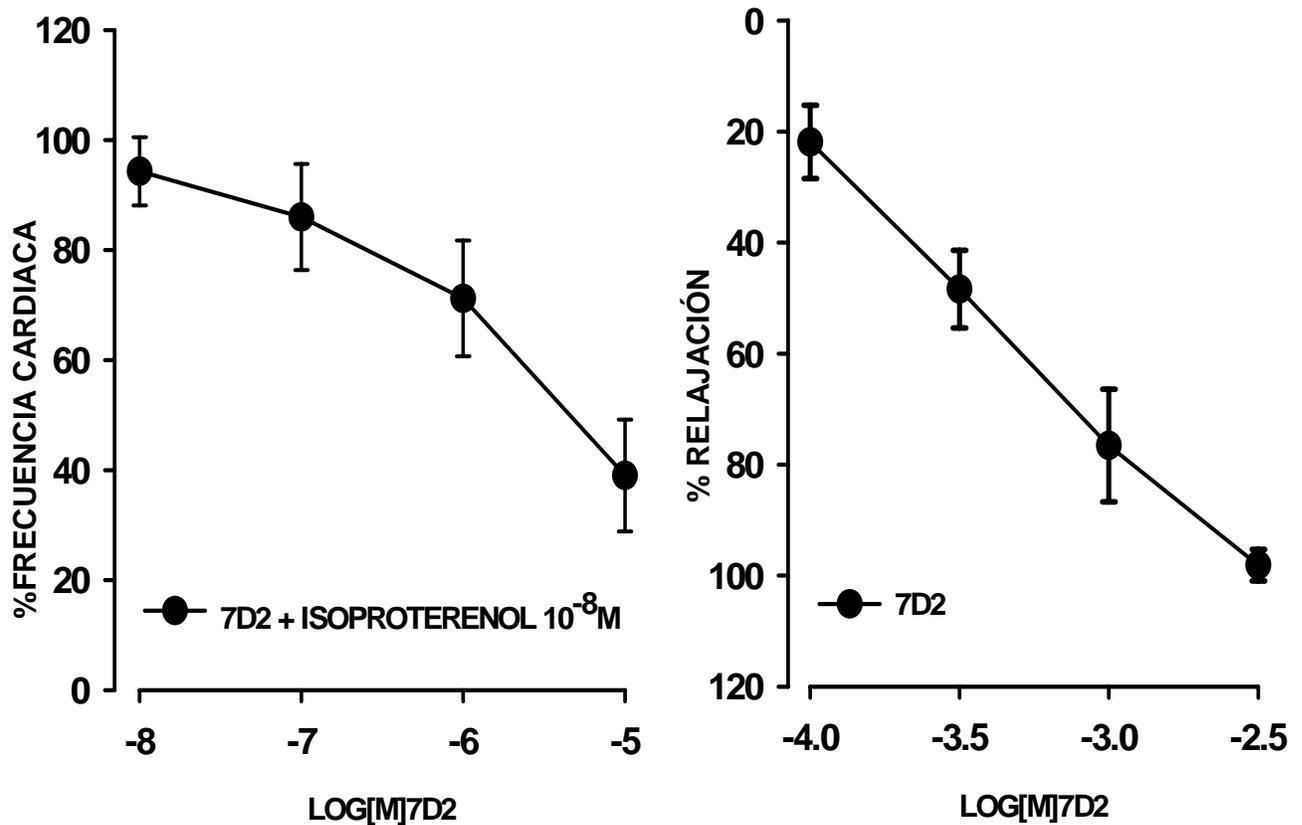


Fig. 29. (Izquierda) Efecto sobre la Frecuencia cardíaca provocada por concentraciones logarítmicas crecientes del compuesto análogo 7D2 sobre la respuesta inducida por Isoproterenol (10^{-8} M) en aurículas de rata. (Derecha) Efecto del análogo 7D2 en la relajación de anillos de aorta de rata despolarizados con KCl 80 mM.

Efecto del 8D2 sobre la respuesta inducida por Isoproterenol en aurículas de rata y la respuesta observada en anillos precontraídos con potasio 80 mM

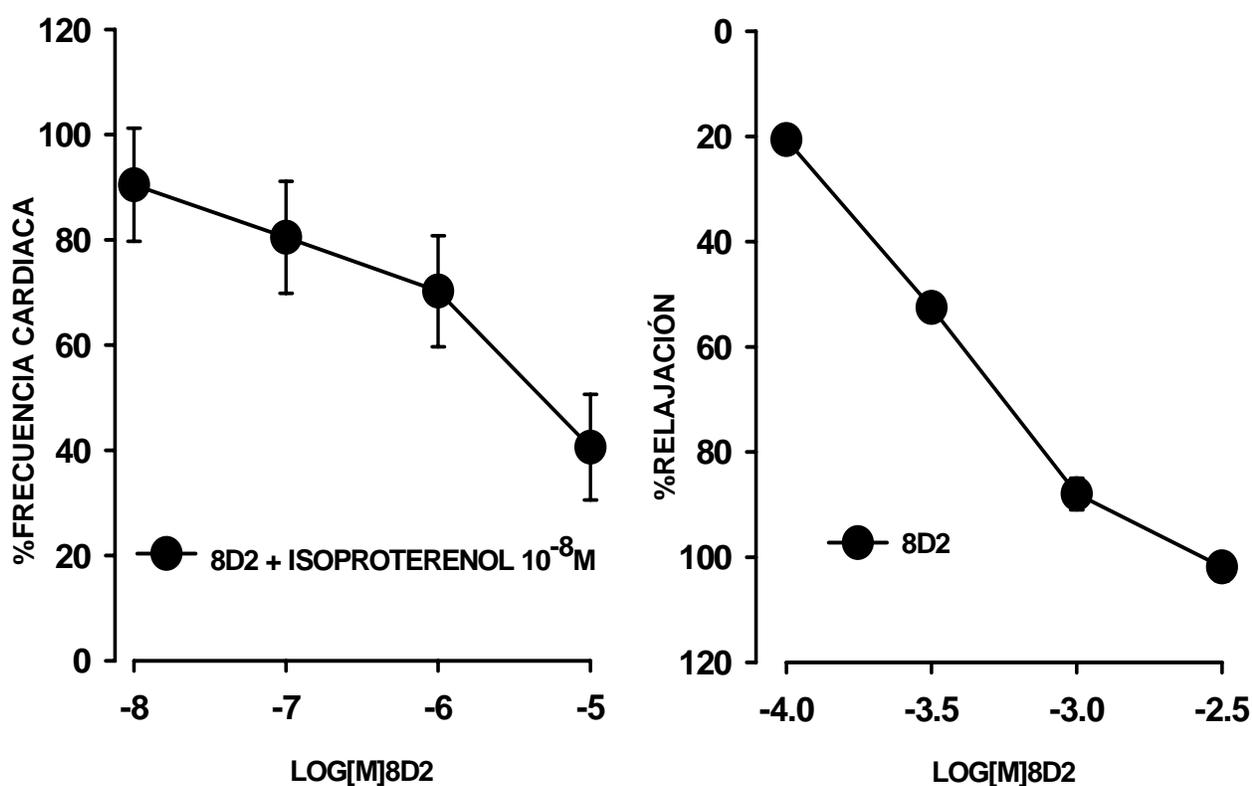


Fig. 30. (Izquierda) Efecto sobre la Frecuencia cardíaca provocada por concentraciones logarítmicas crecientes del compuesto análogo 8D2 sobre la respuesta inducida por Isoproterenol (10^{-8} M) en aurículas de rata. (Derecha) Efecto del análogo 8D2 en la relajación de anillos de aorta de rata despolarizados con KCl 80 mM.

RESULTADOS

Tabla 4. Valores de pD_2 (-Log CE_{50}) de las respuestas a Isoproterenol 10^{-8} M y KCl 80 mM en aurículas y anillos de aorta de rata Wistar

	ISOPROTERENOL pD_2 aurículas de rata	KCl 80mM pD_2 anillos de aorta de rata
Metoprolol	7.12	3.22
7D1	>5.00	3.40
8D1	5.11	3.65
7D2	5.39	3.48
8D2	5.32	3.57

La disminución de la frecuencia cardiaca debido al bloqueo de los receptores adrenérgicos β en las aurículas de rata, es proporcional al aumento de concentración en las aurículas incubadas con Metoprolol, reduciéndose la respuesta agonista inducida inicialmente por el Isoproterenol aproximadamente un 80% con una concentración máxima de $10^{-6.5}$ M de Metoprolol. (Fig.26, izquierda)

Con los compuestos análogos, la reducción de la frecuencia cardiaca fue menor que la producida por el Metoprolol, aun al utilizar logaritmos de concentración mayores. Esta reducción de la frecuencia se presentó con concentraciones de los compuestos análogos de 10^{-6} y 10^{-5} M alcanzando como máximo un 50% de inhibición de la respuesta inducida por el Isoproterenol con los análogos 8D1, 7D2 y 8D2; y una reducción menor del 30% con el análogo 7D1. (Fig. 27-30 izquierda)

Una concentración alta de potasio (80 mM) produjo una contracción sostenida de los anillos de aorta. La relajación producida por el Metoprolol y los compuestos análogos sobre los anillos despolarizados fue directamente proporcional a la concentración de los fármacos alcanzando más del 90 % de relajación con una concentración máxima de $10^{-2.5}$ M. (Fig. 26-30 derecha)

La CE_{50} del Metoprolol es de aproximadamente dos logaritmos menos que la concentración necesaria para observar bloqueo de los receptores adrenérgicos β con los compuestos análogos 7D1, 8D1, 7D2 y 8D2. En los anillos despolarizados con potasio 80 mM, la CE_{50} es similar en la relajación del músculo liso vascular por Metoprolol y los análogos, pero esta concentración es mayor que la necesaria para observar el antagonismo de los receptores β en las aurículas de rata. (Tabla 4)

Curva concentración - respuesta a calcio en anillos incubados con Metoprolol y despolarizados con potasio 80 mM en Krebs sin cloruro de calcio

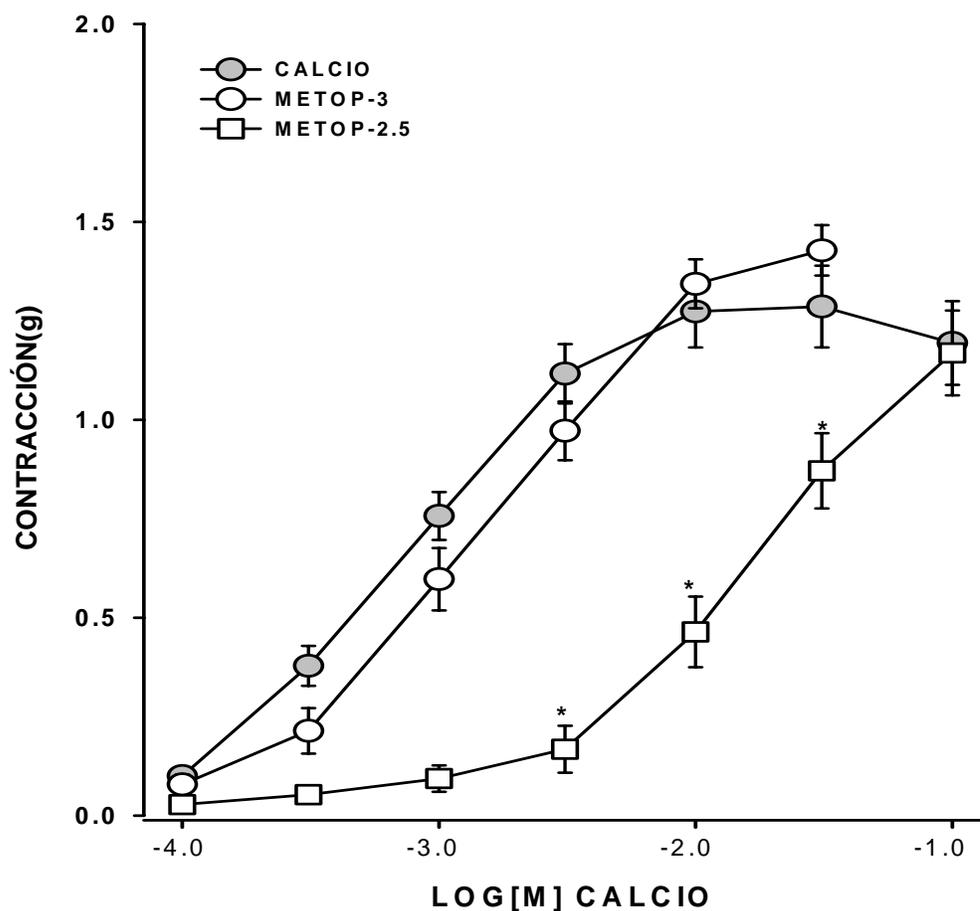


Fig. 31. Efecto del Metoprolol en la curva concentración-respuesta a calcio en anillos de aorta de rata despolarizados con potasio 80 mM en Krebs sin cloruro de calcio. * $p \leq 0.05$ vs control.

Curva concentración - respuesta a calcio en anillos incubados con 7D1 y 8D1

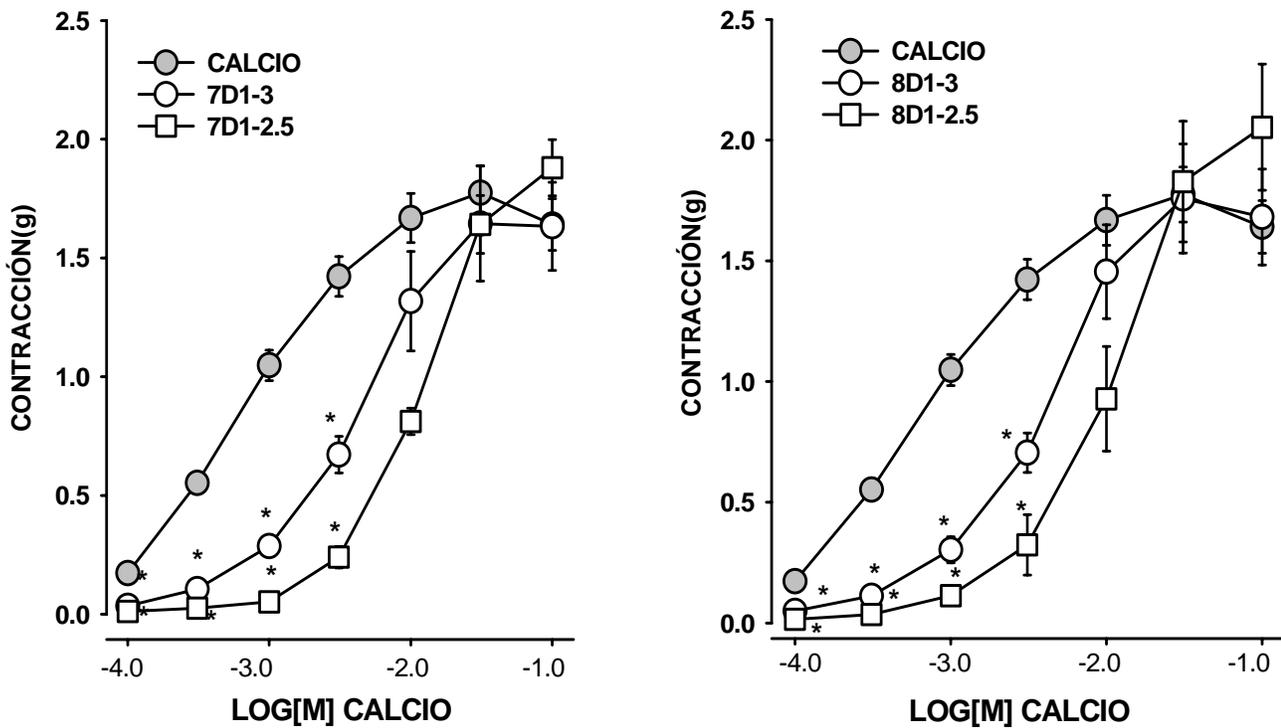


Fig. 32. Efecto de los compuestos análogos 7D1 y 8D1 en la curva concentración-respuesta a calcio en anillos de aorta de rata despolarizados con potasio 80 mM en Krebs sin cloruro de calcio. * $p \leq 0.05$ vs control.

Curva concentración - respuesta a calcio en anillos incubados con 7D2 y 8D2

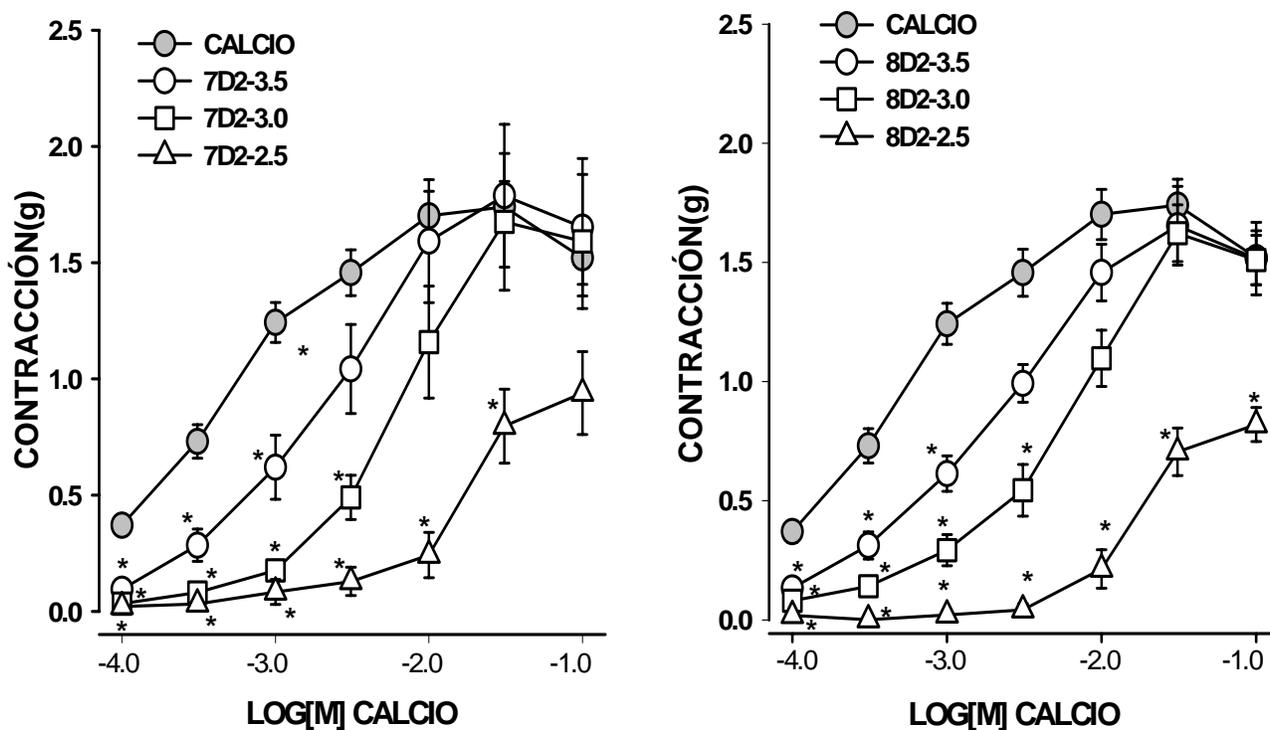


Fig. 33. Efecto de los compuestos análogos 7D2 y 8D2 en la curva concentración-respuesta a calcio en anillos de aorta de rata despolarizados con potasio 80 mM en Krebs sin cloruro de calcio. * $p \leq 0.05$ vs control.

RESULTADOS

Tabla 5. Valores de pD_2 (-Log CE_{50}) de las curvas concentración-respuesta a calcio en Krebs sin calcio en anillos de aorta de rata. * $p \leq 0.05$

	Curva control pD_2	Curva $10^{-3.5}M$ pD_2	Curva $10^{-3.0}M$ pD_2	Curva $10^{-2.5}M$ pD_2
Metoprolol	2.98	-	2.86	1.86*
7D1	3.26	-	2.37*	1.92*
8D1	3.26	-	2.39*	1.93*
7D2	3.32	2.70*	2.28*	1.82*
8D2	3.32	2.88	2.38*	1.81*

RESULTADOS

El Metoprolol desplaza la curva de calcio a la derecha aproximadamente 14 veces en una concentración $10^{-2.5}$ M con respecto al control, en una concentración más baja de 10^{-3} M el desplazamiento no es estadísticamente significativo (Fig. 31).

Con los análogos 7D1 y 8D1 en una concentración de 10^{-3} M el desplazamiento es de aproximadamente 8 veces y a una concentración de $10^{-2.5}$ M este se incrementa hasta 20 veces al compararlo con la curva control (Fig. 32). Con los análogos 7D2 y 8D2 el desplazamiento es aún mayor que con los otros compuestos, ya que a una concentración de $10^{-3.5}$ M es de aproximadamente 4 veces para el 7D2 y de 3 veces para el 8D2, a una concentración de 10^{-3} M este desplazamiento aumenta a 11 veces para el 7D2 y 9 veces para el 8D2 y en la última concentración el desplazamiento es 10 veces mayor que el realizado por los análogos 7 y 8 D1, siendo hasta de 30 veces más con respecto a su control (Fig. 33).

Como se pudo observar con estos resultados, los compuestos análogos son más activos en el bloqueo de la entrada de calcio que el compuesto original, en donde el 7D2 y el 8D2 presentan el mayor efecto de todos.

10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El mecanismo de acción del efecto antihipertensivo del Metoprolol, un fármaco antagonista de los receptores adrenérgicos β_1 , aún no se conoce con precisión, pero se ha mencionado en algunos trabajos, que el Propranolol, un fármaco antagonista no selectivo de los receptores adrenérgicos β , puede bloquear la entrada de calcio y producir vasodilatación en las microarterias de la retina de algunos bovinos que fueron despolarizadas con una alta concentración de potasio, en donde, la característica principal de este tejido es la ausencia de receptores adrenérgicos β ^{28,29}. En otro trabajo, en donde se estudió el efecto de compuestos análogos del Metoprolol en ratas *in vivo*, se observó que estos enantiómeros reducen la frecuencia cardíaca y la presión arterial durante un tiempo breve, pero no antagonizan la respuesta inducida por el Isoproterenol, por lo que su efecto no se debe al bloqueo de los receptores β ¹. Por lo que se decidió estudiar en este trabajo la respuesta producida por el Metoprolol y sus compuestos análogos en el músculo liso vascular de anillos de aorta de rata y el bloqueo de los receptores β en aurículas de rata.

Con los resultados obtenidos, se observó que el Metoprolol bloquea los receptores adrenérgicos β de aurículas en bajas concentraciones del fármaco; sin embargo, los compuestos análogos no antagonizan la respuesta inducida por el Isoproterenol sino hasta concentraciones muy altas de éstos, aproximadamente de dos órdenes de magnitud logarítmica mayores que el Metoprolol. Es posible que el hecho de presentarse esta respuesta no sea debido al bloqueo de los receptores, sino al bloqueo de la entrada de calcio que produce vasodilatación o disminuye la contracción cardíaca. Se sabe que el potasio produce una contracción sostenida por un incremento en el flujo de calcio hacia el interior de las células musculares a través de una acción despolarizante³⁰, esto pudo observarse en las curvas realizadas con anillos precontraídos con una solución de 80 mM de potasio; en donde los compuestos análogos, tanto como el Metoprolol, con DE_{50} similares, fueron capaces de relajar el músculo liso vascular de los anillos contraídos con una alta concentración de potasio, lo que indicaría efectivamente que estos compuestos intervienen

en el bloqueo de los canales de calcio que permanecen abiertos mientras el músculo se encuentra despolarizado. Se comprobó entonces, en otro experimento, que en un medio desprovisto de calcio, al incubarse los análogos y el Metoprolol son capaces de desplazar a la derecha una curva concentración-respuesta a calcio (10^{-4} - 10^{-1} M) al compararse con una curva control, en este efecto quienes presentaron un mayor desplazamiento fueron los análogos 7D2 y 8D2. Aunque las concentraciones utilizadas para bloquear la entrada de calcio tanto por el Propranolol, como por los nuevos isómeros es alta, es posible que la administración repetida sea lo que permite alcanzar concentraciones mayores de Metoprolol en la célula y que dicho mecanismo participe tanto en el efecto antihipertensivo, como en el efecto terapéutico en la cardiopatía isquémica.

El óxido nítrico juega un papel muy importante en la regulación del tono vascular. Con los resultados de este estudio, observamos que la liberación de óxido nítrico produce relajación del músculo liso vascular de los anillos de aorta y que los fármacos estudiados son capaces de inducir la liberación de esta sustancia en el endotelio como parte de su mecanismo de acción, aunque este efecto no es tan importante en la respuesta del Metoprolol, los compuestos análogos parecen liberar más óxido nítrico, ya que la inhibición de la respuesta en los anillos aórticos incubados con L-NAME es mayor a la producida por el compuesto original. Es probable que la liberación del óxido nítrico al ser un efecto breve, participe en el efecto agudo que presenta el Metoprolol cuando es administrado en el tratamiento de la cardiopatía isquémica cardiaca.

La relajación producida por el análogo 7D1 se ve afectada al incubar con Indometacina, aunque el efecto observado es menos importante que la liberación de óxido nítrico, es posible que en este compuesto, la liberación de prostaglandinas participe en la respuesta vasodilatadora sobre el músculo liso vascular de anillos de aorta de rata. Dado que este efecto únicamente se presenta con este análogo, es posible creer que la estructura de la molécula y su disposición en el espacio sean los responsables de que el análogo 7D1 sea el único de los enantiómeros que presente dicho efecto.

La inhibición por TEA, Clotrimazol e Indometacina (con excepción del compuesto 7D1 para este último), no modificaron la respuesta inducida por los fármacos Metoprolol, 7D1, 8D1, 7D2 y 8D2 por lo que la apertura de los canales de potasio inducidos por calcio, la liberación del Factor Hiperpolarizante inducido por citocromo P₄₅₀ y la liberación de prostaglandinas no participan en el mecanismo de acción de éstos fármacos.

En este estudio no pudo definirse específicamente la funcionalidad que tiene la relación estructura-actividad de los compuestos análogos comparada con el Metoprolol, salvo que éstos no presentan gran afinidad por los receptores adrenérgicos β que está mediada por la posición del hidroxilo en el carbono quiral de la molécula del Metoprolol. Los compuestos análogos también presentan este centro estereogénico, sin embargo, es posible que al aumentar el tamaño de la molécula y al tener nuevos sustituyentes esta relación con el receptor no se lleve a cabo.

Algunos estudios de la farmacocinética del Metoprolol han revelado que el enantiómero (R) se metaboliza más rápidamente que el enantiómero (S) que tiende a acumularse en el plasma sanguíneo¹⁵, lo que podría explicar el bloqueo de los canales de calcio y el posterior efecto hipotensor que se presenta después de varios días de tratamiento con el Metoprolol.

Los resultados obtenidos hasta ahora con este trabajo nos permiten confirmar que es posible continuar con el estudio del mecanismo de acción del efecto antihipertensivo del Metoprolol, enfocado al bloqueo de la entrada de calcio en ratas espontáneamente hipertensas (SHR), y posiblemente también los análogos 7D1 y 8D2 para investigar el efecto terapéutico que pudieran presentar en la hipertensión arterial y en la cardiopatía isquémica cardíaca.

11. CONCLUSIONES

- ◆ El efecto relajante del músculo liso vascular producido por el Metoprolol no se encuentra mediado por la liberación de prostaglandinas, la apertura de los canales de potasio o la liberación del factor hiperpolarizante.
- ◆ El Metoprolol induce una relajación del músculo liso vascular producida por la liberación de óxido nítrico y el bloqueo de la entrada de calcio al músculo liso vascular.
- ◆ Las concentraciones de Metoprolol para observar estos efectos son altas; sin embargo, es posible que la liberación de óxido nítrico participe en el efecto agudo que se presenta inmediatamente después de la administración del fármaco y el bloqueo de la entrada de calcio en el efecto antihipertensivo, así como también en el efecto benéfico sobre la cardiopatía isquémica.
- ◆ Los compuestos 7D2 y 8D2 parecen ser los más potentes de los análogos como antagonistas de la entrada de calcio e inclusive parecen ser más activos que el Metoprolol.
- ◆ Los análogos del Metoprolol parecen liberar más óxido nítrico que el compuesto original, ya que su efecto se bloquea en mayor grado por el L-NAME. El más activo en este efecto fue el 7D1.
- ◆ Es posible que debido a la estructura y a su posición en el espacio, el 7D1 sea el único de los compuestos análogos del Metoprolol que involucre en su mecanismo de acción la liberación de prostaglandinas.
- ◆ El posible efecto terapéutico potencial del 7D1 y del 8D2 debería investigarse en la Hipertensión arterial y en la cardiopatía isquémica cardiaca.

12. REFERENCIAS

1. Melgar, F.; Demare, P.; Hong, E.; Rosas, M.A.; Escalante, J.; Muñoz - Muñiz, O.; Juaristi, E.; Regla, I. Synthesis and Cardiovascular activity of Metoprolol analogues. *Bioorg.Med.Chem.Lett.* **2004**, 14, 191-194.
2. Laragh, J.; Brenner, B.; Hypertension. Pathophysiology, Diagnosis and Management. *Raven Press.* **1990**, 11, 3-13.
3. National High Blood Pressure Education Program. The seventh Report of the Joint National Committee on the Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure. **2003**
4. Secretaría de Salud. Programa de acción. Enfermedades Cardiovasculares e Hipertensión Arterial. 1ª. Ed. México D.F. **2001**
5. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). Censo 2003
6. Bowman, W.C.; Rand, M.J.; *Farmacología*, 2a ed.; Interamericana s.a. de c.v.: México D.F., **1984**, 23.22 - 23.31.
7. Gaddo, O; Kwan, E; Moyer, J. Hypertension: Mechanism and Management. *Grune and Stratton.* New York. **1973**, 9-19

REFERENCIAS

8. Ganong, F. *Fisiología Médica*. Manual Moderno: México D.F. **1992**: 531-532
9. Goodman Gilman, A.; *The Pharmacological basis of Therapeutics*, 9th ed.; Mc Graw Hill: U.S.A., **1996**, 238 - 241, 780 – 781.
10. Kaplan, N.M.; Manejo de la Hipertensión, 5^a ed.; Essential Medical Information Systems, Inc.: Dallas, Texas, **1993**, 14 -18, 100 - 110.
11. Katzung, B; Basic and clinical Pharmacology. 8th ed.; Mc Graw Hill.: U.S.A., **2001**, 155-180
12. Bolli, P; Fernández, P; Bühler, R. Beta-Blockers in treatment of Hypertension. *Hypertension: pathophysiology, Diagnosis and Management*. **1990**, 2181-2203
13. Buhler, F.; Brunner, H.; Hansson, L.; Prichard, B.; Vetter, W.; Zanchetti, A.; Position of Beta Blockers in Antypertensive Therapy. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. **1986**, 8 (supply 6), S1-S4.
14. Velasco, M; Romero, B; Betancourt, M; Suarez, N; Contreras, F. Uso de los antagonistas Beta-Adrenérgicos en la Hipertensión Arterial. *AVFT*. Julio 2, **2002**
15. Cerqueira, P; Cesarino, E, Mateus, F; Mere, Y; Silva, R; Lanchote, V. Enantioselectivity in the steady-state pharmacokinetics of Metoprolol in Hypertensive patients. *Chirality*. **1999**. 591-597
16. Vanhoutte, P. Endothelium and control of vascular function. *Hypertension*. **1989**, June :13(6) part 2, 658-667

REFERENCIAS

17. Brenner, B.M., Troy, J.L., Ballermann, B.J. Endothelium-dependent vascular responses. *J. Clin. Invest.* **1989**, 84: 1373, 1378,
18. Moncada, S., Palmer, R.M.J., Higgs, E.A. Biosynthesis of nitric from L-arginine: a pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem. Pharmacol.* , **1989**, 38, 1709-1715.
19. Rees, D.; Palmer, M.J.; Moncada, S.; Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Medical Sciences.* **1989**, May 86, 3375-3378.
20. Leclercq, B.; Jaimes, E.; Rajj, L.; Nitric oxide synthase and hypertension. *Current opinion in Nephrology and Hypertension.* **2002**, 11, 185-189.
21. Moncada, S; Higgs, A; Furchgott, R. XIV International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. *Pharmacological Reviews.* **1997**, 49 N.2, 137-142
22. Paya, D., Gray, G.A., Stoclet, J-C. Effects of methylene blue on blood pressure and reactivity to norepinephrine in endotoxemic rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* , **1993** 21:926-930.
23. Bhagyalakshmi, A., Frangos, J.A. Mechanism of shear-stress induced prostacyclin production in endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1989**, 158:31-37.
24. Hecker, M. Endothelium- Derived Hyperpolarizing factor- Fact or Fiction? *NewsPhysiol. Sci.* **2000**, Feb. 15, 1-5

REFERENCIAS

25. Campbell, W; Harder, D. Endothelium-Derived Hyperpolarizaing Factors and vascular Cytochrome P450 Metabolites of Arachidonic Acid in the Regulation of Tone. *Circulation Research*, **1999**, 84, 484-488
26. Urakami-Harasawa, L; Shimokawa, H; Nakashima, M; Egashira, K; Takeshita, A. Importance of endothelium-derived Hyperpolarizaing Factor in Human Arteries. *J. Clin. Invest.* **1997**, Dec. 100: 11, 2793-2799
27. William, B.; Campbell; Gauthier, K.; What is new in endothelium-derived hyperpolarizing factors?. *Current opinion in Nephrology and Hypertension.* **2002**, 11, 177-183.
28. Hoste, A.M.; Stanislas, U.; Ca^{2+} Channel- Blocking activity of Propranolol and Betaxolol in isolated Bovine Retinal Microartery. *Journal of Cardiovascular Pharmacology.* **1998**, 32, 390-396.
29. Rokutanda, M.; Araki, S.; Sakanashi, M.; A Pharmacological Investigation on Posible Calcium Antagonistic Action of Propranolol. *Arch.int. Pharmacodyn.* **1983**, 262, 99-108.
30. Spedding, M; Berg, C. Antagonism of Ca^{2+} Induced Contractions of K^{+} Depolarized Smooth Muscle by Local Anaesthetics. *European Journal of Pharmacology.* **1985**, 108, 143-150