

ÍNDICE

ÍNDICE	1
RESUMEN.....	4
ABREVIATURAS	8
INTRODUCCIÓN	11
Relevancia de la hipertensión arterial	11
Farmacología de la hipertensión arterial	13
Daño de órgano blanco y mecanismos de protección de la terapia antihipertensiva	15
Bloqueantes β -adrenérgicos: Características farmacológicas	24
Modelos de hipertensión experimental	29
Hipertensión inducida por ingesta de L-NAME:	30
Hipertensión genética:.....	30
Hipertensión inducida por sobrecarga de fructosa:	31
Modelos farmacocinéticos-farmacodinámicos (PK/PD).....	32
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	37
MATERIALES Y MÉTODOS	39
Modelos animales.....	39
Preparación de formulaciones	40
Diseño experimental.....	40
Determinaciones analíticas de carvedilol y nebivolol.....	42
Análisis farmacocinético de carvedilol y nebivolol	43
Análisis farmacodinámico de carvedilol y nebivolol.....	44
Análisis PK/PD del carvedilol.....	44
Determinación <i>in vitro</i> de la unión de carvedilol a proteínas plasmáticas	50
Análisis estadístico de los datos	52
RESULTADOS.....	53
Animales L-NAME.....	53
Farmacocinética del carvedilol.....	53
Farmacodinamia del carvedilol	57
Efecto bradicardizante.....	60
Efecto sobre la variabilidad de la presión arterial de corto plazo.....	62
Efecto sobre la variabilidad de la presión arterial latido-a-latido.....	62
Farmacocinética del nebivolol	66
Farmacodinamia del nebivolol	69

Efecto hipotensor.....	69
Efecto bradicardizante.....	70
Efecto sobre la variabilidad de la presión arterial a corto plazo.....	71
Efecto sobre la variabilidad de la presión arterial latido-a-latido.....	72
Animales espontáneamente hipertensos (SH).....	76
Farmacocinética del carvedilol.....	76
Farmacodinamia del carvedilol.....	80
Efecto hipotensor.....	80
Efecto bradicardizante.....	82
Efecto sobre la variabilidad de la presión arterial a corto plazo.....	85
Efecto sobre la variabilidad de la presión arterial latido-a-latido.....	85
Farmacocinética del nebivolol.....	88
Farmacodinamia del nebivolol.....	91
Efecto hipotensor.....	91
Efectos sobre la frecuencia cardiaca.....	92
Efecto sobre la variabilidad de la presión arterial a corto plazo.....	93
Efecto sobre la variabilidad de la presión arterial latido-a-latido.....	94
Animales Fructosa.....	97
Farmacocinética del carvedilol.....	98
Farmacodinamia del carvedilol.....	102
Efecto hipotensor.....	102
Efecto bradicardizante.....	104
Efecto sobre la variabilidad de la presión arterial latido-a-latido.....	106
Farmacocinética del nebivolol.....	111
Farmacodinamia del nebivolol.....	115
Efecto hipotensor.....	115
Efecto bradicardizante.....	116
Efectos sobre la variabilidad de la presión arterial a corto plazo.....	117
Efectos sobre la variabilidad de la presión arterial latido-a-latido.....	119
Comparación de la respuesta cardiovascular de carvedilol y atenolol.....	121
Animales L-NAME.....	121
Animales SH.....	124
Animales Fructosa.....	126
Comparación de la respuesta cardiovascular de nebivolol y atenolol.....	129
Animales L-NAME.....	129

Animales SH	131
Animales Fructosa.....	133
DISCUSIÓN	137
Farmacocinética enantioselectiva de carvedilol y nebivolol.....	137
Efecto hipotensor de carvedilol y nebivolol.....	141
Efecto cronotrópico de carvedilol y nebivolol	149
Efecto de carvedilol y nebivolol sobre la variabilidad de la presión arterial a corto plazo...	151
Comparación de los efectos cardiovasculares de carvedilol y nebivolol.....	154
CONCLUSIÓN	160
PERSPECTIVAS	162
REFERENCIAS.....	165

RESUMEN

Los bloqueantes β -adrenérgicos han dejado de ser considerados como terapia de primera línea de la hipertensión arterial, ya que ofrecen una menor cardioprotección que otros antihipertensivos dada su menor capacidad de reducir la presión arterial central y la variabilidad de la presión arterial (VPA). La evidencia que establece la inferioridad de los bloqueantes β -adrenérgicos se sustenta en estudios que incluyeron primordialmente al atenolol y no necesariamente es extrapolable a nuevos agentes con acciones pleiotrópicas como carvedilol o nebivolol. Considerando la capacidad vasodilatadora de carvedilol y nebivolol, el presente trabajo postula que estos β -bloqueantes de tercera generación son más efectivos que el atenolol en términos de reducción de la presión arterial central y atenuación de la VPA de corto plazo con un potencial beneficio cardioprotector. Con la finalidad de confirmar esta hipótesis se han evaluado las propiedades farmacocinéticas (PK) y farmacodinámicas (PD) enantioselectivas de carvedilol y nebivolol en diferentes modelos experimentales de hipertensión arterial -ratas espontáneamente hipertensas (SH), ratas tratadas con L-NAME y animales con sobrecarga de fructosa- mediante el empleo de modelos PK/PD, contrastándolas con la respuesta inducida por el atenolol.

En el análisis del efecto antihipertensivo de carvedilol se ha encontrado una relación entre los niveles plasmáticos de carvedilol racémico y la respuesta hipotensora en todos los grupos experimentales mediante la utilización de un modelo PK/PD con compartimiento de efecto. El análisis PK/PD mostró un incremento en la respuesta hipotensora al carvedilol en animales SH y L-NAME en ambas dosis estudiadas en comparación con sus controles. Este hallazgo sugeriría la participación del sistema nervioso simpático vascular en el mantenimiento del estado hipertensivo en estos

modelos de hipertensión. Tal hipótesis fue confirmada al observar que la administración de carvedilol indujo una mayor reducción del cociente de baja frecuencia sobre alta frecuencia (BF/AF), marcador de la actividad simpática vascular en los animales hipertensos en comparación con el grupo control correspondiente. Los experimentos realizados en el modelo de fructosa sólo evidenciaron un incremento de la eficacia antihipertensiva de carvedilol luego de la administración de la dosis más alta, sin evidencia de un mayor efecto simpaticolítico vascular. Por lo tanto, se sugiere que el sistema nervioso simpático participa de manera marginal en el mantenimiento del estado hipertensivo inducido por la sobrecarga crónica con fructosa.

La evaluación del efecto de carvedilol sobre el desvío estándar (DE) del registro de presión arterial documentó que este bloqueante β -adrenérgico induce una marcada atenuación de la VPA de corto plazo, la cual es independiente del estado hipertensivo y de la modificación de la presión arterial. Inclusive, tanto la reducción de la presión arterial central registrada a nivel carotídeo como la atenuación de la VPA de corto plazo inducida por carvedilol fueron marcadamente superiores a la observada con atenolol en los modelos estudiados. Finalmente, la evaluación de los cambios en el cociente BF/AF ha establecido que el carvedilol promueve una mayor reducción de la sobreactividad simpática vascular que el atenolol en los tres modelos de hipertensión estudiados.

El análisis PK/PD del efecto cronotrópico de carvedilol mostró la existencia de un incremento en la eficacia para este efecto en el grupo de ratas SH en comparación con los animales control sin observarse diferencias significativas en los otros grupos, lo que sugeriría que sólo los animales con hipertensión genética exhiben una sobreactividad del sistema nervioso a nivel cardíaco.

Producto de la respuesta hipotensora sostenida del nebivolol, no se halló una correlación entre la misma y los niveles plasmáticos del β -bloqueante utilizando los modelos

PK/PD clásicos. La comparación del efecto hipotensor estableció un comportamiento diferencial según la etiología del cuadro hipertensivo. Mientras que los animales SH y L-NAME experimentaron un mayor descenso inicial de la presión arterial en comparación con los controles normotensos, la respuesta hipotensora no se encontró incrementada en el modelo por sobrecarga de fructosa. En cuanto a la VPA latido-a-latido, se observó que nebivolol, en las dos dosis de trabajo, indujo una reducción significativa en todos los grupos experimentales; sin embargo sólo se hallaron diferencias en la magnitud de dicha reducción en los grupos SH y L-NAME en relación a sus controles. Estos resultados sugieren que, al menos en parte, el nebivolol ejercería un mayor efecto hipotensor en los animales hipertensos mediante el incremento de la liberación de óxido nítrico (ON). El análisis del cociente BF/AF estableció la existencia de una mayor reducción de este parámetro en las ratas hipertensas SH y L-NAME, sin hallarse diferencias en los animales fructosa, en comparación con sus controles normotensos; hallazgo que sugiere una mayor actividad simpaticolítica de nebivolol en estos dos modelos.

Para el efecto bradicardizante no se observaron diferencias significativas en los grupos L-NAME y SH al compararlos con sus respectivos controles, en cambio, en los animales hipertensos por sobrecarga de fructosa se observó una reducción del efecto con respecto al grupo control.

De manera similar al carvedilol, el nebivolol demostró una mayor eficacia antihipertensiva comparado con el atenolol, principalmente en los modelos SH y L-NAME. En el caso de la VPA de corto plazo, el nebivolol también evidenció una mayor disminución que el atenolol en los animales SH y L-NAME. Por último, la reducción de la razón BF/AF también fue superior con nebivolol en los tres modelos de hipertensión experimental.

El análisis de la respuesta bradicardizante no mostró diferencias entre los dos β -bloqueantes en ratas SH, mientras que la respuesta de nebivolol fue inferior en los animales L-NAME y fructosa.

Estos resultados demuestran que, tanto carvedilol como nebivolol, producto de sus propiedades pleiotrópicas, generan efectos beneficiosos adicionales al atenolol, produciendo un efecto cardioprotector potencialmente superior al bloqueante β -adrenérgico de segunda generación.

ABREVIATURAS

ADMA:	Dimetilarginina asimétrica
AF:	Alta frecuencia
AUC:	área bajo la curva
BF:	Baja frecuencia
BF/AF	Relación baja frecuencia/alta frecuencia
B _{máx} :	Unión máxima a proteínas
C _b :	Concentración de carvedilol unido a proteínas
C _{cor} :	Concentración corregida
C _d :	Concentración de carvedilol en el dializado
C _e :	Concentración en el compartimiento de efecto
CE ₅₀ :	Concentración efectiva 50
Cl:	Aclaramiento
CI ₅₀ :	Concentración inhibitoria 50
C _{máx} :	Concentración plasmática máxima
C _p :	Concentración de carvedilol total en plasma
C _(t) :	Concentración al a tiempo t
C _u :	Concentración carvedilol libre
CYP:	Citocromo P450
D:	Dosis
DE:	Desvío estándar
DE ₅₀ :	Dosis efectiva 50

EEM:	Error estándar de la media
E_{max} :	Efecto máximo
eNOS:	Óxido nítrico sintasa endotelial
FC:	Frecuencia cardíaca
Fu:	Fracción de carvedilol no unida
i.v.	Intravenosa
KD:	Constante de disociación
k_{12} ; k_{21} :	Constantes de equilibrio compartimentos central y de efecto
k_{1e} y k_{e1} :	Constante de equilibrio compartimento periférico y de efecto
k_{el} y k_{e0} :	Constantes de eliminación compartimento central y de efecto
K_{in} :	Constante de producción de orden 0
K_{out} :	Constante de eliminación de primer orden
L-NAME:	Éster metílico de N-Nitro-L-arginina
MBF:	Muy baja frecuencia
NADPH:	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NOS:	Óxido nítrico sintasa
ON:	Óxido nítrico
PA:	Presión arterial
PAD:	Presión arterial diastólica
PAS:	Presión arterial sistólica
PAM:	Presión arterial media
PD:	Farmacodinamia
PK:	Farmacocinética

PK/PD:	Farmacocinético-Farmacodinámico
R _{in vitro} :	Recuperación <i>in vitro</i> de la sonda de microdiálisis
R _{in vivo} :	Recuperación <i>in vivo</i> de la sonda de microdiálisis
RAS:	Sistema Renina-Angiotensina
SH:	Esponáneamente hipertensos
T:	Tiempo
t _{1/2 eq} :	Semivida de equilibrio entre los niveles plasmáticos y los niveles en el compartimiento de efecto
Vd:	Volumen de distribución
Vdss:	Volumen de distribución en estado estacionario
VPA:	Variabilidad de la presión arterial
WKY :	Wistar-Kyoto
α :	Constante de distribución
β :	Constante de eliminación
Δ PAM	Cambio de presión arterial media
Δ FC	Cambio de frecuencia cardíaca
γ :	Coefficiente de Hill

INTRODUCCIÓN

Relevancia de la hipertensión arterial

La hipertensión arterial, definida como la elevación sostenida de la presión arterial sistólica y/o diastólica, es indudablemente uno de los grandes problemas sanitarios de la población, producto de su alta prevalencia y su relación etiológica con complicaciones cardiovasculares, cerebrovasculares y renales. A nivel global, las enfermedades cardiovasculares son responsables de aproximadamente 17 millones de muertes por año, casi un tercio del total. Entre ellas, las complicaciones de la hipertensión arterial causan anualmente 9,4 millones de muertes (OMS, 2013). En nuestro país, se estima que la hipertensión afecta al 33,5% de la población, estando sólo la mitad bajo tratamiento (Consenso Latinoamericano sobre Hipertensión Arterial, 2013). Sin embargo, el dato estadístico más alarmante es el bajo porcentaje de pacientes tratados que logra estabilizar sus niveles tensionales. Así, mientras que en Europa un 40% de los pacientes hipertensos tratados logra normalizarlos (Mancia y cols., 2008), solamente un 26,5% de la población hipertensa de nuestro país alcanza dicho objetivo (Consenso Latinoamericano sobre Hipertensión Arterial, 2013). La importancia del control adecuado de la presión arterial en la población hipertensa queda demostrada por la relación continua entre el nivel tensional y el riesgo de enfermedad cardiovascular. Datos de estudios observacionales han establecido que el riesgo de muerte asociada a enfermedad cardíaca isquémica o accidente cerebrovascular aumenta de manera progresiva a partir de un valor de presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) de 115/75 mmHg, respectivamente. Inclusive, por cada 20 y 10 mmHg de incremento de la PAS y PAD se duplica el riesgo de muerte de origen cardiovascular (Lewington y cols., 2002; Consenso Latinoamericano sobre Hipertensión Arterial, 2013).

Varias razones explican el bajo grado de control de la hipertensión arterial en pacientes tratados, entre ellas el incumplimiento terapéutico, el nivel socioeconómico y la falta de educación al paciente hipertenso (Consenso Latinoamericano sobre Hipertensión Arterial, 2013). En relación a este punto, también es necesario destacar que la hipertensión arterial es una enfermedad multifactorial, cuya fisiopatología no está totalmente dilucidada, lo que afecta negativamente al éxito de la terapéutica.

Debido al alto impacto sanitario de la hipertensión arterial, es relevante el estudio de los mecanismos fisiopatológicos intervinientes en el desarrollo de la misma, tanto a nivel clínico como en modelos de hipertensión experimental. Un mayor conocimiento de las causas que originan el aumento sostenido de la presión arterial permitiría una selección más racional de los fármacos antihipertensivos.

Por otro lado, si bien se cuenta con agentes antihipertensivos de elevada eficacia clínica, la mayoría de los pacientes requiere de politerapia para normalizar sus valores tensionales (Consenso Latinoamericano sobre Hipertensión Arterial, 2013). Muchos fármacos antihipertensivos, pese a su extenso uso clínico, no presentan un mecanismo de acción totalmente dilucidado. Entre ellos, los bloqueantes β -adrenérgicos son el caso más emblemático. Aunque estos antihipertensivos se emplean desde hace más de medio siglo, su mecanismo de acción aún es objeto de controversias (Ripley y Sassen, 2014). Por lo tanto, también resulta de sumo interés el estudio de los posibles mecanismos a través de los cuales las drogas antihipertensivas producen un descenso de los niveles tensionales, ya que dicho conocimiento sería una herramienta eficaz con el fin de desarrollar agentes más eficaces.

Farmacología de la hipertensión arterial

Los beneficios del tratamiento antihipertensivo sobre la morbimortalidad cardiovascular dependen en gran parte del descenso de la presión arterial, independientemente de la clase de agentes utilizados (Consenso Argentino sobre Hipertensión Arterial, 2013). La elección del fármaco depende de varios factores; entre ellos, la experiencia previa del paciente con otros fármacos antihipertensivos, el costo del tratamiento, la presencia de comorbilidades, el efecto de las drogas sobre los factores de riesgo cardiovascular del paciente y la posibilidad de interacciones farmacológicas (Consenso Argentino sobre Hipertensión Arterial, 2013). En todos los casos en los que sea posible se recomienda la utilización de fármacos de acción prolongada de modo de asegurar el control de la presión arterial durante las 24 horas con una sola toma diaria, lo cual favorece el cumplimiento del tratamiento por parte del paciente.

El arsenal terapéutico para el control de la hipertensión arterial está compuesto por fármacos considerados de primera línea y fármacos complementarios. Los fármacos de primera línea actúan a través de diversos mecanismos, muchos de los cuales, como ya se mencionó, no están aun totalmente dilucidados. La presión arterial depende principalmente de dos factores: la resistencia vascular periférica y el gasto cardíaco o volumen minuto, además de estar regulada por el sistema nervioso central. Esto determina la existencia de fármacos antihipertensivos con diferentes sitios de acción, entre ellos: arteriolas, venas, corazón, riñón y sistema nervioso central (Consenso Argentino sobre Hipertensión Arterial, 2013).

Dentro del grupo de fármacos de primera línea se incluyen los diuréticos tiazídicos, los bloqueantes del sistema renina angiotensina (SRA) y los bloqueantes cálcicos tipo dihidropiridinas. Todos estos agentes han demostrado no solamente reducir los niveles tensionales, sino también la hipertrofia ventricular izquierda que resulta del cuadro

hipertensivo (Consejo Argentino de Hipertensión Arterial, 2013). La hipertrofia se genera tanto por un mecanismo de adaptación para soportar el mayor estrés debido a la necesidad de ejercer una mayor fuerza de contracción, como por la sobreactividad neurohormonal que acompaña a la hipertensión arterial (Díez y cols., 2001). Es conocido que la noradrenalina, la angiotensina II y la aldosterona provocan efectos tróficos sobre los miocitos cardíacos (Díez y cols., 2001). Dada la existencia de una fuerte correlación entre la hipertrofia ventricular izquierda y la morbimortalidad cardiovascular (Consenso Latinoamericano sobre Hipertensión Arterial, 2013), los fármacos antihipertensivos no solamente deberían normalizar los niveles tensionales, sino también generar un retroceso de la hipertrofia ventricular.

Los β -bloqueantes, aunque hasta hace poco considerados como medicamentos de primera línea en pacientes con hipertensión arterial sin patologías coexistentes, han dejado de ser recomendados para el tratamiento inicial en sujetos hipertensos no complicados (Ripley y Sassen, 2014). Incluso, hoy en día se aconseja que la terapia con β -bloqueantes sea utilizada como tratamiento adicional a un esquema que cuente con un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina o un bloqueante del receptor de angiotensina, un bloqueante de los canales de calcio y/o un diurético (Eighth Joint National Committee, 2014). La recomendación para relegar a los β -bloqueantes es consecuencia de ensayos clínicos y estudios de meta-análisis que demostraron que son inferiores a otros agentes antihipertensivos en cuanto a la reducción de accidentes cerebrovasculares y mortalidad cardiovascular, a pesar de las diferencias relativamente pequeñas en la reducción de la presión arterial en comparación a los mismos. Este análisis también documentó que el único beneficio de la terapia con un β -bloqueante en comparación con placebo es la reducción del riesgo de accidente cerebrovascular, aunque con una magnitud menor a la de otros agentes antihipertensivos de primera línea

(Ripley y Sassen, 2014). Sin embargo, es de notoria relevancia señalar que el atenolol ha sido el β -bloqueante que se evaluó en la gran mayoría (aproximadamente el 75%) de dichos ensayos clínicos. La representación desproporcionada de β -bloqueantes en estos análisis ha estimulado el debate acerca de si la falta de beneficio con los β -bloqueantes es un efecto de clase o se limita a atenolol (Elliott y Childers, 2011).

Daño de órgano blanco y mecanismos de protección de la terapia antihipertensiva

Tradicionalmente se ha considerado que el aumento sostenido de la presión arterial genera repercusiones negativas sobre órganos blanco, entre ellos el corazón, el riñón y el cerebro. En el corazón, por caso, el aumento de la poscarga induce a la hipertrofia y posterior fibrosis del miocardio. Estas alteraciones estructurales terminan por provocar patologías cardíacas como la angina de pecho, la insuficiencia cardíaca y las arritmias. Bien sabido es que la disfunción cardíaca es una patología cardiovascular con un elevado índice de morbimortalidad. En el sistema nervioso central, la hipertensión arterial está asociada a una mayor incidencia de accidente cerebrovascular hemorrágico, generando muerte o discapacidad física del paciente. Por otro lado, a nivel renal, el incremento de la tensión arterial induce a nefroangioesclerosis y progresión hacia la insuficiencia renal. Teniendo en cuenta la elevada tasa de morbimortalidad de la hipertensión arterial debido a los efectos generados sobre los órganos blanco antes mencionados, es de vital importancia la normalización de los valores tensionales en los pacientes hipertensos como conducta preventiva para evitar la progresión hacia un evento cardiovascular mayor (Sociedad Europea de Hipertensión, 2003).

El concepto tradicional de que la protección cardiovascular de la terapia antihipertensiva depende exclusivamente del descenso de la presión arterial, independientemente del grupo farmacológico utilizado, ha sido refutado en los últimos años a partir del descubrimiento de otros factores adicionales que contribuyen en la progresión del daño de órgano blanco, en especial el incremento de la presión arterial central y el aumento de la variabilidad de la presión arterial (VPA).

La presión arterial central, definida por la presión arterial en el punto de salida hacia la aorta, representa la presión directa ejercida sobre el cerebro, el corazón y los riñones, y ha sido establecida como predictor independiente de daño cardiovascular y de eventos cardiovasculares. Debido a la rigidez arterial de los vasos de las extremidades, la PAS se eleva a medida que la sangre circula desde el corazón hacia la periferia, fenómeno conocido como amplificación de onda de presión. Como resultado, la PAS braquial y la presión de pulso son mayores que las presiones centrales en individuos jóvenes, mientras que la diastólica permanece constante (Trudeau, 2014). La diferencia entre la presión sistólica central y braquial puede ser tan alta como 40 mmHg en individuos jóvenes (Ripley y Sassen, 2014). Este patrón es resultado del movimiento de la sangre desde arterias centrales altamente elásticas hacia vasos braquiales más rígidos. La medición de la presión arterial central se realiza mediante técnicas no invasivas de medición de pulsos radiales o carotídeos y una función de transferencia validada que se utiliza para estimar las presiones centrales a partir de la señal obtenida de los pulsos periféricos (Trudeau, 2014).

Hay evidencia que sugiere que la presión arterial central está más estrechamente relacionada con el daño de órgano blanco que la presión arterial medida periféricamente (Roman y cols., 2007). Hallazgos de estudios transversales han establecido que la presión arterial central se correlaciona de manera más estrecha con marcadores de daño

de órgano blanco, como el espesor de la íntima media carotídea y la masa del ventrículo izquierdo, en comparación con la presión arterial braquial (Ripley y Saseen, 2014).

La diferente eficacia que presentan algunos fármacos en cuanto a la disminución de la presión arterial central en comparación con la presión arterial periférica podría ser una de las causas por las cuales agentes que producen similares reducciones en la presión arterial periférica no alcanzan igual protección frente a eventos adversos cardiovasculares y al daño de órgano blanco (Trudeau, 2014). Con respecto a este punto existen trabajos que sugieren que los β -bloqueantes de segunda generación, como atenolol o metoprolol, pueden reducir con menor eficacia la presión aórtica central que la presión arterial braquial. Sin embargo, nuevos estudios sugieren que los β -bloqueantes de tercera generación tienen la capacidad de disminuir la presión arterial central en mayor medida que los β -bloqueantes más antiguos, pese a reducciones similares de la presión arterial braquial (Dhakam y cols., 2008).

Las diferencias en la capacidad cardioprotectora de los antihipertensivos se explica además por la distinta eficacia en términos de atenuación de la VPA. La presión arterial no es constante sino que sufre de oscilaciones profundas y espontáneas a corto plazo (de minutos a días) y por largos períodos (meses) (Grassi y cols., 2012). El incremento en la VPA se ha establecido como un factor de riesgo para el desarrollo de lesión de órgano blanco no sólo en pacientes hipertensos sino también en sujetos normotensos (Grassi y cols., 2012; Parati, 2005). Un gran número de estudios ha demostrado que la VPA de corto plazo es mayor en pacientes hipertensos en comparación con normotensos y la mayor oscilación de la presión arterial está relacionada con el riesgo cardiovascular (Grassi y cols., 2012). Las fluctuaciones de la presión arterial en el rango de minutos a horas reflejan la influencia de la modulación autonómica del aparato cardiovascular y las propiedades elásticas de las arterias (Höcht, 2013). El incremento de la VPA de

corto plazo se debe a la reducción de la actividad de los reflejos cardiopulmonares y arteriales en la amortiguación de cambios en la presión arterial inducidos por estímulos posturales o conductuales y/o a la alteración de la distensibilidad arterial (Höcht, 2013). Además, la presión arterial también muestra oscilaciones a mediano plazo (día a día) y largo plazo (visita a visita) debido a varios factores, entre ellos la distensibilidad arterial, la adherencia al tratamiento y los errores en la medición de la misma (Höcht y cols., 2015). El aumento de la rigidez arterial contribuye en el incremento de la VPA a largo plazo; en relación a esto el *Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis* (MESA) ha demostrado recientemente que las alteraciones funcionales en la distensibilidad aórtica y la elasticidad arterial se asocian con una elevada VPA visita a visita (Shimbo y cols., 2013).

Tabla 1. Diferentes tipos de VPA, sus determinantes e implicancias clínicas

VPA	Rango de tiempo	Determinantes	Implicancias clínicas
Ultra corto plazo	Latido-a-latido	Función vascular miogénica Actividad simpática central Reflejos cardiopulmonares/arteriales Factores neurohumorales	Estimación de factores neurohumorales involucrados en la regulación de la presión arterial
Corto plazo	Minutos a horas	Función vascular miogénica Actividad simpática central Reflejos cardiopulmonares/arteriales Factores neurohumorales Rigidez arterial Actividad/Sueño	Incrementos en VPA día/noche y durante las 24 horas asociado a mayor riesgo de daño a órgano blanco.
Mediano plazo	Día-a-día	Rigidez arterial Dosis y valoración de drogas antihipertensivas	Incremento de la VPA día-a-día asociado a daño de órgano blanco, microalbuminuria, eventos cardiovasculares y mortalidad cardiovascular
Largo plazo	Visita-a-visita	Adherencia al tratamiento Errores en la medición de la presión arterial Distensibilidad arterial Cambios estacionales	VPA a largo plazo independientemente asociada a incremento de incidencia de accidente cerebrovascular

Adaptado de Höcht y cols., 2014

Diferentes mecanismos se han propuesto para explicar el daño de órgano blanco asociado a una alta VPA, incluidos efectos hemodinámicos, disfunción endotelial, activación del SRA y del sistema nervioso simpático (Su y cols., 2001). Mediante la estimación de diferentes parámetros de fluctuación de la presión arterial en el corto plazo -incluyendo desvío estándar, coeficiente de variación y el índice ARV (*Average Rate Variability*)-, distintos estudios preclínicos y clínicos han establecido una asociación entre el incremento de la VPA de corto plazo y un mayor daño de órgano blanco, con aumento de la incidencia de eventos cardiovasculares (Höcht, 2013). Más

recientemente se ha evidenciado la contribución de la VPA de mediano y largo plazo para el desarrollo de la enfermedad cardiovascular. Así, el estudio *Ohasama* documentó que la VPA día-a-día se asocia con mayor riesgo de mortalidad cardiovascular y accidente cerebrovascular (Kikuya y cols., 2008). Además, el incremento de la VPA visita-a-visita se ha asociado con eventos cardiovasculares (accidente cerebrovascular, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca e insuficiencia renal) y mortalidad en diferentes poblaciones, incluyendo pacientes con hipertensión o diabetes (Höcht y cols., 2013). De esta manera, las evidencias clínicas apoyan que la VPA de corto plazo y largo plazo contribuyen de forma independiente al daño de órgano blanco y que la reducción de este parámetro podría ser considerada como una posible nueva meta en medicina cardiovascular (Schillaci y cols., 2011).

Un número creciente de estudios preclínicos y clínicos se ha centrado en la evaluación de los efectos de distintos fármacos de acción cardiovascular sobre la VPA, demostrando la existencia de diferencias en el grado de control de este factor de riesgo emergente (Höcht y cols., 2014). Los hallazgos establecen que los fármacos antihipertensivos, ya sea como monoterapia o en combinación, pueden reducir de forma efectiva la VPA y con ello prevenir la morbilidad y mortalidad cardiovascular. Aunque los mecanismos implicados en los efectos beneficiosos son relativamente desconocidos, la atenuación de VPA inducida por el tratamiento farmacológico puede estar relacionada con su efecto de disminución de la presión arterial, la mejora de la regulación autonómica del sistema nervioso y la reducción de la rigidez arterial (O'Brien, 2012). Sin embargo, los beneficios de la terapia antihipertensiva en términos de atenuación de la VPA dependen del grupo farmacológico. El estudio clínico *Natrilix SR versus Candesartan and Amlodipine in the Reduction of Systolic Blood Pressure in Hypertensive Patients (X-CELLENT)* estableció que el tratamiento con amlodipina

reduce en mayor medida los índices de VPA de corto plazo en pacientes hipertensos en comparación con cardesartan o indapamida de liberación sostenida. Un análisis *post hoc* de los resultados del ensayo ASCOT-BPLA demostró que el bloqueante cálcico amlodipina ejerce una mayor protección contra eventos cardiovasculares en pacientes hipertensos al compararse con atenolol, como consecuencia de su mayor capacidad de reducir la VPA a corto y largo plazo (Rothwell y cols., 2010). En el mismo sentido, un meta-análisis de estudios clínicos reveló que los bloqueantes cálcicos conforman el único grupo farmacológico capaz de atenuar la VPA visita-a-visita en comparación con placebo; agentes con acción sobre el SRA, diuréticos tiazídicos y β -bloqueantes mostraron efectos neutrales (Höcht y cols., 2015).

Evaluación de la regulación de la presión arterial mediante la variabilidad latido-a-latido

La VPA general se compone de dos variables, los componentes cíclicos detectados por el análisis espectral de registro de la presión arterial y la variabilidad errática. Aunque los componentes cíclicos de la VPA no muestran una relación estrecha con el daño a órganos blanco, la identificación de los componentes de frecuencia de VPA por análisis espectral puede proporcionar información sobre los mecanismos implicados en la regulación de la presión arterial (Stauss, 2007) (Tabla 2).

Tabla 2. Mecanismos de regulación de la presión arterial que alteran la VPA con su correspondiente rango de frecuencias.

Mecanismos que alteran la VPA	Rango de Frecuencias
MBF	0.02–0.20 Hz
BF	0.2–0.6 Hz
AF	1.0–4.0 Hz
Modulación simpática	BF
Modulación miogénica	MBF
SRA	MBF
ON endotelial	BF
Actividad vascular simpática	BF/AF

MBF: muy baja frecuencia; BF: baja frecuencia; AF: alta frecuencia
Adaptado de Stauss, 2007

La homeostasis cardiovascular se alcanza gracias a una variedad de sistemas de retroalimentación, tales como el reflejo barorreceptor, sistemas hormonales, el SRA y mecanismos locales como la respuesta vascular miogénica y el sistema de óxido nítrico (ON) endotelial. Casi todos estos mecanismos se ven afectados por enfermedades cardiovasculares, como la hipertensión o la insuficiencia cardíaca (Stauss, 2007). Con el fin de mantener la homeostasis, los mecanismos de control cardiovasculares afectan directa o indirectamente la presión arterial. Sin embargo, el tiempo de respuesta de la puede variar notablemente; por ejemplo, los sistemas de respuesta lenta de control cardiovascular -mecanismos hormonales-, afectan en mayor grado a los componentes de baja frecuencia de VPA que los sistemas de respuesta rápida -mecanismos neuronales-.

La serie de pasos que requiere la modulación simpática del tono vascular incluye el procesamiento del sistema nervioso central, la transmisión ganglionar, la conducción nerviosa simpática, la liberación, la difusión y la unión de los neurotransmisores, la cascada de señalización intracelular y, por último, las interacciones de la actina y miosina. En estudios anteriores, se determinaron las frecuencias características de

respuesta simpática vasomotora en ratas. Allí se concluyó que la arteria mesentérica puede responder a la estimulación nerviosa simpática solamente en frecuencias de estimulación por debajo de 1,0 Hz y que las mayores respuestas dinámicas se encuentran en el rango de baja frecuencia (BF) entre 0,2 y 0,5 Hz. (Stauss, 2007) (Tabla 2).

En arterias aisladas, la vasoconstricción miogénica es considerablemente más lenta que la vasoconstricción mediada por el sistema nervioso simpático. El rango de frecuencia para la modulación miogénica en ratas es 0,02-0,2 Hz y es concordante con estudios que demuestran que la función miogénica contribuye a la autorregulación del flujo sanguíneo a frecuencias inferiores a 0,2 Hz en la circulación renal, a 0,13 Hz en el lecho mesentérico y por debajo de 0,1 Hz en la circulación cerebral (Kolb y cols., 2007).

El sistema del ON endotelial contribuye en la regulación de la presión arterial en el rango de frecuencias 0,05 a 0,4 Hz, considerando que la inhibición de ON sintasa endotelial (eNOS) en animales aumenta la VPA en esta gama de frecuencias. Un aumento en la presión sanguínea incrementa la tensión de estiramiento endotelial y causa la liberación de ON a partir de células endoteliales. El ON difunde hacia las células musculares lisas vasculares adyacentes, donde provoca vasodilatación por activación de la guanilil ciclasa (Stauss, 2007). Nafz y colaboradores demostraron que el sistema ON endotelial amortigua la VPA en el rango de frecuencias entre 0,2 y 0,6 Hz en ratas (Tabla 2). Estudios anteriores reportaron un aumento en la VPA de muy baja frecuencia (MBF) (0,02-0,2 Hz) y una disminución de la VPA de BF (0,2-0,6 Hz) durante la inhibición de la liberación de ON. La reducción de la VPA de BF puede resultar como una respuesta secundaria a la inhibición barorrefleja del nervio simpático que resulta en una reducción de la modulación simpática del tono vascular. El aumento de la VPA de MBF puede ser secundario al incremento de la presión arterial o

directamente relacionado con la reducción de la liberación ON desde el endotelio (Nafz y cols., 1996; Stauss, 2007).

La regulación de la presión arterial por el SRA depende de la síntesis y liberación de renina y angiotensinógeno. Luego, el angiotensinógeno necesita ser convertido en el metabolito activo, la angiotensina II. Por lo tanto, se puede esperar que el SRA afecte la VPA en frecuencias más bajas que el sistema nervioso simpático. De hecho, se ha sugerido que el SRA modula la VPA en el dominio de MBF (Akselrod y cols., 1981). Esta hipótesis concuerda con los estudios realizados por Elghozi y colaboradores que demostraron en ratas conscientes que la VPA de MBF (0,02-0,2 Hz) aumenta si el SRA es estimulado experimentalmente y que este aumento es bloqueado por los antagonistas del receptor AT_1 de angiotensina (Blanc y cols., 2000; Ponchon y Elghozi, 1996) (Tabla 2).

Finalmente, la relación entre la VPA de BF y la VPA de alta frecuencia (AF) (cociente BF/AF) comenzó a utilizarse hace más de 30 años como una medida de la actividad vascular simpática en estudios preclínicos y clínicos (Fazan y cols., 2008) (Tabla 2).

Bloqueantes β -adrenérgicos: Características farmacológicas

Los β -bloqueantes son fármacos útiles por sus propiedades antiarrítmicas, antiisquémicas y antihipertensivas. Más recientemente, algunos agentes de este grupo demostraron ser capaces de reducir la mortalidad y la hospitalización de pacientes con insuficiencia cardíaca sistólica (Consejo Argentino de Hipertensión Arterial, 2013). Estos fármacos inhiben competitivamente los efectos cardiotóxicos de las catecolaminas circulantes y por ello son capaces de reducir el consumo de oxígeno del miocardio mediante la reducción de la frecuencia cardíaca, la presión arterial y la contractilidad (Steg y cols., 2012). A pesar de ello, la mayoría de β -bloqueantes, por ejemplo atenolol,

afecta negativamente a la sensibilidad a la insulina y al metabolismo de carbohidratos y lípidos. Sin embargo, estudios recientes han demostrado un mejor perfil metabólico en los congéneres más modernos, como carvedilol y nebivolol, lo que sugiere que estos últimos podrían aventajar a los primeros en la terapéutica (Carella y cols., 2010).

Los β -bloqueantes difieren tanto en sus características farmacocinéticas como en las farmacodinámicas. Existen diferencias en cuanto a la absorción gastrointestinal, el metabolismo hepático de primer paso, la solubilidad en lípidos, la unión a proteínas plasmáticas, la penetración en sistema nervioso central, la concentración en el tejido cardíaco, la velocidad de biotransformación hepática y el aclaramiento (Cl) renal del fármaco y/o metabolitos (Frishman, 2002). En cuanto a las diferencias en el perfil farmacodinámico, podemos diferenciarlos por la selectividad β_1 , el agonismo parcial o inverso, el efecto estabilizador de la membrana y las propiedades vasodilatadoras. Por eso, y contrariamente a lo que puede suponerse, los β -bloqueantes son una familia heterogénea, a punto tal que pueden clasificarse en tres generaciones con propiedades farmacológicas bien diferenciables: los de primera generación que bloquean de manera no específica receptores β_1 y β_2 (propranolol), los de segunda generación que bloquean con mayor afinidad al receptor β_1 (atenolol) y los β -bloqueantes de tercera generación capaces de inducir vasodilatación (carvedilol y nebivolol).

Tabla 3: Propiedades farmacológicas de β -bloqueantes utilizados en el tratamiento de la hipertensión arterial.

	Selectividad β_1	Actividad simpaticomimética intrínseca	Efecto vasodilatador	Lipofilicidad	Eliminación
Atenolol	++	0	0	Baja	Renal
Bisoprolol	+++	0	0	Media	Renal/Hepática
Bucindolol	0	+	+ bloqueo α_1	Media	Hepática
Carteolol	0	+	0	Baja	Hepática/Renal
Carvedilol	0	0	++bloqueo α_1	Media	Hepática
Labetalol	0	+	++bloqueo α_1	Baja	Hepática
Metoprolol	++	0	0	Alta	Hepática
Nadolol	0	0	0	Baja	Renal
Nebivolol	+++	0	++aumento de ON	Media	Hepática
Propranolol	0	0	0	Alta	Hepática

0: ausente; +: bajo; ++: moderado; +++: elevado

Adaptado de Höcht y cols., 2014

Entre los diferentes bloqueantes β -adrenérgicos, atenolol, carvedilol y nebivolol son, hoy en día, ampliamente prescritos para el tratamiento de diferentes enfermedades cardiovasculares, incluyendo la hipertensión arterial. Estos bloqueantes presentan diferencias sustanciales tanto en su perfil farmacocinético como farmacodinámico. El atenolol es un β -bloqueante de segunda generación que a dosis terapéuticas posee cierta selectividad por el receptor β_1 . Dado que la afinidad del atenolol por el receptor β_1 es alrededor de 10 veces mayor respecto al adrenoceptor β_2 , la cardioselectividad se pierde con la administración de dosis elevadas (Wang y cols., 1999; Pires de Abreu y cols., 2002). Al ser una molécula hidrofílica, su eliminación es predominantemente renal de manera inalterada (Rigby, 1985). El atenolol se administra como mezcla racémica (R y S), si bien solamente el enantiómero S posee actividad farmacológica.

Por su parte, tanto carvedilol como nebivolol se diferencian del atenolol por la presencia de su actividad vasodilatadora. En este contexto, el carvedilol es un β -bloqueante de tercera generación racémico con propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas enantioselectivas (Keating y Jarvis, 2003). Está formado por dos enantiómeros (R y S) y es ampliamente metabolizado por las isoformas del citocromo P-450 CYP2D6 y CYP1A2. En cuanto a la farmacodinamia, este agente posee efectos pleiotrópicos, incluyendo actividad antioxidante, inhibición de la apoptosis, acción antiinflamatoria y protección mitocondrial (Ruffolo y cols., 1990). Los enantiómeros de carvedilol muestran un comportamiento farmacocinético diferente tanto en humanos (Phuong y cols., 2004) como en animales normotensos, teniendo en cuenta que el volumen de distribución (Vd) y el Cl del S-carvedilol son mayores a los del enantiómero R (Stahl y cols., 1993). También existen diferencias en cuanto a la afinidad por los receptores adrenérgicos. Sólo el S-carvedilol bloquea con alta afinidad tanto al receptor β_1 como al β_2 adrenérgico de manera inespecífica (Keating y Jarvis, 2003). Por el contrario, ambos muestran propiedades antagonistas similares sobre los receptores α_1 -adrenérgicos. Por lo tanto, se espera que los enantiómeros de carvedilol contribuyan de manera diferente a la respuesta cronotrópica e hipotensora. Algunos de los metabolitos de carvedilol tienen actividad antagonista β -adrenérgica, aunque sólo el metabolito 4-hidroxifenilo es aproximadamente 3 veces más potente que el carvedilol (Frishman, 1998).

El nebivolol es un bloqueante β -adrenérgico de tercera generación capaz de antagonizar de manera altamente selectiva y prolongada al receptor β_1 -adrenérgico y de ejercer propiedades vasodilatadoras debido a la estimulación de la actividad de la eNOS en arterias periféricas (Howlett, 2014). Nebivolol es administrado como mezcla racémica que contiene en proporciones equivalentes los isómeros *d* y *l* con propiedades farmacológicas diferentes (Gao y Vanhoutte, 2012). Mientras que *d*-nebivolol presenta

actividad β_1 -bloqueante, ambos estereoisómeros son responsables de la estimulación de la eNOS (Gao y Vanhoutte, 2012). Nebivolol es el bloqueante β -adrenérgico con mayor especificidad sobre el receptor β_1 , con una afinidad relativa $\beta_1/\beta_2 >300$. El aspecto farmacodinámico de mayor interés clínico de nebivolol es su capacidad de inducir vasodilatación dependiente del ON. Aunque los mecanismos exactos que contribuyen en el incremento de la actividad de la eNOS inducido por nebivolol no se han dilucidado completamente, la mayor producción de ON se asocia con efectos vasculares y miocárdicos benéficos. En este contexto, nebivolol es capaz de activar el receptor β_3 -adrenérgico endotelial promoviendo la estimulación directa de la eNOS (Vanhoutte y Gao, 2013). La actividad de la eNOS también es incrementada de manera indirecta por nebivolol mediante la reducción de los niveles de ADMA, un inhibidor endógeno competitivo de todas las isoformas de la NOS (Vanhoutte y Gao, 2013). Finalmente, nebivolol actúa como agente secuestrante de especies reactivas de oxígeno y es capaz de inhibir la actividad de la NADPH oxidasa. Como resultado de esta acción antioxidante, este bloqueante β -adrenérgico de tercera generación previene el desacoplamiento de la eNOS y la reducción de la biodisponibilidad del ON (Vanhoutte y Gao, 2013). A nivel vascular, la difusión del ON hacia el músculo liso promueve la reducción persistente del tono vascular y suprime el proceso de remodelado (Vanhoutte y Gao, 2013).

En el plano farmacocinético, el nebivolol exhibe un perfil enantioselectivo considerando que el Cl y el Vd del *l*-nebivolol son significativamente mayores a los del *d*-nebivolol (Gao y Vanhoutte, 2012). Como consecuencia de su elevada lipofilia, es rápidamente absorbido luego de su administración oral y es sometido a metabolismo hepático extenso por reacciones de glucuronidación y, en menor medida, por oxidación a través de la isoenzima CYP2D6 (Gao y Vanhoutte, 2012). Como resultado, las propiedades farmacocinéticas dependen de la presencia de polimorfismo genético del CYP2D6, a tal

punto que la vida media de eliminación de nebivolol es de 12 y 19 horas en sujetos metabolizadores extensos y lentos, respectivamente (Gao y Vanhoutte, 2012). Luego de la administración de la misma dosis, la concentración plasmática máxima de nebivolol es 5 veces mayor en metabolizadores lentos (Gao y Vanhoutte, 2012). Estas diferencias sustanciales en el perfil cinético de nebivolol no repercuten a nivel clínico dado que los metabolitos hidroxilo y glucurónido del nebivolol son activos y contribuyen en la actividad farmacológica (Gao y Vanhoutte, 2012).

Modelos de hipertensión experimental

Debido a que la etiología de la hipertensión puede ser multifactorial, el uso de modelos animales experimentales proporciona información valiosa sobre muchos aspectos de la enfermedad, incluyendo la etiología, fisiopatología, complicaciones y tratamiento. Además, al existir numerosas sustancias endógenas implicadas en el control de la presión arterial -entre ellas calicreínas, vasopresina, ON, catecolaminas, endotelinas y prostaglandinas, entre otras-, es necesaria la utilización de múltiples modelos experimentales para determinar la importancia relativa de los diferentes sistemas neurohumorales en el desarrollo y mantenimiento de la hipertensión arterial. Los modelos de animales permiten el estudio del efecto antihipertensivo de los distintos fármacos, así como los mecanismos fisiopatológicos intervinientes en los diferentes tipos de hipertensión arterial. Entre los diferentes modelos experimentales disponibles, que intentan reproducir los distintos subtipos etiológicos de la hipertensión arterial en humanos, se destacan la rata espontáneamente hipertensa (SH), y la hipertensión inducida por la toma del inhibidor de la NOS, éster metílico de N-Nitro-L-arginina (L-NAME), o de fructosa.

Hipertensión inducida por ingesta de L-NAME: Es un hecho que en los pacientes hipertensos existe una disfunción endotelial que tiende a perpetuar la alteración del tono vascular y que resulta responsable de los cambios estructurales que acompañan la hipertensión complicada con daño en los órganos blanco. El ON desempeña un papel fundamental en la regulación de la resistencia vascular sistémica, ejerciendo un efecto vasodilatador. La administración oral crónica del inhibidor de la NOS, L-NAME, genera hipertensión persistente asociada con lesión renal caracterizada por glomeruloesclerosis, isquemia glomerular e infiltración intersticial en el riñón (Dornas y Silva, 2011). Este modelo de hipertensión experimental se asocia con una intensa vasoconstricción periférica y el consecuente aumento de la resistencia vascular. En cuanto al gasto cardíaco, algunos autores han indicado la existencia de una reducción del mismo aún durante la inhibición crónica de la NOS. Biancardi y cols. (2007) han propuesto, además, la existencia de una sobreactividad simpática en la hipertensión inducida por L-NAME, considerando el hecho de que el bloqueo simpático con hexametonio provoca una disminución de la resistencia periférica en este modelo experimental. En relación a las anomalías cardíacas, el nivel de hipertrofia en este modelo es relativamente menor en comparación con otros modelos con niveles de presión arterial similares (Dornas y Silva, 2011).

Hipertensión genética: la importancia de las ratas SH, originalmente endogámicas de ratas Wistar y sus controles normotensos Wistar Kyoto (WKY), se ha atribuido a la similitud de su fisiopatología con la hipertensión esencial en los seres humanos. Estos animales desarrollan hipertensión alrededor de las 4-6 semanas de edad sin intervención fisiológica, farmacológica o quirúrgica; sin embargo, los factores ambientales afectan la elevación de la presión arterial (Dornas y Silva, 2011). Estudios *in vivo* han demostrado que en las primeras etapas de la hipertensión, las ratas SH presentan un aumento del

gasto cardíaco con una resistencia periférica total normal y un incremento de la actividad simpática. A medida que el animal se desarrolla, el estado hipertensivo progresa, el gasto cardíaco regresa a los valores normales y los vasos sanguíneos hipertrofiados producen un aumento en la resistencia periférica total. Con el avance de la hipertensión, las ratas SH desarrollan progresivamente (entre 6 y 24 meses de edad) alteraciones estructurales en el corazón en forma de hipertrofia cardíaca progresiva (Dornas y Silva, 2011).

Hipertensión inducida por sobrecarga de fructosa: Es un modelo animal frecuentemente utilizado para estudiar la fisiopatología del síndrome metabólico. La administración de una dieta rica en fructosa produce un incremento moderado de la presión arterial asociado con trastornos metabólicos. La ingesta continua de una sobrecarga de fructosa promueve una serie de modificaciones metabólicas y hemodinámicas caracterizadas por hipertrigliceridemia, hiperinsulinemia, resistencia a la insulina, hiperactividad del SRA y del sistema nervioso simpático. Desde hace más de dos décadas se postula la hipótesis de que la resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia concomitante son el nexo entre los trastornos metabólicos y el desarrollo de hipertensión arterial en estos animales, así como su mantenimiento a expensas de una sobreactividad simpática. Diversos hallazgos avalan, hasta el día de hoy, el posible papel de la insulina en la génesis de la hipertensión arterial en este modelo experimental (Reaven y cols., 1989). Además, algunos estudios han demostrado la presencia de estrés oxidativo y la reducción de la disponibilidad de ON en ratas alimentadas con fructosa, lo que puede contribuir al desarrollo de la hipertensión mediante una mayor generación de especies reactivas de oxígeno (Roberts y cols., 2000).

Modelos farmacocinéticos-farmacodinámicos (PK/PD)

Además de la disponibilidad de diferentes modelos de hipertensión experimental, el estudio preclínico de las propiedades cardiovasculares de los fármacos antihipertensivos se enriquece por la posibilidad de aplicar modelos farmacocinéticos-farmacodinámicos (PK/PD), los cuales permiten una mejor descripción de las características farmacológicas de los bloqueantes β -adrenérgicos. Varias razones justifican el desarrollo de modelos PK/PD en la evaluación de agentes cardiovasculares. Como se mencionó anteriormente, existe una manifiesta falta de efectividad clínica de la terapéutica antihipertensiva que se evidencia por el elevado porcentaje de pacientes tratados que no logra normalizar sus valores tensionales. Una de las principales causas es, sin duda, la falla en la dosificación óptima de los fármacos antihipertensivos (Stergiou y cols., 2007). Hoy en día, un gran número de razones justifica la utilización del modelado PK/PD de la respuesta cardiovascular a los β -bloqueantes, incluyendo el incremento de la información preclínica durante el proceso de desarrollo, la identificación de los factores que contribuyen a la variabilidad de la respuesta de estas drogas, la capacidad de identificar pobres o no respondedores y la optimización de las dosis en cada paciente hipertenso.

En este contexto, varios estudios han encontrado que la respuesta de la presión arterial inducida por los fármacos antihipertensivos está relacionada con los niveles tisulares de los mismos y, por lo tanto, el modelado PK/PD permite una mayor comprensión de las características farmacocinéticas y farmacodinámicas de los agentes antihipertensivos. La experiencia en modelado PK/PD ha demostrado su papel para mejorar el uso clínico de fármacos antihipertensivos. Esta metodología no sólo contribuye a la optimización de la dosificación del fármaco y de la selección del paciente en la práctica clínica, sino que incrementa la información de nuevos fármacos antihipertensivos en su proceso de

desarrollo. Estos antecedentes establecen que la terapia farmacológica de la hipertensión se podría mejorar mediante la evaluación de las propiedades PK/PD de los agentes antihipertensivos (Höcht y cols., 2008).

Desde el punto de vista metodológico, los modelos PK/PD crean un puente entre el curso temporal de las concentraciones de fármacos en el organismo y la intensidad de la respuesta farmacológica observada (Derendorf y cols., 2000). El enlace se establece mediante modelos matemáticos que permiten la estimación de parámetros farmacodinámicos como la concentración efectiva que produce el 50% de la respuesta máxima (CE_{50}) y el efecto máximo ($E_{m\acute{a}x}$). El modelado PK/PD también provee información acerca del inicio, magnitud y de la duración del efecto terapéutico (Mancia y cols., 2007). En este punto es importante destacar que, si bien tradicionalmente el parámetro dosis efectiva media (DE_{50}) fue considerado como indicador de la potencia de un fármaco, este es un parámetro híbrido que depende tanto de la afinidad del fármaco por su blanco molecular como de sus características farmacocinéticas. Por lo tanto, para asegurar una dosificación adecuada del agente antihipertensivo es esencial la estimación de parámetros farmacodinámicos "puros", como la CE_{50} .

El modelado PK/PD requiere de la medición simultánea de niveles tisulares del fármaco y los correspondientes efectos farmacológicos en múltiples puntos temporales (Toutain, 2002). Además, para un correcto diseño del modelo PK/PD, es necesaria una medición precisa de la intensidad del efecto farmacológico del compuesto activo. Un efecto del fármaco puede ser considerado como cualquier cambio en los parámetros fisiológicos inducidos por la administración del mismo, en comparación con los valores de referencia respectivos. La cuantificación del efecto debe cumplir los parámetros de validación, tales como continuidad, sensibilidad, objetividad y repetitividad (Pérez-Urizar y cols., 2000).

Para mayor precisión en la estimación de la relación PK/PD, el número de mediciones de niveles tisulares de fármaco y del efecto correspondiente debería ser lo más elevado posible (Toutain, 2002). También es importante determinar el retraso entre respuesta del fármaco y niveles tisulares. Para evaluar la existencia de una “desconexión” entre los niveles plasmáticos y el efecto antihipertensivo, es necesario graficar los niveles plasmáticos y el efecto farmacológico obtenido en diferentes puntos temporales, conectándolos por orden cronológico. En el diagrama aparece una histéresis cuando la magnitud del efecto corresponde a más de una concentración de fármaco. Así, una histéresis de giro antihorario puede explicarse por el desequilibrio entre la biofase y el compartimiento plasmático, la aparición de metabolitos activos o por mecanismos de acción indirectos (Mandema y cols., 1992; Dayneka y cols., 1993). Por otro lado, se sugiere una tolerancia en el efecto farmacológico cuando se observa un *loop* de histéresis de giro de agujas del reloj (Bauer y cols., 1997). Si hay conexión temporal entre niveles tisulares y respuesta farmacológica, los niveles plasmáticos podrán relacionarse directamente con el efecto farmacológico sin la necesidad de un nexo (Csajka y Verotta, 2006).

Debido a su estructura química, los niveles tisulares de los β -bloqueantes pueden ser monitoreados continuamente por medio de métodos analíticos altamente sensibles, especialmente la cromatografía líquida acoplada a la detección de fluorescencia. Teniendo en cuenta la estereoselectividad de estos fármacos, varios métodos cromatográficos enantioselectivos se han desarrollado para la separación y cuantificación de cada enantiómero. Los modelos PK/PD desarrollados para los β -bloqueantes difieren entre sí en los datos PK, los puntos finales PD y los modelos matemáticos para el enlace PK/PD. En cuanto a los datos de PK, los niveles totales y libres en plasma de los β -bloqueantes se han utilizado comúnmente en los estudios

PK/PD. Como en general sólo el S-enantiómero posee actividad β -bloqueante (Höcht y cols., 2010), los modelos diseñados para la estimación de los parámetros PK/PD de respuesta cronotrópica suelen incluir métodos enantioselectivos y de cuantificación específica de los niveles plasmáticos del S-enantiómero.

Reportes previos han sugerido la ausencia de una relación entre la concentración plasmática de los β -bloqueantes y los cambios en la presión arterial (Esler y cols., 1997). Hoy en día se sabe que dicha hipótesis refleja una falla en los medios utilizados para detectar dicha correlación. Varios factores han obstaculizado la posible identificación de una asociación, incluyendo la incapacidad para obtener suficientes datos PD, el fracaso para identificar y cuantificar el retraso temporal en la aparición del efecto farmacológico, el uso de rangos de concentración no aconsejables y el empleo de dosis en lugar de concentraciones (Brynne y cols., 1998; Meredith, 1997). En contraste con estos resultados, los últimos modelos PK/PD han tenido éxito en la estimación *in vivo* de parámetros PD de la acción antihipertensiva de diferentes β -bloqueantes en animales de laboratorio y ensayos clínicos. Además, la disponibilidad de *software* para el análisis espectral del registro de la presión arterial continua ofrece la oportunidad de estudiar la relación entre los niveles plasmáticos de β -bloqueantes de tercera generación y su efecto sobre la actividad simpática vascular (Höcht y cols., 2010).

Como fue señalado antes, en ausencia de desconexión temporal entre las concentraciones tisulares y la respuesta farmacológica, las concentraciones plasmáticas de los β -bloqueantes pueden estar directamente relacionadas con los efectos cardiovasculares utilizando modelos PK/PD relativamente simples (Höcht y cols., 2006). De esta manera, Tenero y colaboradores (2006) han aplicado con éxito un modelo directo de inhibición de efecto para el estudio de los parámetros PK/PD del carvedilol sobre la reducción de la frecuencia cardíaca (FC) inducida por el ejercicio en

pacientes con insuficiencia cardíaca leve a severa, o infarto de miocardio con disfunción ventricular izquierda (Tenero, 2006). Sin embargo, casi todos los estudios PK/PD sobre β -bloqueantes han descrito un retraso en la aparición tanto del efecto cronotrópico como de la reducción de la presión arterial con respecto a las concentraciones del fármaco en plasma. En estos casos, las concentraciones plasmáticas pueden no estar directamente relacionadas con el efecto del fármaco y se requiere de modelos PK/PD más complejos, tales como los modelos de compartimiento de efecto y de respuesta fisiológica indirecta, para una estimación precisa de parámetros PK/PD.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La hipótesis principal del presente trabajo es que, producto de las acciones pleiotrópicas, los efectos cardiovasculares de los β -bloqueantes de tercera generación - carvedilol y nebivolol- son superiores a las de atenolol, en especial en términos de reducción de la VPA en los diferentes modelos experimentales. Teniendo en cuenta la participación del sistema nervioso simpático en el desarrollo y mantenimiento de la hipertensión arterial en los distintos modelos experimentales, se postula además que tanto el carvedilol como el nebivolol podrían presentar mayor eficacia antihipertensiva, mayor potencia y mejoría en la reducción de la VPA de corto plazo en los animales hipertensos al compararlos con los controles normotensos. También es posible que la eficacia antihipertensiva de los bloqueantes β -adrenérgicos varíe entre los distintos modelos experimentales en estudio, dado el diferente compromiso del sistema nervioso simpático y del sistema del ON endotelial en el mantenimiento del estado hipertensivo. A raíz de ello, se postula que el estudio de los distintos componentes de la VPA permitiría caracterizar la participación de los diferentes sistemas neurohormonales, tales como el SRA, el tono vascular miogénico y el sistema nervioso simpático vascular en el estado fisiopatológico de los diversos modelos de enfermedad cardiovascular. Producto de las diferencias en el perfil farmacodinámico, se espera que los β -bloqueantes en estudio modifiquen de manera diferencial los distintos componentes de la VPA.

Por otro lado, considerando las propiedades farmacocinéticas de carvedilol y nebivolol, el presente trabajo postula que el estado hipertensivo puede alterar el comportamiento cinético enantioselectivo de los β -bloqueantes investigados. La existencia de posibles cambios en la composición corporal, además de las alteraciones en el flujo hepático y en

la dotación enzimática presentes en la hipertensión experimental, puede modificar los parámetros farmacocinéticos de los diferentes enantiómeros de carvedilol y nebivolol en comparación con el control normotenso con un potencial impacto sobre la respuesta cardiovascular de los mismos.

De acuerdo a las hipótesis planteadas, los objetivos de este trabajo de tesis son:

- a) Determinar si existen diferencias en el perfil farmacocinético de los β -bloqueantes de tercera generación carvedilol y nebivolol en los tres modelos de hipertensión experimental estudiados; rata SH, rata hipertensa por sobrecarga de fructosa y rata hipertensa por administración crónica de L-NAME.
- b) Evaluar la respuesta antihipertensiva y bradicardizante del carvedilol y el nebivolol en los tres modelos de hipertensión experimental estudiados.
- c) Caracterizar la relación entre los efectos cardiovasculares del carvedilol y el nebivolol y sus niveles plasmáticos en los modelos experimentales de hipertensión en estudio mediante modelos PK/PD.
- d) Evaluar el efecto de la administración endovenosa de atenolol, carvedilol y nebivolol sobre los diferentes dominios de frecuencia de la VPA en diferentes modelos experimentales.
- e) Caracterizar, a través del análisis de la VPA en distintos dominios de frecuencia, el compromiso de los sistemas neurohormonales en el estado fisiopatológico de diferentes modelos experimentales.
- f) Evaluar el efecto de la administración endovenosa de atenolol, carvedilol y nebivolol sobre VPA de corto plazo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Modelos animales

Para el desarrollo del modelo de hipertensión por inhibición de la NOS, se utilizaron ratas Wistar macho (3 meses, 220-270 g), las cuales recibieron solución de L-NAME (Sigma-Aldrich, MO, USA) 0.4 mg/ml (40 mg/kg/día) en el agua de bebida *ad libitum* durante dos semanas. Los animales del grupo control bebieron agua corriente durante dos semanas.

El modelo experimental de hipertensión genética fue implementado mediante el uso de ratas macho SH (3 meses, 220-270g) y animales normotensos WKY (3 meses, 220-270g) endocriados en el bioterio de la cátedra de Farmacología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA).

Para la obtención de animales con síndrome metabólico experimental, se utilizaron ratas Sprague-Dawley macho (220–270g), las cuales tomaron solución de fructosa (Droguería Saporiti, Buenos Aires, Argentina) (10% p/v) como agua de bebida durante seis semanas. Los animales del grupo control bebieron agua corriente durante seis semanas.

Los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con los "Principios de cuidado de los animales de laboratorio" (NIH publicación No. 85-3, revisada 1985). Los animales se mantuvieron en un ciclo de 12 horas luz/oscuridad y se mantuvieron en una habitación a 22 ± 2 °C con un reciclado adecuado de aire. Todos los animales fueron alimentados con alimento estándar para roedores (Asociación Cooperativas Argentinas, Buenos Aires, Argentina), conteniendo: 20% de proteínas, 3% grasas, 2% fibra, 6% minerales y 69% de almidón y suplementos vitamínicos.

Preparación de formulaciones

Tanto el carvedilol (Droguería Saporiti, Buenos Aires, Argentina) como el nebivolol (Laboratorio Raffo, Buenos Aires, Argentina) son insolubles en agua y por lo tanto deben ser solubilizados mediante el uso de una formulación para su administración intravenosa. Las formulaciones contienen, además de los fármacos, 0.5% de polivinilpirrolidona, 40% propilenglicol, 10% de glicerina y agua purificada en cantidad suficiente. Este vehículo no produce efectos significativos sobre la presión arterial, la FC y la VPA. El atenolol (Droguería Saporiti, Buenos Aires, Argentina), debido a su buena solubilidad, fue disuelto en solución Ringer.

Diseño experimental

Los animales fueron anestesiados con éter (Sintorgan, Buenos Aires, Argentina) y canulados en la arteria carótida izquierda y en la vena femoral izquierda, mediante una cánula de polietileno con solución salina heparinizada (25 UI/ml). La cánula se insertó en la vena femoral y se condujo, por debajo de la piel, hasta la salida de la misma en la base del cuello, para la administración de las soluciones de β -bloqueantes. Los experimentos se realizaron en animales despiertos 24 horas después de la colocación de las cánulas, ya que se ha establecido que un período de recuperación de 24 horas es adecuado para la evaluación de efectos de los fármacos en ratas conscientes.

En el día del experimento, la cánula insertada en la arteria carótida izquierda se conectó a un transductor de presión (Spectramed P23XL, Spectramed, Oxnard, CA, USA) acoplado a un polígrafo (Grass 79 D, Grass Instrument, Quincy, MA, USA). El polígrafo se conectó a un conversor digital (Polyview, PVA 1, Grass-Astro Med, West

Warwick, RI U.S.A.). El *software* utilizado para analizar los registros fue el Polyview 2.3 (Astro-Med, West Warwick, RI). Los valores basales de presión arterial media (PAM) y de FC fueron registrados durante 1 hora antes de la administración de los fármacos. La PAM fue calculada como la suma entre la presión arterial diastólica y un tercio de la presión de pulso. La FC se estimó tacográficamente por análisis de las ondas de pulso del registro de presión arterial. Los registros de presión arterial fueron almacenados en computadora y analizados con posterioridad mediante el uso del *software* Polyview 2.3.

Luego del registro de los parámetros cardiovasculares basales se administraron por vía intravenosa durante 30 segundos atenolol (10 mg/kg), carvedilol (1 o 5 mg/kg), nebivolol (3 o 10 mg/kg) o vehículo, registrándose la PAM y la FC de manera continua. Para la evaluación del perfil farmacocinético, se recolectaron muestras de sangre de 100 μ l desde la cánula carotídea en los siguientes tiempos: 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120 y 180 minutos. Es importante mencionar que el muestreo de sangre podría alterar el comportamiento farmacocinético y farmacodinámico de fármacos antihipertensivos debido a la pérdida de volumen. Sin embargo, en nuestro protocolo experimental sólo se extrajeron aproximadamente 800 μ l de sangre durante 3 horas para la estimación de la concentración plasmática de carvedilol. Este volumen es significativamente menor al volumen máximo recomendado de sangre para ser extraído (3,5 ml) en una rata de 250 g de peso, y por lo tanto se podría sugerir que la pérdida de sangre durante nuestro protocolo experimental no afectó las propiedades PK y PD de carvedilol y nebivolol (Aimone, 2005).

Determinaciones analíticas de carvedilol y nebivolol

Los niveles plasmáticos de los enantiómeros de carvedilol y nebivolol fueron cuantificados mediante cromatografía líquida (HPLC) con columna enantioselectiva y detección fluorométrica. El equipamiento cromatográfico incluyó una bomba isocrática (Spectra System P1000, Thermo Finnigan, France), una columna quiral Chirex (S)-ICA and (R)-NEA (Phenomenex, Torrance, CA, USA) y un detector fluorométrico (FL-3000, Thermo Finnigan, France). Para la evaluación de los niveles séricos de ambos β -bloqueantes de tercera generación, las muestras de sangre extraídas en los tiempos antes especificados fueron recolectadas en tubos Eppendorf conteniendo 5 μ l de solución salina heparinizada y centrifugadas a 10.000 rpm durante 2 minutos a 4°C. El sobrenadante (30 μ l aproximadamente) fue separado y el carvedilol o nebivolol fueron extraídos mediante una extracción líquida. Así, al sobrenadante se agregaron 20 μ l de estándar interno (2 μ g/ml propranolol (Droguería Saporiti, Buenos Aires, Argentina) en metanol (Sintorgan, Buenos Aires, Argentina)), 50 μ l de carbonato de sodio 0.5 M y 1 ml de diclorometano (Sintorgan, Buenos Aires, Argentina). La muestra se agitó con vórtex durante 2 minutos y se centrifugó a 2.000 rpm durante 10 minutos. La fase orgánica se transfirió a un tubo cónico y se evaporó con nitrógeno. El extracto seco resultante se reconstituyó con 100 μ l de fase móvil y se inyectó en el sistema cromatográfico. Los niveles séricos de ambos enantiómeros de carvedilol o nebivolol fueron cuantificados por HPLC con detección por fluorescencia. En el caso del carvedilol, las longitudes de onda de excitación y de emisión fueron 238 y 350 nm, respectivamente. La fase móvil utilizada estuvo compuesta por hexano: diclorometano: etanol: ácido trifluoroacético (65: 30: 5: 0,2). Los tiempos de retención del R-carvedilol y S-carvedilol fueron 12,8 \pm 0,3 minutos y 14,6 \pm 0,4 minutos, respectivamente. El límite de cuantificación fue de 20 ng/ml. El método fue lineal en el rango de 20 a 1.000 ng/ml y

las muestras con una concentración de carvedilol mayor al límite superior fueron diluidas con plasma con el fin de ingresar en dicho rango.

En el método cromatográfico de nebivolol, las longitudes de onda de excitación y de emisión fueron 282 y 318 nm, respectivamente. La fase móvil utilizada estuvo compuesta por hexano: diclorometano: etanol: ácido trifluoracético (65: 35: 5: 0.2). Los tiempos de retención de *d*-nebivolol y *l*-nebivolol fueron $5,7 \pm 0,4$ minutos y $7,2 \pm 0,5$ minutos, respectivamente. El límite de cuantificación fue de 20 ng/ml. El método fue lineal en el rango de 20 a 1.000 ng/ml y las muestras con una concentración de nebivolol mayor al límite superior fueron diluidas con plasma con el fin de ingresar en dicho rango.

Análisis farmacocinético de carvedilol y nebivolol

Para el estudio de la farmacocinética del R- y S-carvedilol y del *d*- y *l*-nebivolol se utilizó un análisis compartimental con aplicación de un modelo de dos compartimientos con eliminación de cinética de primer orden. El análisis farmacocinético fue realizado utilizando un programa de regresión de cuadrados mínimos no lineal (TOPFIT). El área bajo la curva (AUC) fue calculada mediante el método de los trapecios. El Cl y el Vd_{ss} fueron estimados mediante los métodos convencionales (Gibaldi y Perrier, 1982). La elección del modelo farmacocinético se basó en la comparación del criterio de información de Akaike (AIC) como parámetro de bondad de ajuste entre diferentes modelos farmacocinéticos compartimentales.

Análisis farmacodinámico de carvedilol y nebivolol

Los efectos medidos, como se detalló antes, fueron la presión arterial, la FC y la VPA de corto plazo y latido-a-latido. Para la medición de la presión arterial y la FC se tomaron niveles basales durante 1 hora y luego se compararon con los niveles obtenidos a los distintos tiempos. Los valores se expresaron como porcentaje de disminución con respecto al basal para lograr independencia de los valores basales.

La VPA se calculó de forma continua mediante la determinación del DE de períodos de 3 minutos de los registros de presión arterial obtenidos de acuerdo con trabajos previos de otros autores (Di Verniero y cols., 2010; Pladys y cols., 2004). La evaluación de la VPA latido-a-latido se realizó mediante el análisis espectral del registro de presión arterial utilizando la Transformada Rápida de Fourier con una ventana de Hamming (Polyview Astro-Med, West Warwick, RI). Se calcularon las densidades espectrales en la gama de MBF (0,1-0,2 Hz), BF (0,2 a 0,7 Hz) y AF (0,7-2,5 Hz) (Pladys y cols., 2004). Aunque la variabilidad BF se ve afectada por la modulación simpática del tono vascular, se utilizó la relación BF/AF como índice de la actividad simpática vascular. Este procedimiento de normalización tiende a minimizar el efecto de los cambios en los valores absolutos de variabilidad de BF (Pladys y cols., 2004; Souza y cols., 2008).

Análisis PK/PD del carvedilol

En el estudio PK/PD del fármaco, las concentraciones plasmáticas de carvedilol racémico y de S-carvedilol fueron relacionados con el efecto hipotensor y bradicardizante, respectivamente. Al comparar simultáneamente los datos farmacocinéticos y farmacodinámicos para la estimación de los parámetros PK/PD del carvedilol, se encontró un tiempo de latencia entre las concentraciones plasmáticas y los efectos cardiovasculares (Figura 1). Una posible explicación para el retraso en el inicio

de la acción cardiovascular de los β -bloqueantes podría ser el tiempo requerido para la distribución del fármaco en la biofase. El modelo de compartimento de efecto considera al compartimento de efecto hipotético como un compartimiento adicional de un modelo PK compartamental, que representa la concentración de fármaco en el sitio de efecto (Pérez-Urizar y cols., 2000). Este modelo PK/PD postula que los procesos dependientes del tiempo de equilibrio entre la concentración plasmática y el sitio efector siguen una cinética de primer orden, caracterizada por una constante de velocidad K_{e0} , que representa la desaparición irreversible del fármaco desde el compartimiento de efecto (Pérez-Urizar y cols., 2000) (Figura 2). Este enfoque se ha aplicado con éxito para predecir la relación PK/PD para los efectos cronotrópico e hipotensor de los β -bloqueantes (Höcht y cols., 2014). El modelo PK/PD de compartimiento de efecto ha sido utilizado previamente por nuestro grupo de trabajo, obteniéndose en dichos estudios una buena correlación entre los efectos cardiovasculares y las concentraciones plasmáticas de carvedilol (Di Verniero y cols., 2010; Bertera y cols., 2009).

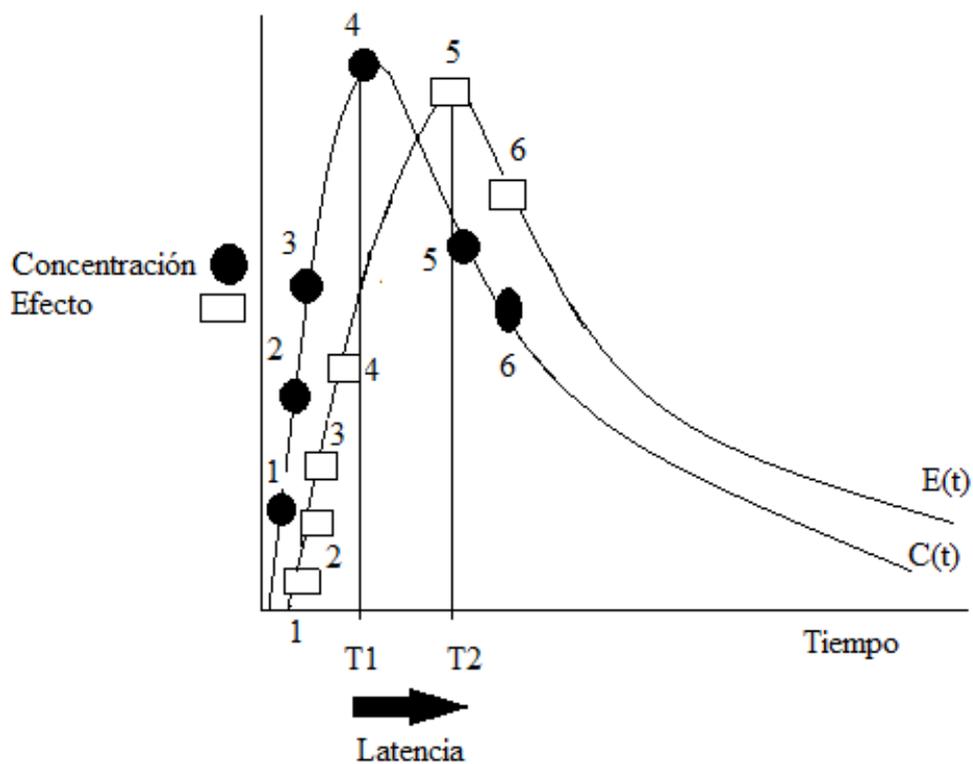


Figura 1: Representación gráfica del tiempo de latencia existente entre los niveles plasmáticos y el efecto.

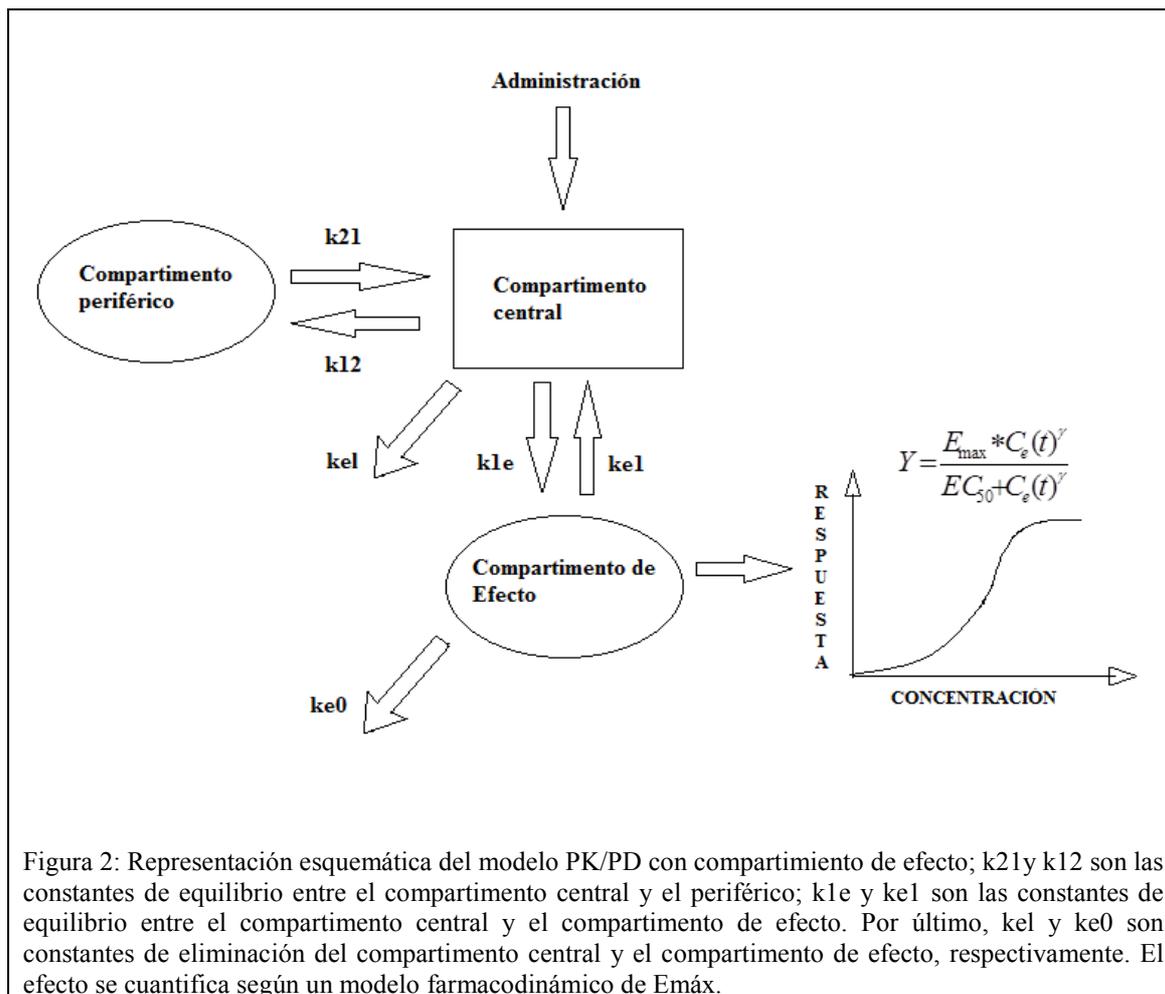


Figura 2: Representación esquemática del modelo PK/PD con compartimiento de efecto; k_{21} y k_{12} son las constantes de equilibrio entre el compartimiento central y el periférico; k_{le} y k_{e1} son las constantes de equilibrio entre el compartimiento central y el compartimiento de efecto. Por último, k_{el} y k_{e0} son constantes de eliminación del compartimiento central y el compartimiento de efecto, respectivamente. El efecto se cuantifica según un modelo farmacodinámico de $E_{m\acute{a}x}$.

La ecuación que describe la relación entre los niveles de carvedilol en el compartimiento de efecto en función de la respuesta es la siguiente:

$$C_e = D * k_{e0} / V_d * [e^{-kt} / (k_{e0} - k) + e^{-k_{e0}t} / (k - k_{e0})],$$

en donde D es la dosis, V_d es el volumen de distribución, k_{e0} es la constante de equilibrio, t es el tiempo y k es la constante de eliminación de primer orden.

Para la estimación de los parámetros PK/PD de los efectos cardiovasculares de carvedilol se realizó una regresión no lineal usando el *software* ADAPT II (D'Argenio DZ, Schumitzky A, 1997) por medio de la ecuación de E_{max} sigmoidea:

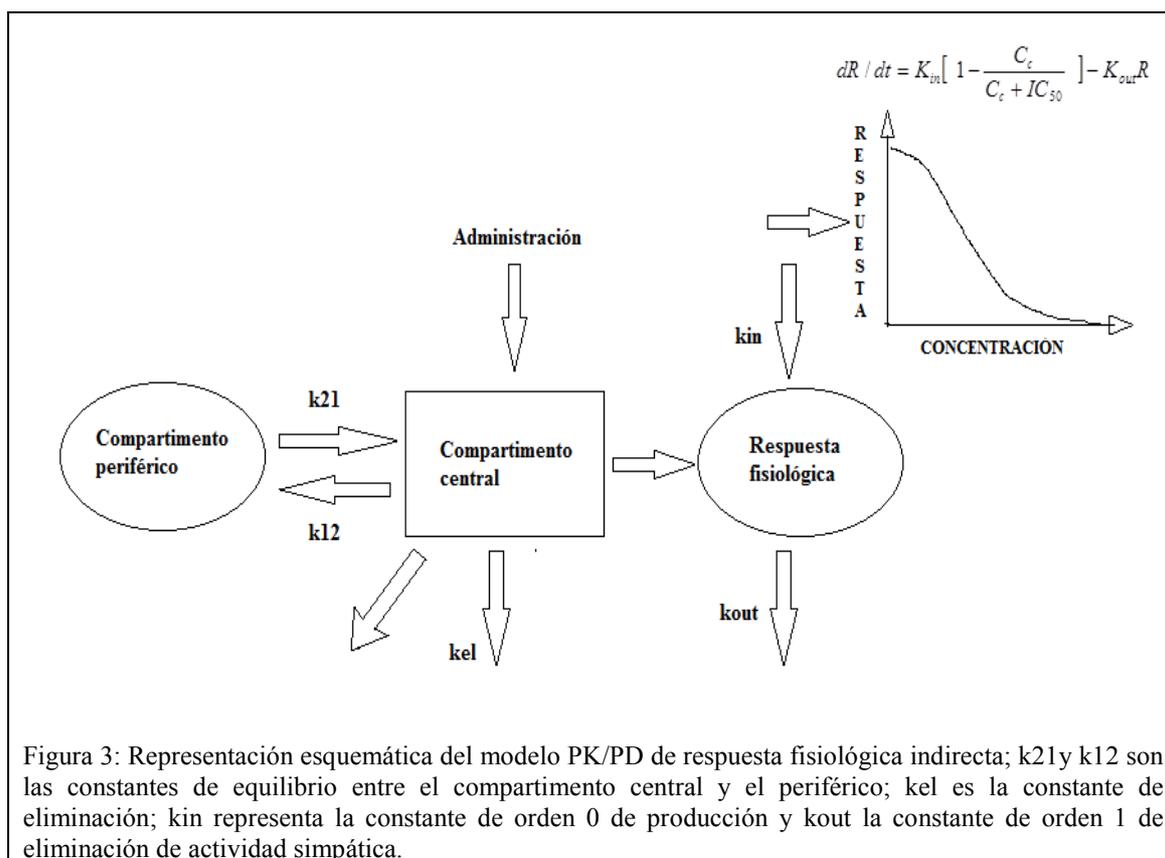
$$Y = \frac{E_{\max} * C_e(t)^\gamma}{EC_{50} + C_e(t)^\gamma}$$

Donde Y es el cambio en la presión arterial o FC como porcentaje del valor basal, E_{\max} es la máxima respuesta, EC_{50} es la concentración en la cual el carvedilol produce la mitad de la respuesta máxima, γ es el coeficiente de Hill y $C_e(t)$ es la concentración de carvedilol (S-carvedilol para el efecto cronotrópico y RS-carvedilol para el efecto hipotensor) en el compartimento de efecto a tiempo (t). Los parámetros PK/PD estimados fueron EC_{50} , E_{\max} , γ y $t_{1/2eq}$. El parámetro $t_{1/2eq}$ corresponde a la mitad de tiempo de equilibrio entre el plasma y el compartimento de efecto y puede ser calculado como $\ln 2/k_{e0}$.

Como la reducción de la actividad simpática vascular del carvedilol se relaciona con el bloqueo de adrenoceptores α_1 , las concentraciones plasmáticas de carvedilol racémico se relacionaron con el cociente BF/AF con el fin de establecer las propiedades PK/PD de la droga en la actividad simpática vascular. Teniendo en cuenta que el tono simpático vascular es un parámetro fisiológico, se utilizó un modelo PK/PD de respuesta fisiológica indirecta para el análisis de los datos (Di Verniero y cols., 2010). De acuerdo con este modelo, se asumió que la actividad simpática vascular se produce a través de una cinética de orden cero (K_{in}) y se elimina con una cinética de primer orden, con una constante de velocidad (K_{out}) (Figura 3). A fines prácticos, se postula que el carvedilol inhibe “la producción” del tono simpático (inhibición de K_{in}) afectando su magnitud. Los efectos de carvedilol sobre la actividad simpática vascular están relacionados con los niveles del fármaco en el compartimento central por medio de la siguiente ecuación:

$$dR / dt = K_{in} \left[1 - \frac{C_c}{C_c + IC_{50}} \right] - K_{out} R$$

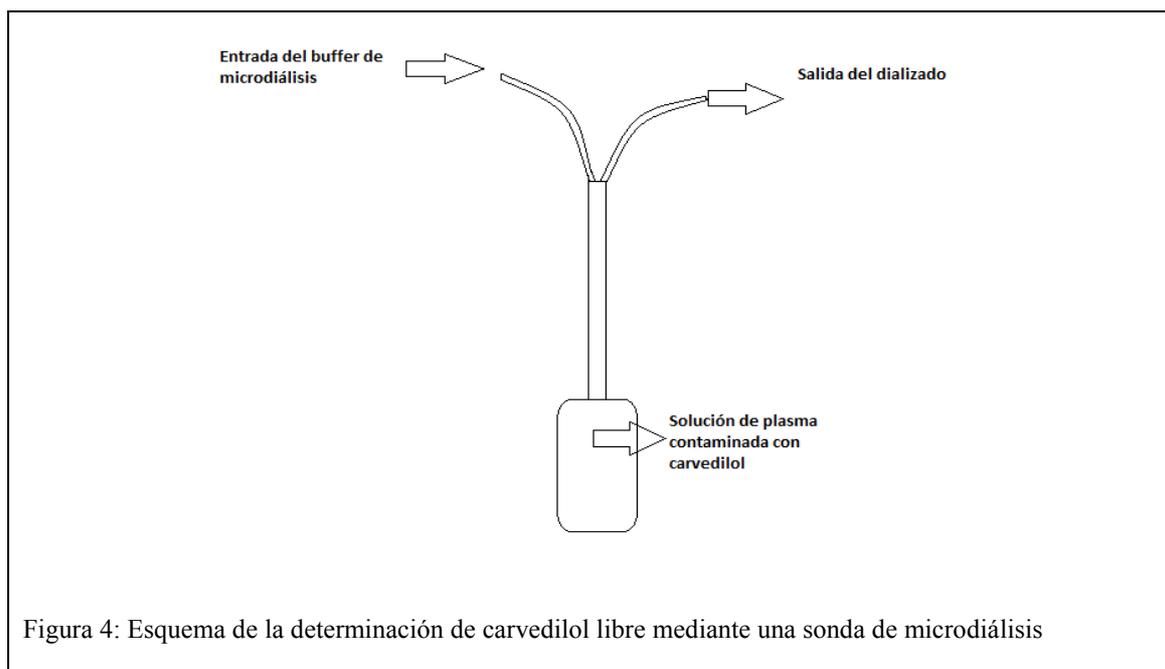
Dónde dR/dt es el cambio en la relación BF/AF, C_c es la concentración de carvedilol racémico en el compartimiento central y CI_{50} es la concentración de fármaco que produce el 50 % de inhibición del tono simpático vascular. K_{out} se fijó en función de K_{in} y la respuesta basal ($K_{out} = K_{in}/R_0$). El análisis PK/PD de los datos se realizó utilizando el *software* ADAPT II.



A diferencia de lo observado con carvedilol, en el caso del nebivolol resultó imposible la realización de un modelado PK/PD, debido a la falta de correlación existente entre los niveles plasmáticos de nebivolol y la respuesta cardiovascular.

Determinación *in vitro* de la unión de carvedilol a proteínas plasmáticas

Se determinó la unión a proteínas plasmáticas *in vitro* de carvedilol a diferentes concentraciones en animales control y en ratas L-NAME mediante la técnica de microdiálisis (Figura 4). La aplicabilidad de microdiálisis para el estudio de unión de los fármacos a proteínas se demostró en varios trabajos previos (Herrera, 1990; Tenero, 2006). Se recogieron muestras de sangre venosa (1 ml) en tubos de microcentrifugación de polipropileno que contenían 5 µl de solución con heparina. Luego se centrifugaron a 10.000 rpm y el plasma sobrenadante (480 µl) se separó cuidadosamente para ser contaminado con 20 µl de solución de Ringer que contenía carvedilol suficiente para alcanzar la concentración final de 2, 5, 10 y 20 µl/ml. A continuación, una sonda de microdiálisis concéntrica se colocó en la solución de plasma y se perfundió a 2 µl/min con solución Ringer. Se obtuvieron cuatro muestras de microdiálisis en intervalos de 15 minutos para cada muestra de plasma para la determinación de la concentración de carvedilol no unido a proteínas plasmáticas. La fracción de recuperación de la sonda de microdiálisis se estimó *in vitro* mediante la colocación de la sonda de microdiálisis en solución de Ringer conteniendo 5 µg/ml de carvedilol.



La fracción de carvedilol no unida (f_u) se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$f_u = \frac{C_d}{R_{in vitro} * C_p} * 100$$

Donde C_d es la concentración de carvedilol en muestras de dializado, $R_{in vitro}$ es la recuperación *in vitro* de la sonda de microdialisis y C_p es la concentración total en plasma. La media estimada de la recuperación *in vitro* de la sonda de microdialisis fue del $13,4 \pm 1,5$ %.

Se estimaron además los parámetros de unión a proteínas plasmáticas de carvedilol, B_{max} y K_D , ajustando las concentraciones de carvedilol unido como una función de la concentración libre de fármaco, utilizando el software GraphPad Prism versión 5.02 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California, CA) como sigue:

$$C_b = \frac{B_{max} * C_u}{K_D + C_u}$$

Donde C_b es la concentración de carvedilol unido a proteínas, C_u es la concentración carvedilol libre, B_{max} es la unión máxima a proteínas y K_D la constante de disociación.

Análisis estadístico de los datos

La distribución normal de las variables de estudio se comprobó mediante la prueba de Kolmogorov/Smirnov. Los datos se expresaron como media \pm error estándar de la media (EEM). Los valores basales de PAM, FC, DE y la relación BF/AF se compararon mediante la prueba t de Student. El análisis estadístico de los efectos de atenolol, carvedilol y nebivolol sobre PAM, FC, DE y la relación BF/AF se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías y el test de Bonferroni como prueba post-hoc. Los parámetros farmacocinéticos y PK/PD se transformaron logarítmicamente para reducir la heterogeneidad de la varianza. Las pruebas estadísticas se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.02 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California, CA). La significación estadística se definió como $p < 0,05$.

RESULTADOS

Animales L-NAME

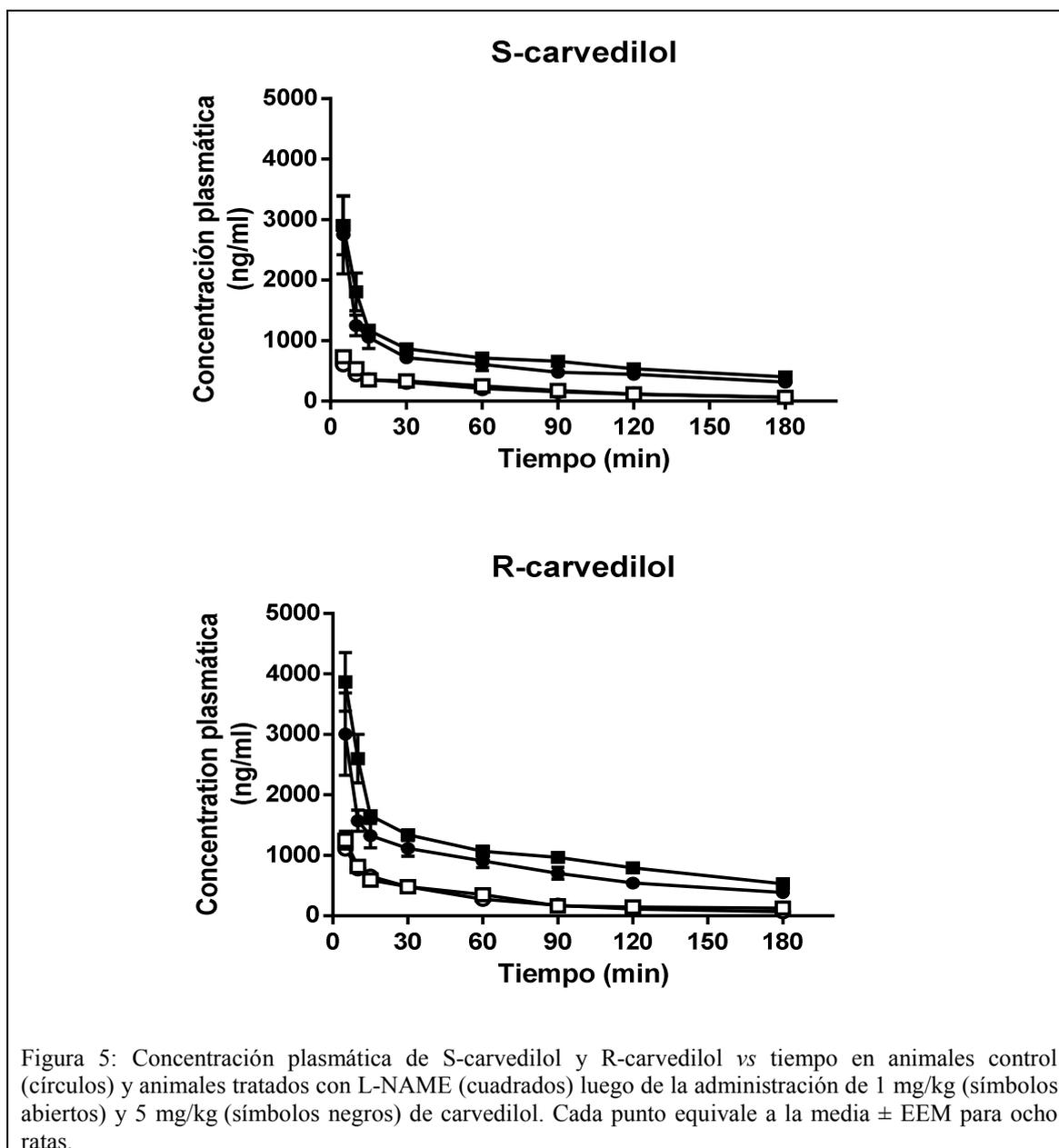
Los animales hipertensos por administración de L-NAME presentaron alteraciones en parámetros cardiovasculares en comparación con sus respectivos controles. La PAM basal fue significativamente mayor en las ratas L-NAME (134 ± 5 mmHg; $n=32$; $p < 0,05$) con respecto a los animales control (104 ± 3 mmHg; $n=32$), aunque no se encontraron diferencias en la FC basal al comparar ambos grupos (control: 367 ± 11 latidos por minuto (lpm); $n=32$; L-NAME: 357 ± 9 lpm; $n=32$).

En cuanto a la VPA de corto plazo, los animales tratados con L-NAME exhibieron un incremento del DE del registro de presión arterial en relación con los animales normotensos ($5,27 \pm 0,26$ mmHg vs $3,97 \pm 0,26$ mmHg; $n=32$; $p < 0,05$). De la misma manera, al analizar la VPA latido-a-latido, se observó un incremento de la variabilidad en los dominios de BF y MBF comparando los animales hipertensos (BF: $15,3 \pm 1,1$ mmHg²; MBF: $22,5 \pm 1,4$ mmHg²; $n=32$; $p < 0,05$ vs control) con los controles (BF: $8,9 \pm 0,7$ mmHg²; MBF: $11,7 \pm 1,0$ mmHg²; $n=32$). En cambio, la variabilidad de AF no fue significativamente mayor entre ratas L-NAME ($3,2 \pm 0,5$ mmHg²; $n=32$) respecto del grupo control ($2,5 \pm 0,4$ mmHg²; $n=32$). Para la relación BF/AF el incremento a favor de los animales L-NAME también resultó significativo (L-NAME: $4,92 \pm 0,28$; Control: $3,79 \pm 0,21$; $n=32$; $p < 0,05$).

Farmacocinética del carvedilol

La figura 5 muestra el curso temporal de las concentraciones plasmáticas de S-carvedilol y R-carvedilol en ratas controles y animales hipertensos por L-NAME. En todos los casos se encontró una disminución biexponencial de los niveles plasmáticos

de carvedilol compatibles con un modelo bicompartimental (Figura 5). La comparación del parámetro AIC entre diferentes modelos farmacocinéticos estableció que los datos experimentales ajustan mejor a un modelo de dos compartimientos.



Los parámetros farmacocinéticos obtenidos se muestran en la Tabla 4. No se encontraron diferencias significativas en la constante de la distribución (α) al comparar los grupos control e hipertenso. Las constantes de eliminación (β) de S- y R-carvedilol

mostraron una reducción dependiente de la dosis en ambos grupos experimentales. Sin embargo, el estado hipertensivo inducido por L-NAME no afectó el valor de dicha constante. Se encontró un aumento dosis dependiente del Vd_{ss} de ambos enantiómeros en los dos grupos experimentales, sin hallarse diferencias entre los grupos (Tabla 4). Además, el Cl del S-carvedilol aumentó con el incremento de la dosis en ambos grupos, aunque el mismo fue significativamente menor en las ratas L-NAME que en las control solamente después de la administración de la dosis de 5 mg/kg del fármaco (Tabla 4). A causa de la dependencia del Vd_{ss} y el Cl con la dosis administrada, tanto la concentración plasmática máxima (C_{max}) como el AUC aumentan en menor proporción a lo esperado en ambos grupos experimentales (Tabla 4). Después de la administración de la dosis de 5 mg/kg, el AUC de los niveles de ambos enantiómeros de carvedilol fue significativamente mayor en ratas L-NAME en comparación con los animales control (Tabla 4). Al comparar los parámetros farmacocinéticos de S- y R-carvedilol, el Vd_{ss} y el Cl del enantiómero S resultaron mayores al R-carvedilol en animales hipertensos y normotensos (Tabla 4).

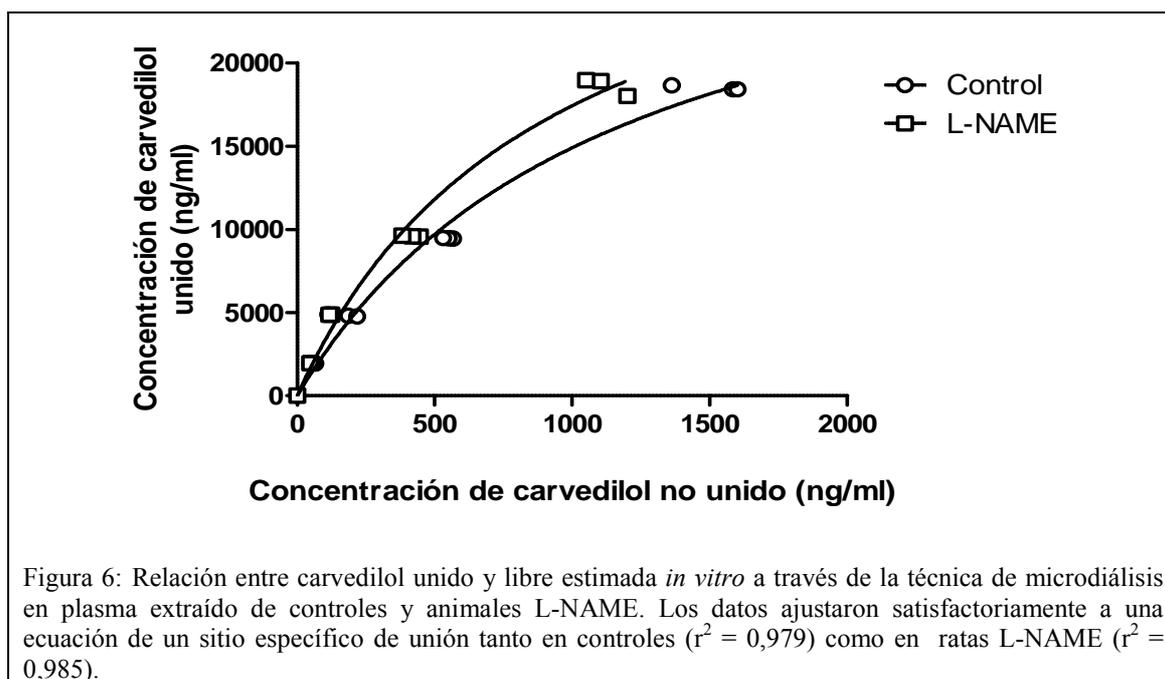
Tabla 4: Parámetros farmacocinéticos de S-carvedilol y el R-carvedilol: AUC (area bajo la curva), α (constante de distribución), β (constante de eliminación), Cl (aclaramiento) y Vdss (volumen de distribución en el estado estacionario), Cmax (máxima concentración extrapolada) en animales control y L-NAME, luego de la administración intravenosa de carvedilol en dosis de 1 mg/kg y 5 mg/kg.

Enantiomero	S-carvedilol				R-carvedilol				
	Grupo	Control (n=16)		L-NAME (n=16)		Control (n=16)		L-NAME (n=16)	
Dosis		1 mg/kg	5 mg/kg	1 mg/kg	5 mg/kg	1 mg/kg	5 mg/kg	1 mg/kg	5 mg/kg
α (h ⁻¹)		10.1±0.5	9,7±0,8	9,2±0,6	9,9±0,7	11,0±0,5	10,7±0,6	10,3±0,8	11,1±0,4
β (h ⁻¹)		0,74±0,05	0,57±0,07 [#]	0,70±0,03	0,52±0,10 [#]	1,00±0,04	0,44±0,06 [#]	0,86±0,03	0,49±0,10 [#]
Vd _{ss} (l)		1,16±0,12 [§]	2,25±0,27 ^{§#}	0,98±0,13	1,69±0,18 ^{§#}	0,53±0,13	1,47±0,18 [#]	0,61±0,09	1,23±0,12 [#]
Cl (ml/min)		14,4±1,1 [§]	23,0±0,9 ^{§#}	11,4±0,4	13,9±1,5 ^{§*}	9,9±0,5	13,4±1,8	8,6±0,3	9,6±1,2
Cmax (ng/ml)		1,01±0,27	4,08±0,96	1,47±0,15	5,86±0,86	2,10±0,15	5,77±1,25	2,60±0,21	7,67±0,94
r ²		0,990	0,991	0,992	0,990	0,998	0,996	0,995	0,991
AUC _{0-∞} (ng.ml/h)		670±50	1.829±70	766±31	3.309±355*	886±41	3.300±454	999±27	4.859±593*
AIC		57,4 (47,0-76,6)	76,5 (59,3-93,3)	47,8 (30,8-66,9)	52,8 (11,4-98,6)	65,1 (39,5-78,4)	65,1 (24,8-92,3)	53,0 (19,6-82,7)	63,0 (6,8-125,0)

Datos expresados como ±EEM.

[#]p<0.05 vs 1 mg/kg; ^{*}p<0.05 vs animales control; [§]p<0.05 vs R-carvedilol

Con el objeto de explicar el perfil farmacocinético no lineal del carvedilol, se estudió la unión a proteínas plasmáticas *in vitro* en ambos grupos experimentales. Como se muestra en la figura 6, existe una relación no lineal entre los niveles de carvedilol libre y unido, que demuestra la saturación de la unión a proteínas plasmáticas del fármaco. Dichas propiedades del carvedilol no fueron significativamente diferentes al comparar los animales controles (B_{max} : 32.068 ng/ml, Intervalo de confianza (IC) del 95%: 24.817-39.319 ng/ml; K_D : 1.153 ng/ml; IC 95%: 660-1.646 ng/ml) y las ratas L -NAME (B_{max} : 33.267 ng/ml; IC 95 %: 25.937-40.596 ng/ml; K_D : 909 ng/ml, IC 95%: 536-1.283 ng/ml).



Farmacodinamia del carvedilol

Efecto hipotensor

La figura 7 muestra el curso temporal de los cambios de PAM en animales control y ratas tratadas con L-NAME después de la administración intravenosa de vehículo o de

carvedilol en una dosis de 1 mg/kg o 5 mg/kg. La administración de vehículo no modificó los valores de presión arterial (Figura 7). La respuesta hipotensora del carvedilol fue significativamente mayor en animales tratados con L-NAME (1 mg/kg: $32,3 \pm 4,2\%$; n=8; 5 mg/kg: $43,1 \pm 4,4\%$; n=8; $p < 0,05$) con respecto a las ratas de control (1 mg/kg: $22,4 \pm 2,8\%$; n=8; 5 mg/kg: $27,2 \pm 3,2\%$; n=8) (Figura 7).

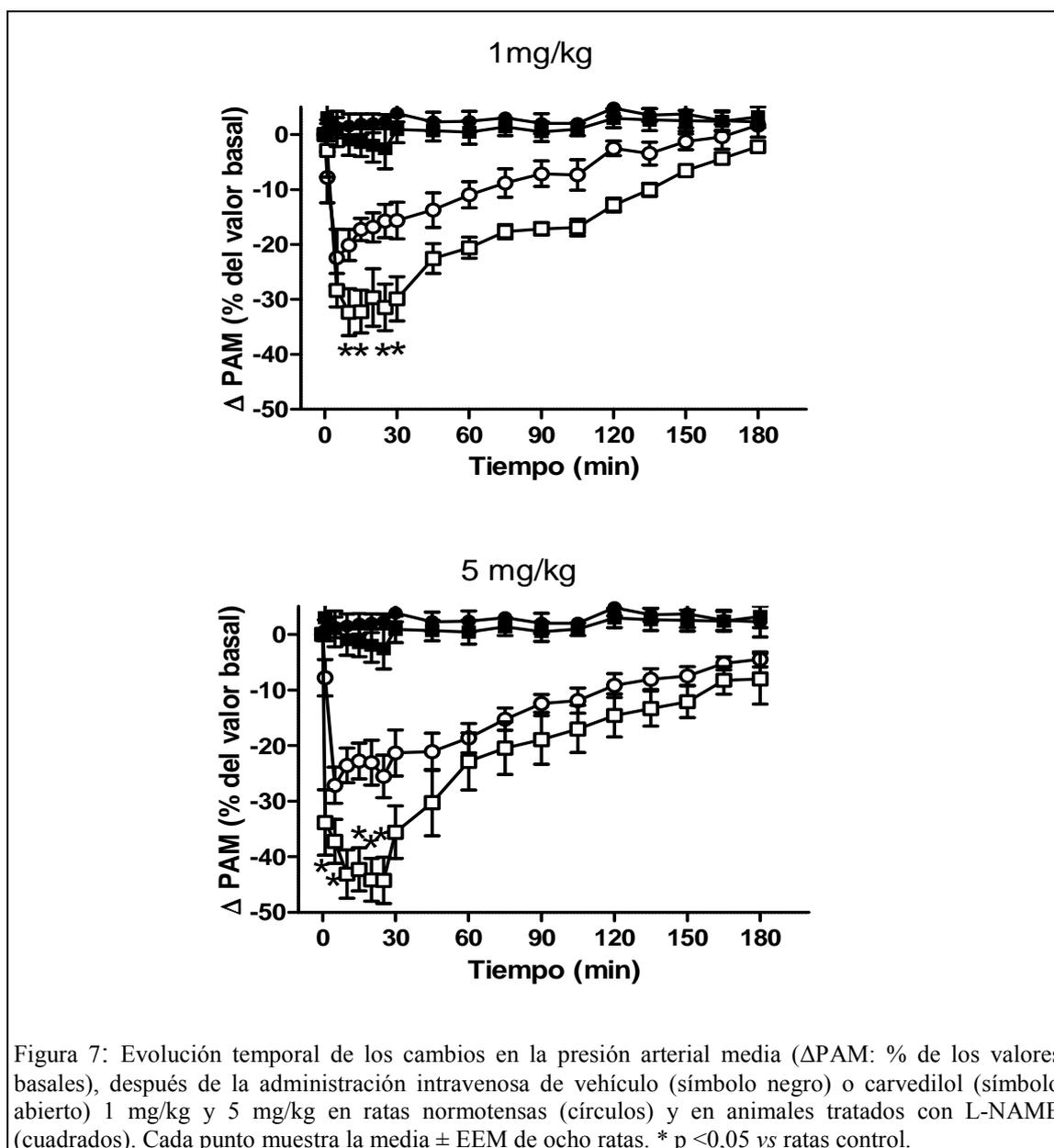


Figura 7: Evolución temporal de los cambios en la presión arterial media (Δ PAM: % de los valores basales), después de la administración intravenosa de vehículo (símbolo negro) o carvedilol (símbolo abierto) 1 mg/kg y 5 mg/kg en ratas normotensas (círculos) y en animales tratados con L-NAME (cuadrados). Cada punto muestra la media \pm EEM de ocho ratas. * $p < 0,05$ vs ratas control.

El efecto hipotensor se correlacionó con las concentraciones de carvedilol racémico a través de un modelo PK/PD de compartimiento de efecto utilizando el modelo farmacodinámico E_{max} sigmoideo. No se encontraron diferencias en la estimación del E_{max} al comparar ambos niveles de dosis en animales normotensos e hipertensos L-NAME (Tabla 5), lo que sugiere que se alcanzó el rango farmacodinámico completo del efecto hipotensor de carvedilol bajo las condiciones experimentales y la ecuación E_{max} sigmoideo es adecuada para la estimación de parámetros PK/PD. La velocidad de transferencia de carvedilol desde el compartimiento central hacia el compartimiento de efecto tampoco fue diferente entre ambos grupos experimentales (Tabla 5). La respuesta hipotensora máxima fue significativamente mayor en ratas tratadas con L-NAME en comparación con animales normotensos. Además, el carvedilol mostró una mayor potencia en ratas L-NAME respecto del grupo control, teniendo en cuenta que la CE_{50} fue significativamente menor en los animales L-NAME tras la administración de las dosis de 1 y 5 mg/kg (Tabla 5).

Tabla 5: Parámetros PK-PD para el efecto antihipertensivo de carvedilol en animales L-NAME y animales control después de la administración intravenosa. CE_{50} : concentración que corresponde a la mitad de la respuesta máxima, E_{max} : respuesta máxima, γ : coeficiente de Hill, $t_{1/2eq}$: vida media de equilibrio entre el plasma y el compartimiento de efecto.

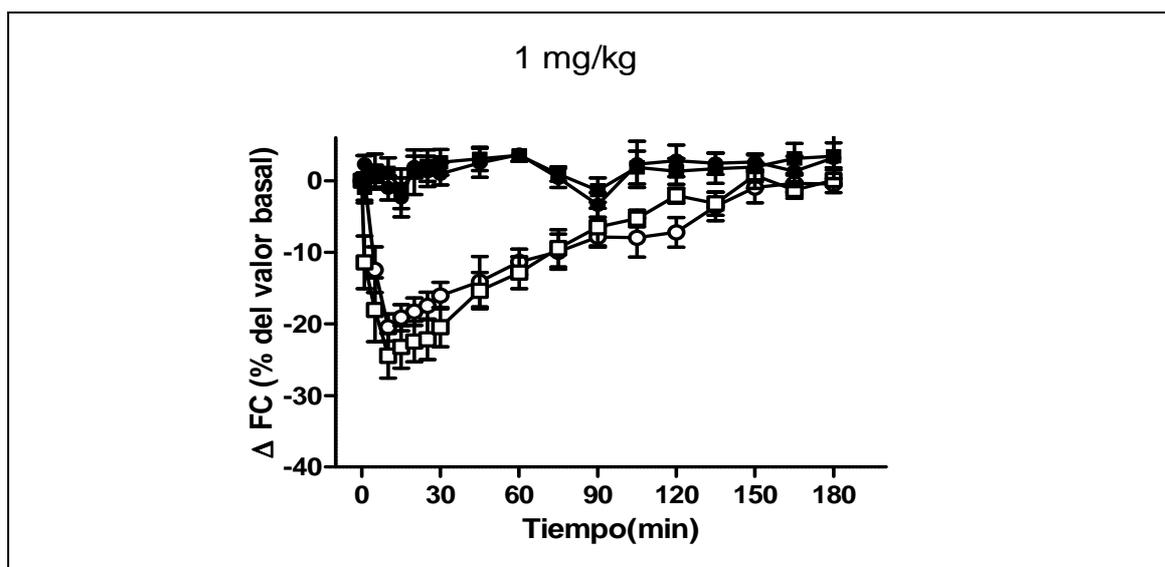
Grupo	Control (n=16)		L-NAME (n=16)	
	1 mg/kg	5 mg/kg ⁻¹	1 mg/kg	5 mg/kg ⁻¹
E_{max} (%)	23,2±2,9	28,5±3,2	40,1±3,2*	48,3±4,2*
CE_{50} (ng.ml ⁻¹)	980±140	1.410±220	430±90*	760±161*
γ	2,1±0,4	2,2±0,5	1,9±0,4	2,0±0,3
$t_{1/2eq}$ (min)	4,2±0,8	7,8±2,4	8,7±1,9	7,6±1,1
r^2	0,936	0,941	0,905	0,935
AIC	70,7 (30,8-78,3)	79,7 (46,7-122)	76,4 (32,0-124,3)	81,6 (41,9-121,5)

Datos expresados como media ± EEM.

*p<0.05 vs control

Efecto bradicardizante

La figura 8 muestra el curso temporal de los cambios de FC en animales control y ratas tratadas con L-NAME después de la administración intravenosa de vehículo o de carvedilol en las dosis de 1 mg/kg o 5 mg/kg. La administración del vehículo no modificó la FC en ambos grupos experimentales (Figura 8). La respuesta cronotrópica del carvedilol no fue significativamente diferente entre animales L-NAME (1 mg/kg: $-24,5 \pm 3,1\%$; n=8; 5 mg/kg: $-32,3 \pm 4,1\%$; n=8) y ratas control (1 mg/kg: $-20,5 \pm 1,9\%$; n=8; 5 mg/kg: $-23,4 \pm 2,2\%$; n=8) después de la administración de ambas dosis.



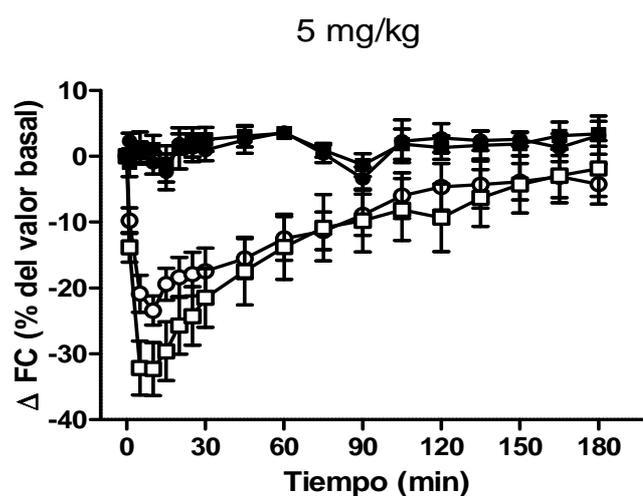


Figura 8: Evolución temporal de los cambios en la frecuencia cardíaca (ΔFC , % de los valores basales), después de la administración intravenosa de vehículo (símbolo negro) o carvedilol (símbolo abierto) en dosis de 1 mg/kg y 5 mg/kg en ratas normotensas (círculos) y en los animales tratados con L-NAME (cuadrados). Cada punto muestra la media \pm EEM de ocho ratas.

El efecto cronotrópico se correlacionó con las concentraciones de S-carvedilol a través de un modelo PK/PD de compartimiento de efecto con un modelo de E_{max} sigmoideo. No se encontraron diferencias en la estimación de E_{max} al comparar ambos niveles de dosis en ratas normotensas e hipertensas (Tabla 6), lo que sugiere que se alcanzó el rango farmacodinámico completo del efecto cronotrópico de carvedilol bajo condiciones experimentales y la ecuación E_{max} sigmoideo es adecuada para la estimación de parámetros PK/PD. La velocidad de transferencia de carvedilol desde el nivel central al compartimiento efecto tampoco fue diferente comparando los dos grupos experimentales (Tabla 6). La respuesta máxima cronotrópica fue similar en ratas tratadas con L-NAME al compararlas con los animales control. Por otra parte, S-carvedilol mostró una potencia equivalente en ambos grupos. Por último, se encontró un incremento dependiente de la dosis en la estimación de CE_{50} para la respuesta cronotrópica a S-carvedilol en ambos grupos experimentales (Tabla 6).

Tabla 6: Parámetros PK/PD para el efecto cronotrópico de S-carvedilol en animales tratados con L-NAME y animales control después de la administración intravenosa. CE_{50} : Concentración que corresponde a la mitad de la respuesta máxima, E_{max} : respuesta máxima, γ : coeficiente de Hill, $t_{1/2eq}$: vida media de equilibrio entre el plasma y el compartimiento de efecto.

Grupo	Control (n=16)		L-NAME (n=16)	
	1 mg/kg	5 mg/kg	1 mg/kg	5 mg/kg
E_{max} (%)	25,2±5,2	25,3±2,4	28,2±4,0	33,7±4,3
CE_{50} (ng/ml)	240±30	540±12 [#]	230±41	630±52 [#]
γ	2,4±0,3	1,9±0,5	2,0±0,3	1,8±0,3
$t_{1/2eq}$ (min)	6,6±1,2	8,1±2,5	6,9±1,8	5,2±1,6
r^2	0,900	0,917	0,932	0,915
AIC	42,1 (32,5-50,2)	42,9 (31,9-75,5)	38,5 (24,0-63,7)	58,5 (37,4-80,1)

Datos expresados como media \pm EEM.

[#]p<0.05 vs. Carvedilol 1 mg/kg

Efecto sobre la variabilidad de la presión arterial de corto plazo

La administración de carvedilol redujo la VPA de corto plazo tanto en animales normotensos como en animales hipertensos, tal como se evidencia en la reducción sostenida del DE de la presión arterial (figura 9). No se encontraron diferencias en la magnitud de la atenuación DE comparando ambos grupos.

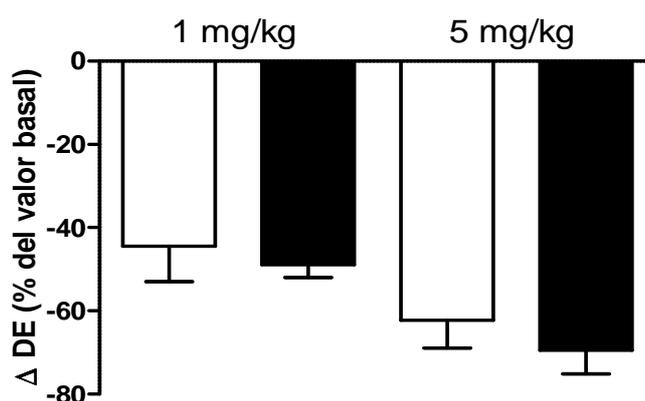
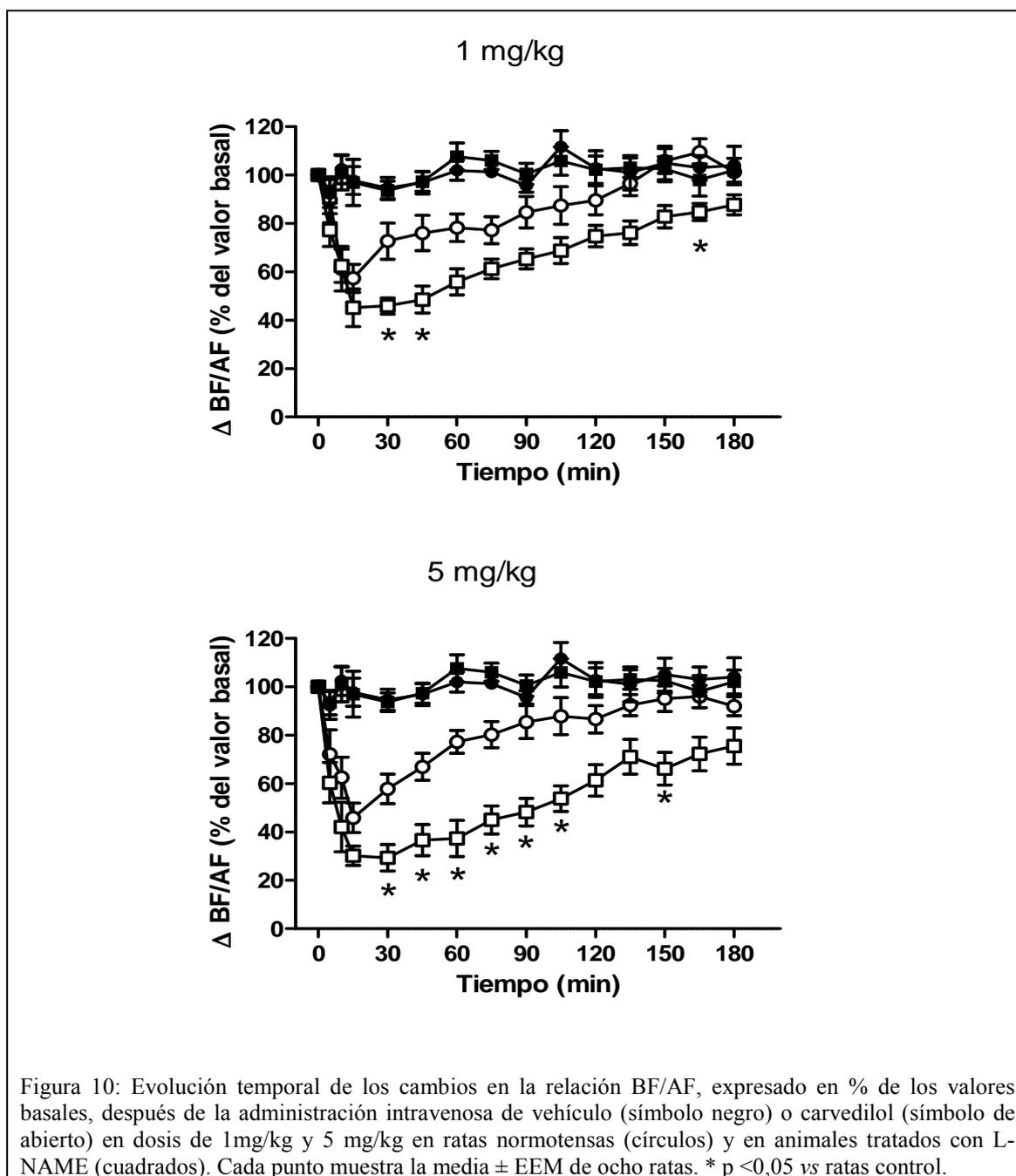


Figura 9: Cambio en la variabilidad de la presión arterial de corto plazo, expresado como % de reducción del DE respecto del basal después de la administración de carvedilol 1 o 5 mg/kg en ratas controles (barras vacías) y animales L-NAME (barras negras). Cada barra muestra la media \pm EEM de ocho ratas.

Efecto sobre la variabilidad de la presión arterial latido-a-latido

El análisis del efecto del carvedilol sobre la VPA latido-a-latido estableció que la administración intravenosa del β -bloqueante de tercera generación reduce la variabilidad en los diferentes dominios de frecuencia tanto en animales normotensos como en ratas L-NAME. La variabilidad de MBF se redujo en ambos grupos experimentales después de la administración de 1 mg/kg de carvedilol (ratas control: Δ variabilidad MBF: $-13,0 \pm 5,6$ mmHg²; n=8; L-NAME: Δ variabilidad MBF: $-28,0 \pm 7,3$ mmHg²; n=8) y 5 mg/kg (ratas control: Δ variabilidad MBF: $-8,0 \pm 3,5$ mmHg²; n=8; ratas L-NAME: Δ variabilidad MBF: $-21,5 \pm 6,5$ mmHg²; n=8). El carvedilol también redujo en gran medida la variabilidad de BF en ratas controles y tratadas con L-NAME, pero la disminución fue significativamente mayor en el grupo hipertenso con respecto a los animales normotensos, después de la administración de 1 mg/kg (ratas control: Δ variabilidad BF: $-3,1 \pm 1,8$ mmHg²; n=8; ratas L-NAME: Δ variabilidad BF: $-8,4 \pm 1,9$ mmHg²; n=8, $p < 0,05$ vs control) y 5 mg/kg (controles: Δ variabilidad BF: $-4,7 \pm 1,2$ mmHg²; n=8; ratas L-NAME: Δ variabilidad BF: $-9,3 \pm 1,7$ mmHg²; n=8; $p < 0,05$ vs

control) de carvedilol. Por el contrario, la administración de carvedilol no modificó la variabilidad de AF en ratas control (1mg/kg: Δ variabilidad AF: $-0,6 \pm 0,4$ mmHg²; n=8; 5mg/kg: Δ variabilidad AF: $-0,9 \pm 0,6$ mmHg²; n=8) ni en los animales tratados con L-NAME (1mg/kg: Δ variabilidad AF: $0,3 \pm 0,4$ mmHg²; n=8; 5mg/kg: Δ variabilidad AF: $-0,7 \pm 0,5$ mmHg²; n=8). En consecuencia, el carvedilol reduce la razón BF/AF en ambos grupos experimentales, aunque la disminución de este parámetro de actividad simpática vascular fue superior en ratas L-NAME respecto de animales normotensos (Figura 10).



Se correlacionó el efecto sobre la actividad simpática vascular con las concentraciones de carvedilol racémico a través de un modelo PK/PD de inhibición de respuesta fisiológica indirecta. No se encontraron diferencias en la estimación de K_{in} comparando animales controles y ratas tratadas con L-NAME (Tabla 7). Por el contrario, la CI_{50} para la reducción del cociente BF/AF fue significativamente menor en los animales tratados

con L-NAME con respecto al grupo control después de la administración de carvedilol en ambas dosis. La estimación de los parámetros PK/PD para el efecto de carvedilol en el tono vascular simpático no cambió con el incremento de la dosis en ambos grupos experimentales (Tabla 7).

Tabla 7: Parámetros PK/PD para la actividad simpática vascular de carvedilol en animales tratados con L-NAME y animales control después de la administración intravenosa. CI_{50} : Concentración que corresponde a la mitad de la respuesta inhibitoria máxima, K_{in} : constante de producción de la respuesta.

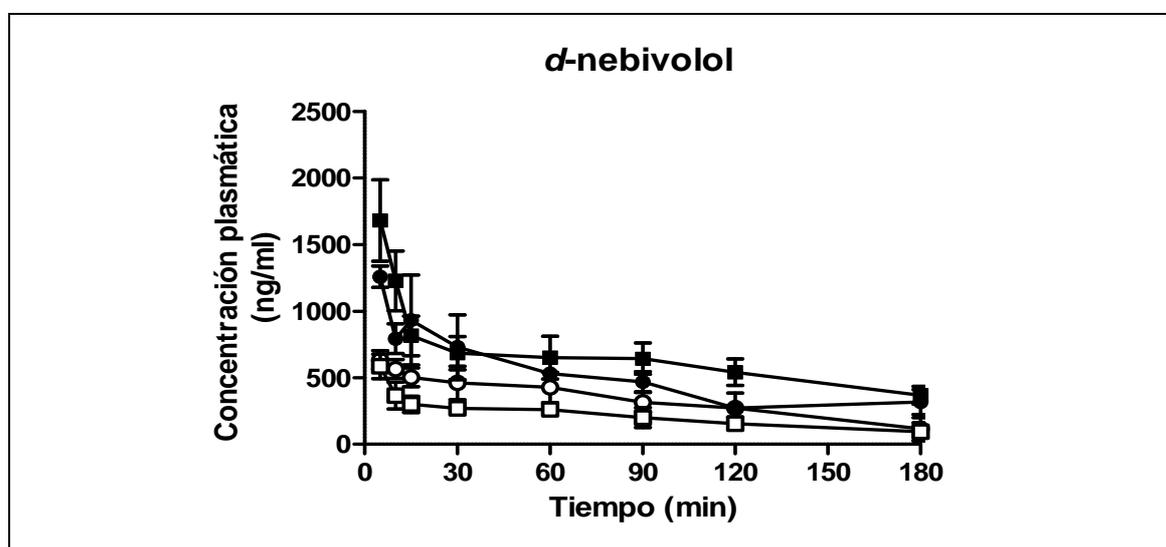
Grupo	Controles (n=16)		L-NAME (n=16)	
	1 mg/kg	5 mg/kg	1 mg/kg	5 mg/kg
K_{in} (min^{-1})	18,4±1,5	16,6±1,7	12,6±2,1	16,6±3,1
CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	1,81±0,27	2,53±0,38	0,76±0,13*	1,18±0,20*
r^2	0,912	0,905	0,902	0,907
AIC	48,2 (27,7-85,5)	67,1 (55,2-80,9)	56,8 (34,9-75,5)	65,7 (25,5-94,9)

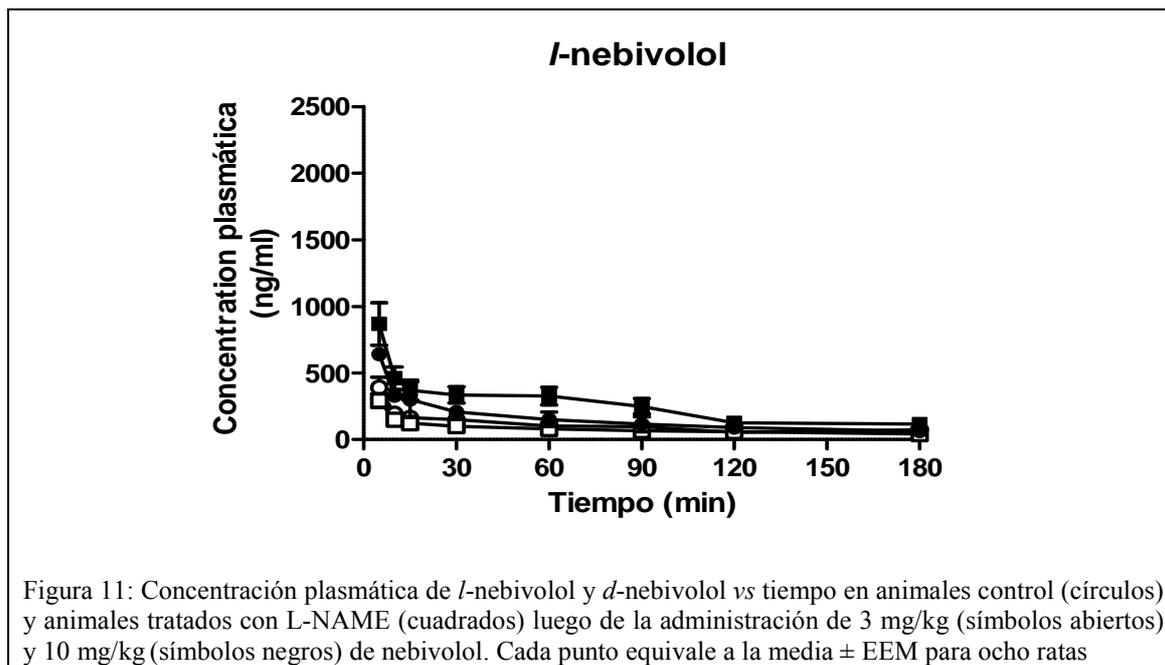
Datos expresados como media \pm EEM.

* $p < 0.05$ vs control

Farmacocinética del nebivolol

La figura 11 muestra el curso temporal de las concentraciones plasmáticas de *l*-nebivolol y *d*-nebivolol en animales normotensos e hipertensos tratados con L-NAME. Se observó una caída biexponencial de los niveles plasmáticos de nebivolol compatibles con un modelo de dos compartimentos farmacocinéticos después de la administración intravenosa del fármaco en las dosis de 3mg/kg y 10mg/kg (Figura 11). La comparación del parámetro AIC entre diferentes modelos farmacocinéticos estableció que los datos experimentales ajustan mejor a un modelo de dos compartimentos. Los niveles plasmáticos del enantiómero *l* fueron significativamente más bajos en comparación con los del enantiómero *d* en ambos grupos experimentales, demostrando la existencia de un comportamiento farmacocinético enantioselectivo, situación similar a la ocurrida con el carvedilol (Figura 11).





La comparación de los parámetros farmacocinéticos obtenidos, mostró mayor $V_{d_{ss}}$ y Cl de *l*-nebivolol con respecto a *d*- nebivolol en ambos grupos de trabajo (Tabla 8). En consecuencia, el AUC y la C_{max} del *l*-nebivolol fueron significativamente más bajos en comparación con los valores hallados para el enantiómero *d*. El estado hipertensivo inducido por la administración de L-NAME no afectó la farmacocinética enantioselectiva de nebivolol, considerando que no se encontraron diferencias significativas al comparar los principales parámetros farmacocinéticos de *d* y *l*-nebivolol en ambos grupos experimentales (Tabla 8). Ambos enantiómeros mostraron una farmacocinética lineal; tanto la C_{max} y AUC aumentaron de una manera proporcional a la dosis en ambos grupos experimentales (Tabla 8).

Tabla 8: Parámetros farmacocinéticos del *d*-nebivolol y *l*-nebivolol en animales control y L-NAME después de la administración intravenosa de nebivolol. AUC (area bajo la curva), α (constante de distribución), β (constante de eliminación), Cl (aclaramiento), $V_{d_{ss}}$ (volumen de distribución en el estado estacionario), C_{max} (concentración máxima extrapolada)

Enantiómero	<i>d</i> -nebivolol				<i>l</i> -nebivolol				
	Grupo	Control (n=16)		L-NAME (n=16)		Control (n=16)		L-NAME (n=16)	
Dosis		3 mg/kg	10 mg/kg	3 mg/kg	10 mg/kg	3 mg/kg	10 mg/kg	3 mg/kg	10 mg/kg
α (h ⁻¹)		8,1±2,7	11,6±0,1	12,8±0,8	8,9±1,8	14,9±0,1	12,0±1,7	11,4±1,8	10,8±1,7
β (h ⁻¹)		0,36±0,11	0,35±0,07	0,35±0,04	0,33±0,08	0,43±0,06	0,66±0,08 [§]	0,49±0,11	0,47±0,14
$V_{d_{ss}}$ (l)		3,8±0,3	5,4±1,8	4,2±1,0	5,5±1,0	8,3±0,8	13,9±2,0 [§]	9,7±2,1	12,7±2,3 [§]
Cl (ml/min)		23,4±6,2	32,2±3,5	22,3±5,7	28,3±2,6	62,9±5,6 [§]	82±11,8 [§]	71,8±18,1 [§]	74,4±15,2 [§]
C_{max} (ng/ml)		1.522±534	2.620±154 [#]	1.350±238	2.792±306 [#]	418±41	1.239±391 ^{#§}	594±280	1.356±258 ^{#§}
AUC _{0-∞} (ng.ml/h)		808±70	2.120±365 [#]	1.044±257	2.593±364 [#]	596±134	1.244±270 ^{#§}	552±162	1.409±197 ^{#§}
r ²		0,993	0,991	0,998	0,994	0,998	0,996	0,997	0,992
AIC		59,9 (46,6-84,7)	81,8 (63,1-103,5)	53,8 (28,9-71,3)	89,9 (76,8-109)	46,8 (33,2-66,0)	64,7 (51,0-76,8)	44,8 (32,6-54,5)	68,5 (31,6-98,2)

Datos expresados como media ± EEM.

[#]p<0.05 vs 3 mg/kg; [§]p<0.05 vs *d*-nebivolol

Farmacodinamia del nebivolol

Efecto hipotensor

La respuesta hipotensora luego de la administración de nebivolol -3 o 10 mg/kg- se representa en la figura 8. No se encontraron cambios en la PAM en ambos grupos experimentales después de la administración del vehículo. El efecto antihipertensivo de nebivolol mostró un patrón bifásico en ambos grupos experimentales (Figura 12). Después de la administración de nebivolol en dosis de 3 mg/kg y 10 mg/kg, la reducción temprana de valores de PAM fue significativamente mayor en el grupo L-NAME (3 mg/kg: $16,3 \pm 2,2\%$; n=8; 10 mg/kg: $20,3 \pm 4,4\%$; n=8; $p < 0,05$) en comparación con las ratas control (1mg/kg: $3,7 \pm 2,0\%$; n=8; 5 mg/kg: $14,3 \pm 3,2\%$; n=8) (Figura 12). Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas en la magnitud de la reducción de la PAM en la fase tardía al comparar a los dos grupos experimentales (Figura 12).

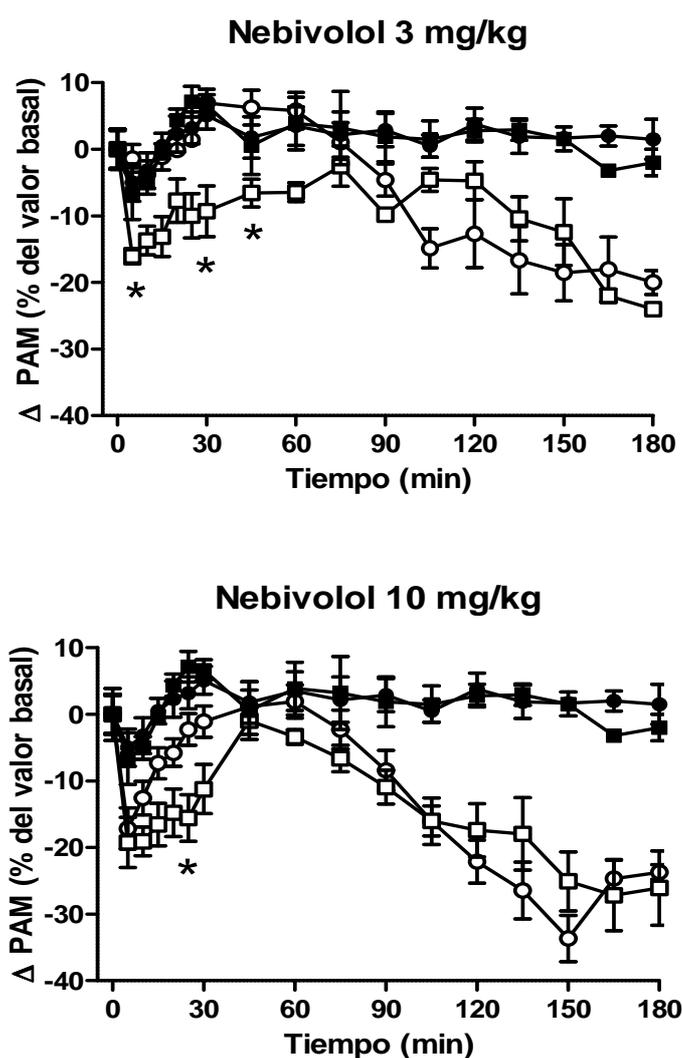
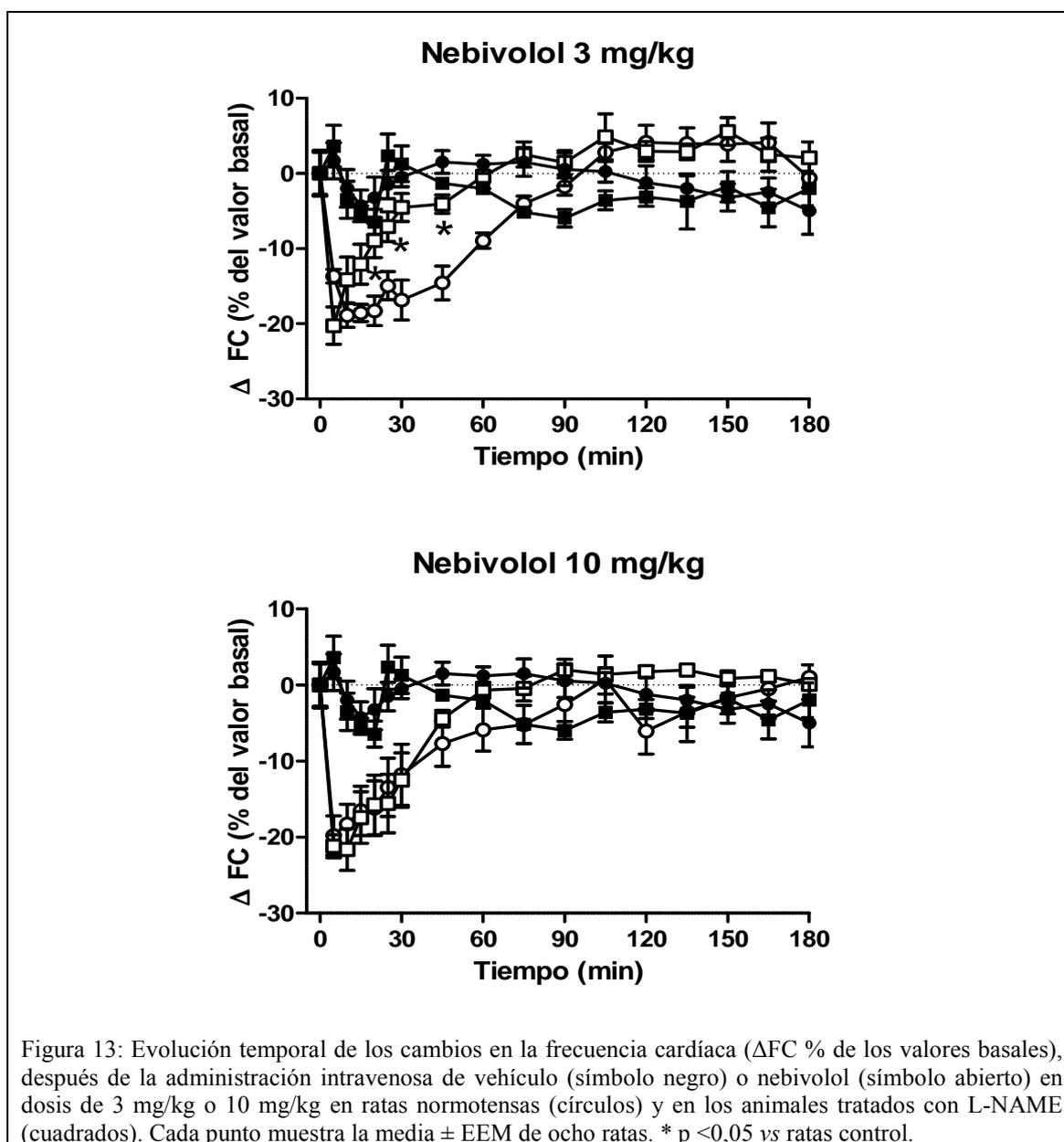


Figura 12: Evolución temporal de los cambios en la presión arterial media (Δ PAM % de los valores basales), después de la administración intravenosa de vehículo (símbolo negro) o nebivolol (símbolo abierto) 3 mg/kg o 10 mg/kg en ratas normotensas (círculos) y en animales tratados con L-NAME (cuadrados). Cada punto muestra la media \pm EEM de ocho ratas. * $p < 0,05$ vs a ratas control.

Efecto bradycardizante

La figura 13 muestra el curso temporal de los cambios de FC en animales L-NAME y controles después de la administración intravenosa del vehículo o de nebivolol en una dosis de 3 mg/kg o 10 mg/kg. Mientras que la administración del vehículo no modificó la FC en ninguno de los grupos experimentales, el nebivolol indujo una respuesta bradycardizante con ambas dosis estudiadas en animales hipertensos y normotensos. Aunque la respuesta cronotrópica máxima no difirió en ambos grupos experimentales,

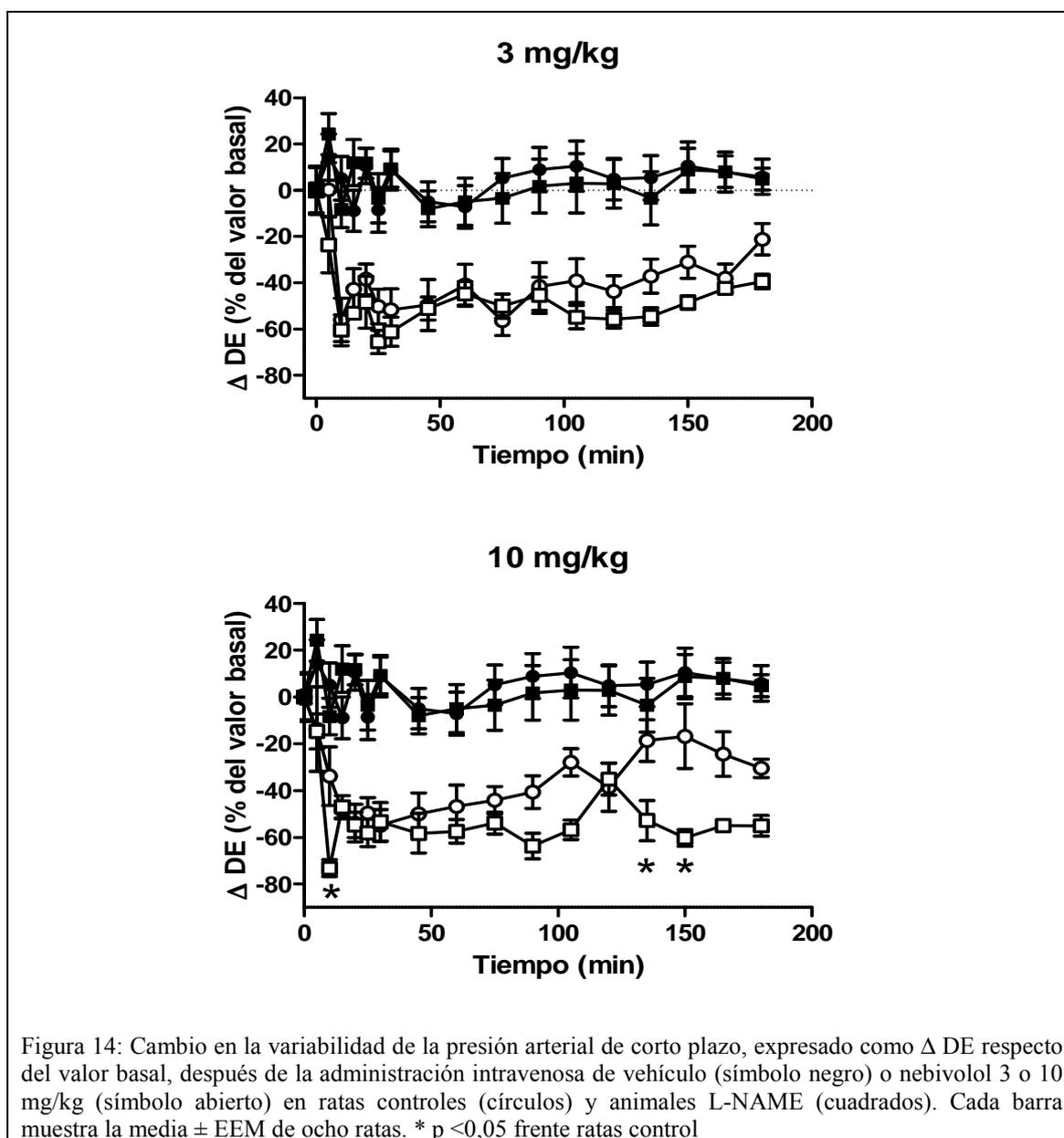
la FC retornó más rápidamente a los valores basales en el grupo L-NAME con respecto al grupo control después de la administración de la dosis más baja (Figura 13).



Efecto sobre la variabilidad de la presión arterial de corto plazo

La administración intravenosa de nebivolol redujo notablemente la VPA de corto plazo tanto en ratas hipertensas como en normotensas, tal como lo demuestra la reducción sostenida del DE de la presión arterial después de la administración del fármaco en ambas dosis (Figura 14). Además se encontraron diferencias en la magnitud de la

atenuación del DE inducida por nebivolol luego de la administración de la dosis de 10 mg/kg, siendo mayor en el grupo hipertenso. La administración de vehículo no produjo cambios en la VPA de corto plazo.



Efecto sobre la variabilidad de la presión arterial latido-a-latido

La VPA latido-a-latido también se redujo significativamente después de la administración de nebivolol en ambos grupos experimentales (Figura 15). El nebivolol produjo una mayor atenuación de la variabilidad de MBF en animales L-NAME

(3mg/kg: % del basal: $-34,4 \pm 3,6\%$; n=8; 10 mg/kg: % del basal: $-44,9 \pm 3,5\%$; n=8; $p < 0.05$ vs. ratas control) con respecto a los animales normotensos (3 mg/kg: % del basal: $-7,5 \pm 2,3\%$; n=8; 10 mg/kg: % del basal: $-20,7 \pm 6,5\%$; n=8) (Figura 15). Por el contrario, la reducción en los dominios de AF y BF no fue significativamente diferente en los dos grupos.

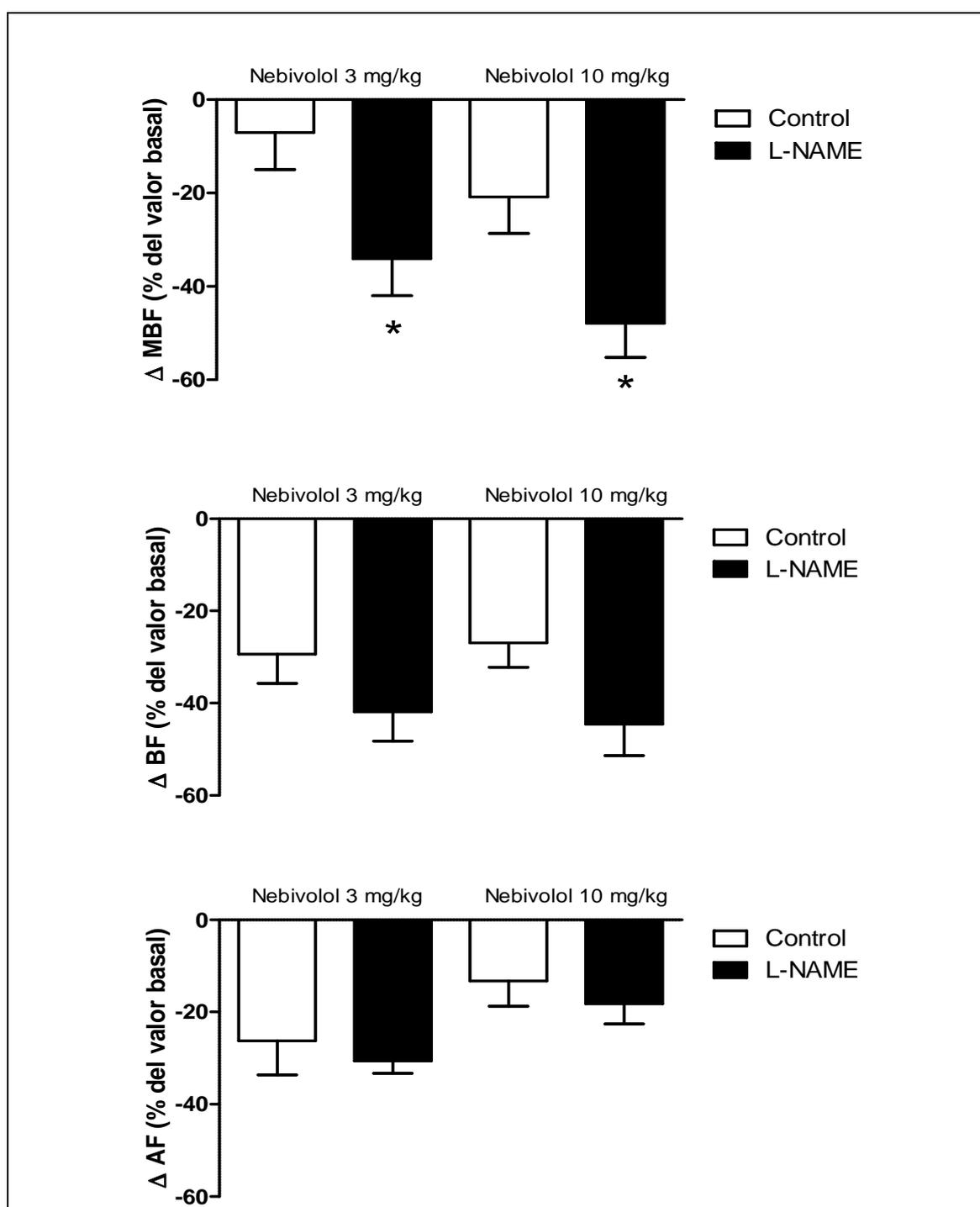


Figura 15: Cambios en la VPA de muy baja frecuencia (MBF), de baja frecuencia (BF) y alta frecuencia (AF), expresado como % de los valores basales, después de administración intravenosa de neбиволol en ratas normotensas (barras blancas) e hipertensos L-NAME (barras negras). Cada barra muestra la media \pm EEM de ocho ratas. * $p < 0,05$ vs ratas control

En cuanto a los efectos de neбиволol sobre la relación BF/AF, en ambos niveles de dosis, el β -bloqueante produjo una reducción significativa de dicho parámetro tanto en animales normotensos como en hipertensos por administración de L-NAME (Figura 16). La reducción del parámetro de la actividad simpática vascular fue mayor reducción en los animales L-NAME (3mg/kg: % del basal: $-39,5 \pm 3\%$; $n=8$; 10 mg/kg: % del basal: $-36,6 \pm 3,4\%$; $n=8$; $p < 0,05$ vs. ratas control) en comparación al grupo control (3mg/kg: % del basal: $-26,3 \pm 4,3 \%$; $n=8$; 10 mg/kg: % del basal: $-17,7 \pm 5,1 \%$; $n=8$).

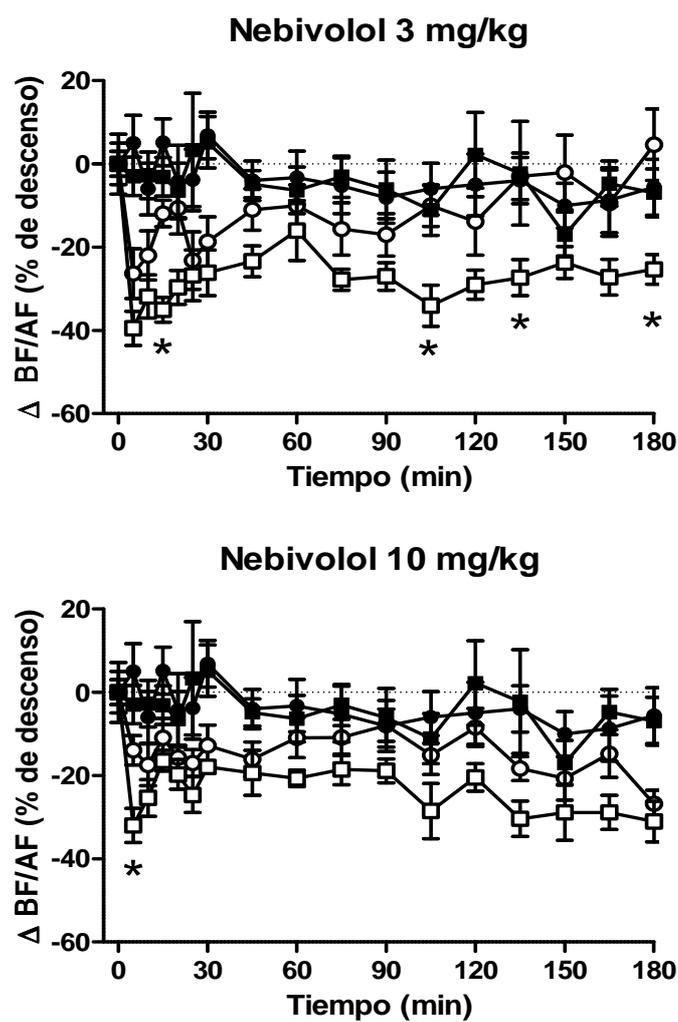


Figura 16: Curso temporal de los cambios en la relación (BF/AF), expresada como % de los valores de basales, después de la administración intravenosa de nebivolol (símbolos abiertos) o vehículo (símbolos negros) en ratas normotensas (círculos) y en animales hipertensos L-NAME (cuadrados). Cada punto muestra la media \pm EEM de ocho ratas. * $p < 0,05$ vs ratas control

Animales espontáneamente hipertensos (SH)

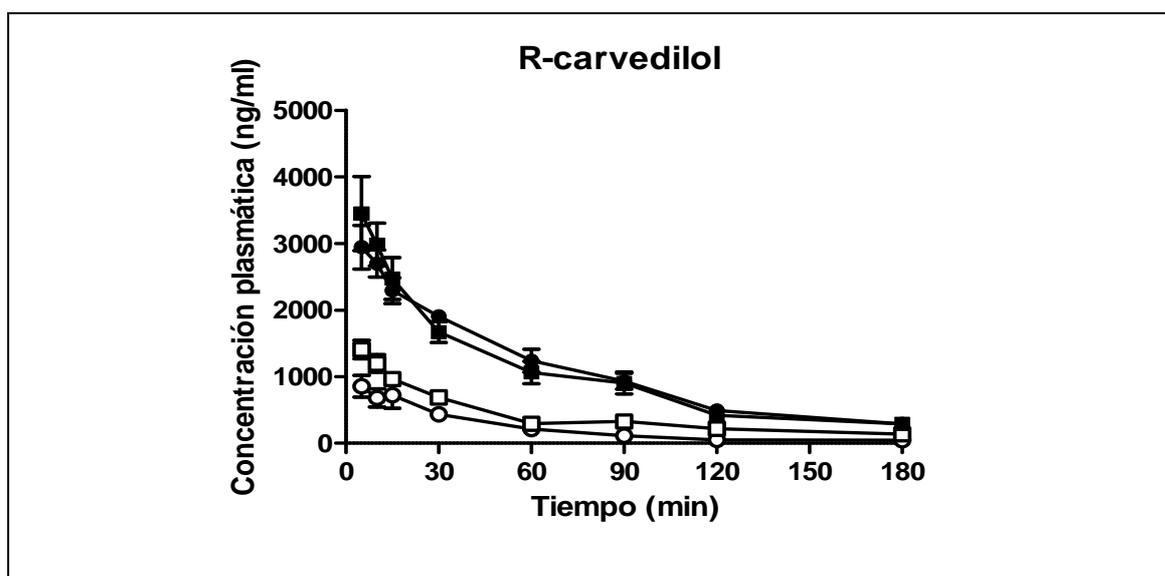
Las ratas SH presentaron alteraciones en los parámetros cardiovasculares hemodinámicos en relación a sus respectivos controles WKY. La PAM basal fue significativamente mayor en las ratas SH (154 ± 6 mmHg, $n=32$; $p < 0,05$) con respecto a los animales control (105 ± 2 mmHg; $n=32$). Al igual que en el grupo L-NAME, no se encontraron diferencias en la FC basal al comparar ambos grupos experimentales (SH: 392 ± 18 lpm; $n=32$; controles: 389 ± 12 lpm; $n=32$).

En cuanto a la VPA de corto plazo, se observó un incremento del DE del registro de presión arterial en los animales hipertensos comparado con los correspondientes controles ($7,47 \pm 0,66$ mmHg vs $5,56 \pm 0,39$ mmHg; $n=32$; $p < 0,05$). El análisis de la VPA latido-a-latido demostró la existencia de un incremento significativo en los animales hipertensos de la variabilidad en los dominios de MBF ($28,9 \pm 2,6$ mmHg² vs $16,6 \pm 1,9$ mmHg²; $n=32$; $p < 0,05$), de BF ($25,0 \pm 2,0$ mmHg² vs $12,2 \pm 1,4$ mmHg²; $n=32$; $p < 0,05$) y de AF ($4,7 \pm 0,3$ mmHg² vs $3,4 \pm 0,5$ mmHg²; $n=32$; $p < 0,05$) en comparación al grupo WKY. Para la relación BF/AF el incremento a favor de los animales L-NAME también resultó significativo (SH: $4,56 \pm 0,14$; WKY: $3,71 \pm 0,17$; $n=32$; $p < 0,05$).

Farmacocinética del carvedilol

La figura 17 muestra el curso temporal de las concentraciones plasmáticas de S- y R-carvedilol en animales WKY y SH después de la administración intravenosa en las dosis de 1 mg/kg o 5 mg/kg. Se encontró una disminución biexponencial de los niveles plasmáticos de carvedilol, compatible con un modelo de dos compartimientos. Los parámetros farmacocinéticos resultantes se muestran en la Tabla 9. No se encontraron diferencias en α y β de ambos enantiómeros cuando se compararon ratas SH con ratas

control. El $V_{d_{ss}}$ del S-carvedilol fue significativamente mayor que el del R-carvedilol en ambos grupos experimentales. La distribución del carvedilol no se vio afectada en gran medida por el estado hipertensivo, teniendo en cuenta que sólo el $V_{d_{ss}}$ del S-carvedilol se redujo significativamente en el grupo hipertenso después de la administración de la dosis de 1 mg/kg. El Cl de ambos enantiómeros fue significativamente mayor en los animales control en comparación con las ratas SH, aunque solamente después de la administración de la dosis más baja (Tabla 9). Por otra parte se evidenció un aumento dependiente de la dosis en el $V_{d_{ss}}$ y el Cl de ambos enantiómeros en ratas SH y normotensas. Como consecuencia de esto, la C_{max} y el AUC de ambos enantiómeros aumentaron en menor proporción a lo esperado en ambos grupos experimentales (Tabla 9).



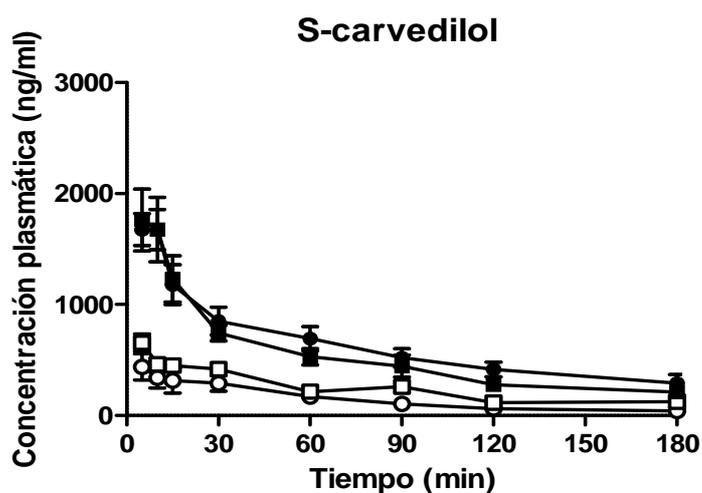


Figura 17: Concentración plasmática de R-carvedilol y S-carvedilol vs tiempo en animales WKY (círculos) y animales SH (cuadrados) luego de la administración de 1 mg/kg (símbolos abiertos) y 5 mg/kg (símbolos negros) de carvedilol.

Tabla 9: Parámetros farmacocinéticos de S-carvedilol y R-carvedilol luego de la administración intravenosa de carvedilol en animales WKY y SH. AUC (area bajo la curva), α (constante de distribución), β (constante de eliminación), Cl (aclaramiento) y $V_{d_{ss}}$ (volumen de distribución en el estado estacionario), C_{max} (máxima concentración extrapolada).

Enantiómero	S-carvedilol				R-carvedilol			
	WKY (n=12)		SH (n=12)		WKY (n=12)		SH (n=12)	
Grupo	1mg/kg	5 mg/kg	1 mg/kg	5 mg/kg	1mg/kg	5mg/kg	1mg/kg	5mg/kg
Dosis	1mg/kg	5 mg/kg	1 mg/kg	5 mg/kg	1mg/kg	5mg/kg	1mg/kg	5mg/kg
α (h ⁻¹)	12,3±1,2	1,2±1,3	14,3±1,4	12,3±1,9	11,8±1,8	11,3±1,3	12,3±1,2	13,0±1,5
β (h ⁻¹)	0,57±0,10 [§]	0,63±0,16	0,70±0,12 [§]	0,90±0,17	1,13±0,09	0,85±0,19	1,03±0,20	0,94±0,13
$V_{d_{ss}}$ (l)	1,47±0,20 [§]	2,12±0,32 ^{#§}	0,84±0,07 ^{§*}	1,84±0,32 ^{§#}	0,51±0,06	0,92±0,10 [#]	0,40±0,06	0,83±0,09 [#]
Cl (ml.min ⁻¹)	14,2±1,5	19,9±1,7 ^{#§}	9,9±1,9 ^{§*}	25,1±4,1 ^{#§}	10,3±1,5	12,6±2,1	6,4±0,9 [*]	13,6±1,9 [#]
C_{max} (ng.ml ⁻¹)	850±154 [§]	2.325±234 ^{#§}	841±161 [§]	2.845±588 ^{#§}	1.378±136	4.346±626 [#]	1.937±382	4.657±711 [#]
AUC _{0-∞} (ng.ml.h ⁻¹)	712±128	2.380±535 ^{§#}	1.135±301 [*]	2.105±375 ^{§#}	867±104	3.746±713 [#]	1.486±293 [*]	3.632±500 [#]
r ²	0,999	0,998	0,993	0,990	0,990	0,996	0,993	0,996
AIC	22,5(17,0-36,6)	62,5(59,3-93,3)	63,8(30,8-82,9)	67,8(11,4-98,6)	67,1(39,5-78,4)	87,1(24,8-92,3)	81,0(19,6-82,7)	73,0(6,8-95,2)

Datos expresados como media ± EEM.

[#]p<0.05 vs 1 mg/kg; ^{*}p<0.05 vs WKY; [§]p<0.05 vs R-carvedilol

Farmacodinamia del carvedilol

Efecto hipotensor

El efecto hipotensor de la administración de carvedilol (1 o 5 mg/kg) se representa en la figura 18, que muestra el curso temporal de los cambios en PAM de animales SH y controles WKY después de la administración intravenosa de vehículo o carvedilol. La administración de vehículo no modificó la PAM en ninguno de los grupos experimentales. El efecto antihipertensivo del carvedilol fue significativamente mayor en ratas SH (1 mg/kg: % del basal: $-38,4 \pm 3,8\%$; n=8; 5 mg/kg: % del basal: $-44,2 \pm 7,2\%$; n=8; $p < 0,05$ vs ratas WKY) en comparación con las ratas normotensas (1mg/kg: % del basal: $-16,8 \pm 4,1\%$; n=8; 5mg/kg: % del basal: $-18,7 \pm 3,3\%$; n=8).

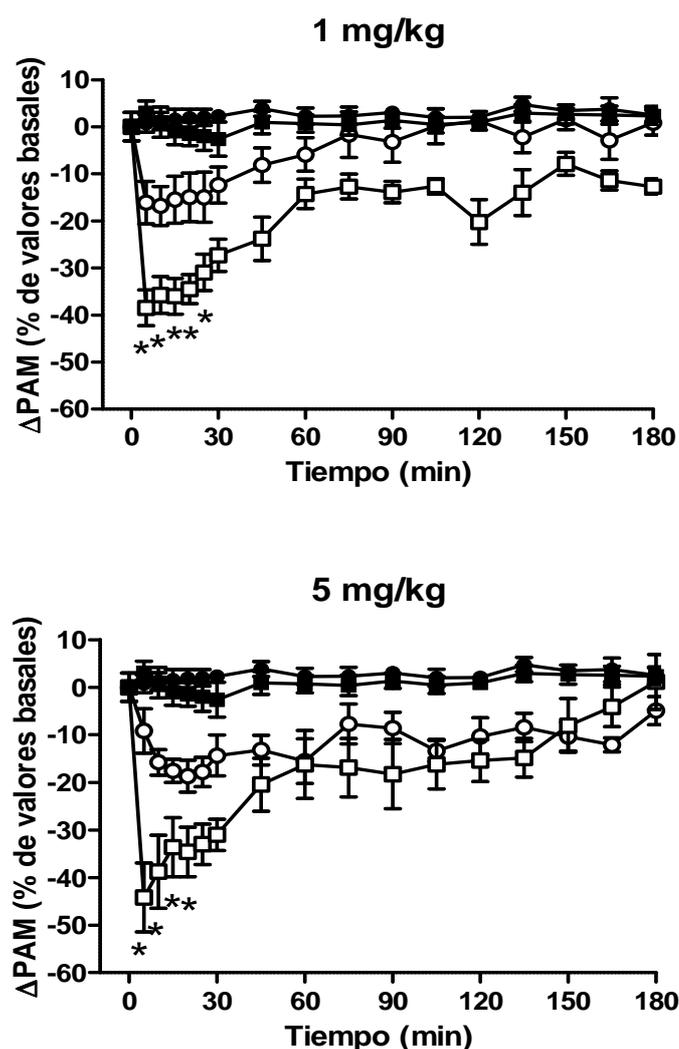


Figura 18: Evolución temporal de los cambios en la presión arterial media (Δ PAM; % de los valores basales), después de la administración intravenosa de vehículo (símbolo negro) o carvedilol (símbolo abierto) 1 mg/kg o 5 mg/kg en ratas normotensas (círculos) y en ratas SH (cuadrados). Cada punto muestra la media \pm EEM de ocho ratas. * $p < 0,05$ vs ratas control.

Con el fin de realizar el análisis PK/PD, se correlacionó el efecto hipotensor con las concentraciones de carvedilol racémico a través de un modelo PK/PD de compartimiento de efecto con la ecuación E_{max} sigmoideal. No se encontraron diferencias en la estimación de E_{max} al comparar ambos niveles de dosis en animales normotensos e hipertensos (Tabla 10), lo que sugiere que el rango farmacodinámico completo del efecto hipotensor de carvedilol se alcanzó bajo condiciones experimentales y la ecuación E_{max} sigmoideal es adecuada para la estimación de

parámetros PK/PD. El E_{\max} fue mayor en los animales hipertensos en comparación con los controles luego de la administración de ambas dosis, lo que sugiere una mayor eficacia antihipertensiva del carvedilol en ratas SH (Tabla 10). La velocidad de transferencia de carvedilol desde el compartimiento central hacia el de efecto no fue diferente comparando ambos grupos experimentales (Tabla 10). La potencia de carvedilol para el efecto hipotensor no se vio afectada en ratas SH con respecto a las ratas normotensas control.

Tabla 10: Parámetros PK/PD para el efecto antihipertensivo de carvedilol en animales SH y animales control después de la administración intravenosa en dosis de 1 mg/kg o 5 mg/kg. CE_{50} : concentración que corresponde a la mitad de la respuesta máxima, E_{\max} : respuesta máxima, γ : coeficiente de Hill, $t_{1/2eq}$: vida media de equilibrio entre el plasma y el compartimiento de efecto.

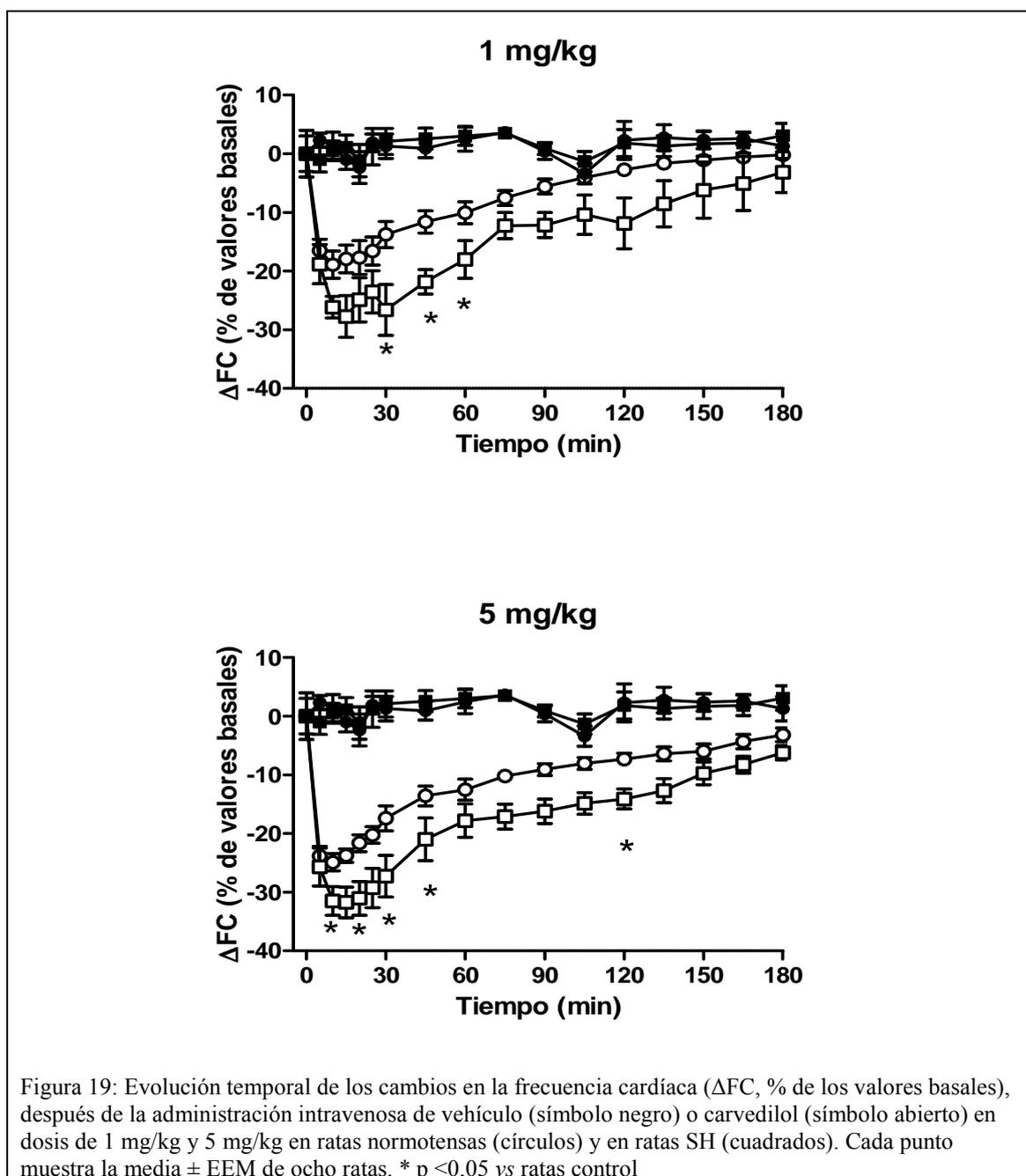
Grupo	WKY (n=16)		SH (n=16)	
	1 mg/kg	5 mg/kg	1 mg/kg	5 mg/kg
E_{\max} (%)	16,7±3,7	17,9±4,5	39,3±2,2*	45,5±5,0*
CE_{50} (ng/ml)	824±78	1.360±162	780±76	1.264±283
γ	2,1±0,2	2,2±0,2	2.2±0,2	2,4±0,2
$t_{1/2eq}$ (min)	3,5±0,5	3,8±0,4	3,3±0,3	3,2±0,2
r^2	0,955	0,936	0,929	0,945
<i>AIC</i>	61,5 (51,5-73,2)	64,2 (60,5-85,7)	66.6 (58,8-105,6)	62,5 (47,1-92,6)

Datos expresados como media \pm EEM. * $p < 0.05$ vs control

Efecto bradicardizante

La figura 19 muestra el curso temporal de los cambios de FC en animales SH y controles después de la administración intravenosa del vehículo o de carvedilol en una dosis de 1 o 5 mg/kg. La administración de vehículo no modificó la FC en ninguno de los grupos experimentales. El efecto cronotrópico de carvedilol fue significativamente mayor en ratas SH (1 mg/kg: % del basal: -27,7±3,5%; n=8; 5mg/kg: % del basal: -31,7

$\pm 2,6\%$; $n=8$; $p<0,05$ vs ratas control) con respecto a animales normotensos WKY(1 mg/kg: % del basal: $-18,9\pm 2,3\%$; $n=8$; 5mg/kg: % del basal: $-24,8\pm 1,4\%$; $n=8$) después de la administración de ambas dosis (Figura 19).



Se correlacionó el efecto bradicardizante con las concentraciones de carvedilol racémico, a través de un modelo PK/PD de compartimiento de efecto con la ecuación E_{max} sigmoideal. No se encontraron diferencias en la estimación de E_{max} al comparar ambos niveles de dosis en animales normotensos e hipertensos (Tabla 11), lo que sugiere que el rango farmacodinámico completo de efecto bradicardizante de carvedilol se alcanzó bajo condiciones experimentales y la ecuación E_{max} sigmoideal es adecuada para la estimación de parámetros PK/PD. La velocidad de transferencia de carvedilol desde el compartimiento central hacia el de efecto no fue diferente comparando ambos grupos experimentales (Tabla 11). La respuesta cronotrópica máxima fue mayor en ratas SH en comparación con ratas normotensas. Por otra parte, S-carvedilol mostró una potencia equivalente en ratas hipertensas SH y animales WKY (Tabla 11).

Tabla 11: Parámetros PK/PD para el efecto cronotrópico de carvedilol en animales SH y animales control después de la administración intravenosa en dosis de 1 mg/kg o 5 mg/kg. CE_{50} : Concentración que corresponde a la mitad de la respuesta máxima, E_{max} : respuesta máxima, γ : coeficiente de Hill, $t_{1/2eq}$: vida media de equilibrio entre el plasma y el compartimiento de efecto.

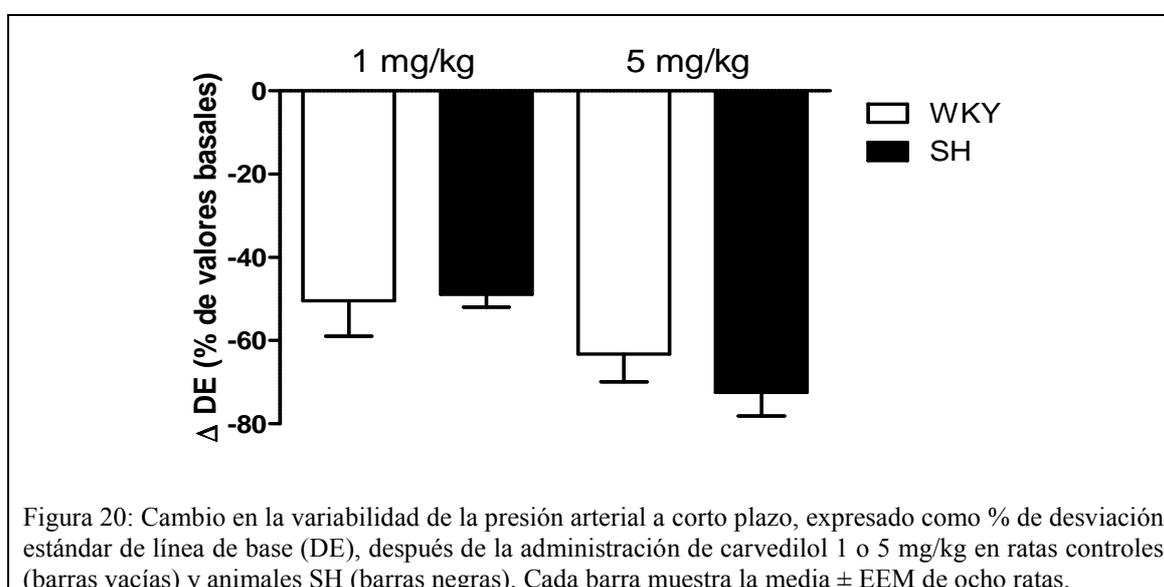
Grupo	WKY (n=16)		SH (n=16)	
	1 mg/kg	5 mg/kg	1 mg/kg	5 mg/kg
E_{max} (%)	16,2±2,3	13,4±2,5	26,8±3,4*	27,6±3,9*
CE_{50} (ng/ml)	113±13	136±16	153±23	118±16
γ	2,1±0,2	2,0±0,2	2,2±0,1	2,2±0,3
$t_{1/2eq}$ (min)	4,1±0,4	3,8±0,6	4,6±0,4	4,5±0,6
r^2	0,955	0,956	0,949	0,985
AIC	62,9 (52,8-76,7)	74,9 (62,5-89,7)	76,6 (55,8-125,8)	68,5 (47,1-93,4)

Datos expresados como media ± EEM.

* $p < 0.05$ vs control

Efecto sobre la variabilidad de la presión arterial de corto plazo

La administración de carvedilol redujo drásticamente la VPA de corto plazo tanto en animales normotensos WKY como en ratas SH; dicho efecto se evidencia en la reducción sostenida del DE de la presión arterial (Figura 20). No se encontraron diferencias en la magnitud de la atenuación del DE al comparar animales SH y controles (Figura 20).



Efecto sobre la variabilidad de la presión arterial latido-a-latido

La VPA latido-a-latido también se redujo significativamente en ambos grupos experimentales. Además, el carvedilol ejerció una mayor disminución de la VPA en los tres dominios de frecuencia en ratas SH en comparación con los animales WKY en ambos niveles de dosis (Figura 21).

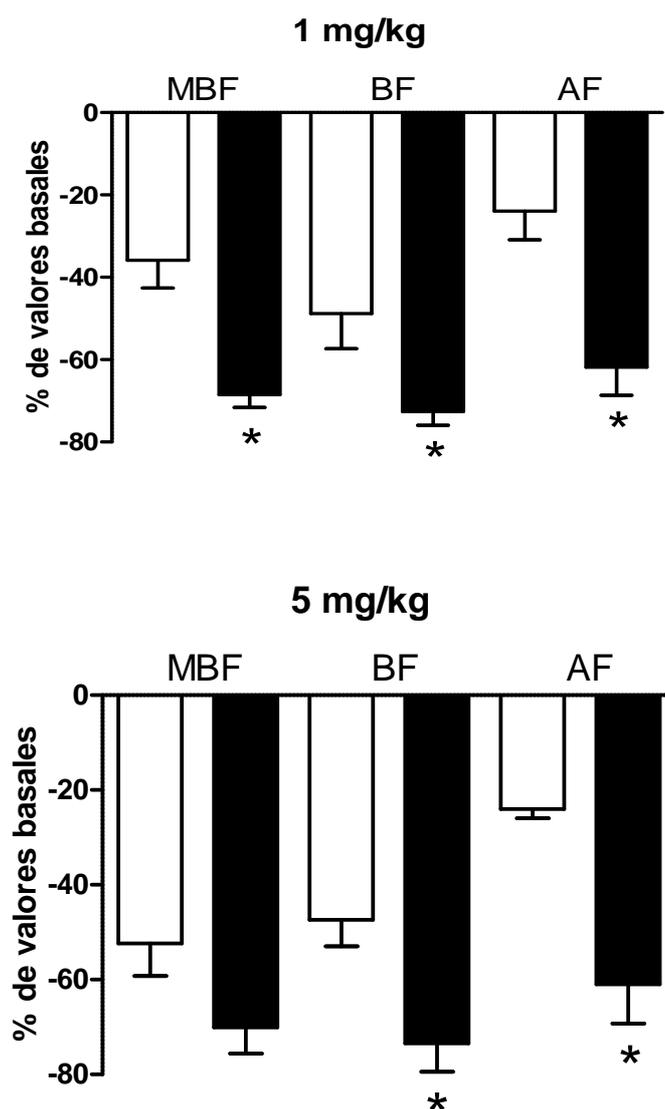
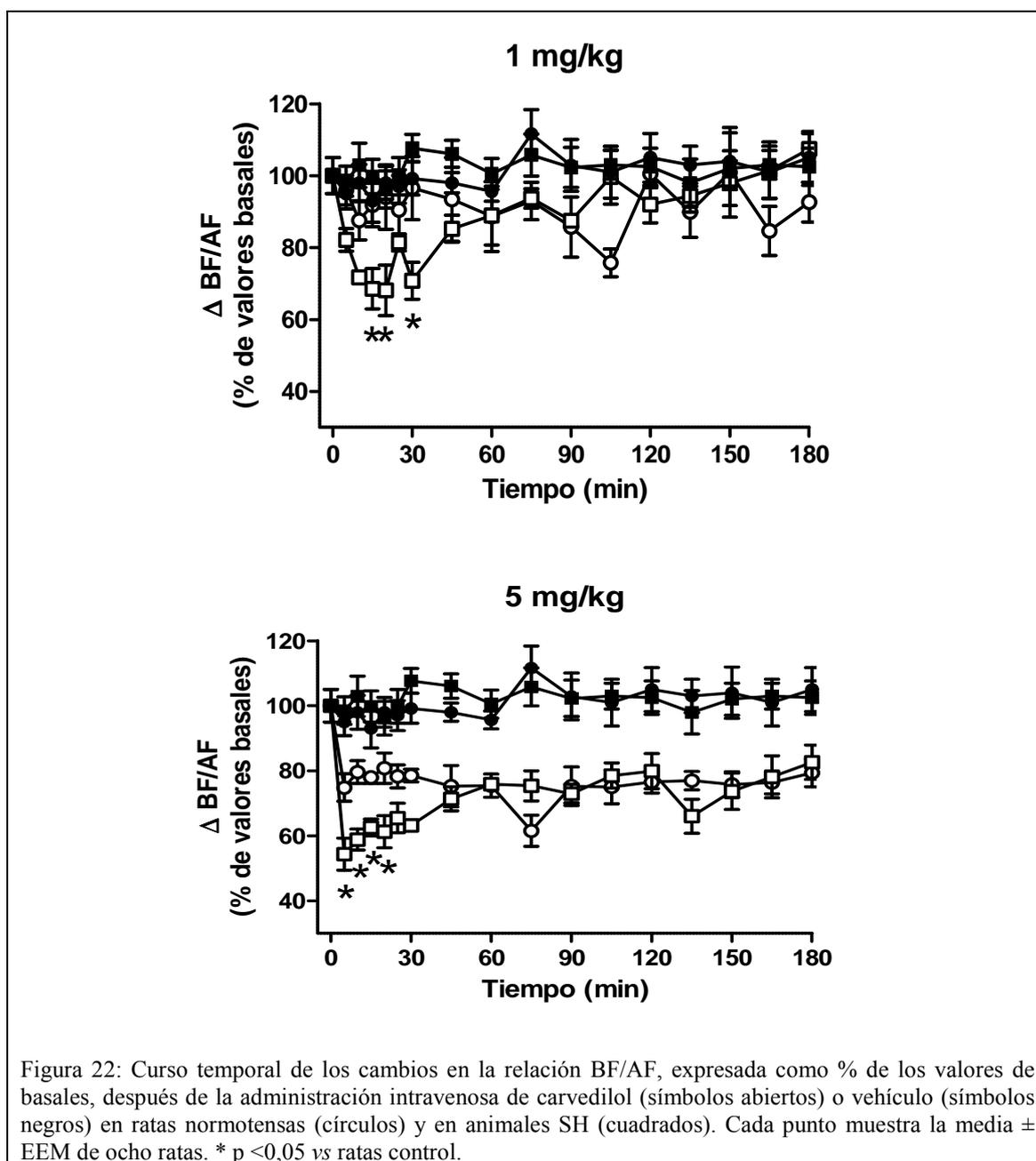


Figura 21: Cambios en la VPA de muy baja frecuencia (MBF), de baja frecuencia (BF) y alta frecuencia (AF), expresado como % de los valores basales, después de administración intravenosa de carvedilol en ratas normotensas WKY (barras blancas) y SH (barras negras). Cada barra muestra la media \pm EEM de ocho ratas. * $p < 0,05$ vs control.

La figura 22 muestra el curso temporal de la relación BF/AF después de la administración de vehículo o carvedilol (1 o 5 mg/kg) en ratas WKY y SH. Mientras que la administración del vehículo no modificó la relación BF/AF, el carvedilol disminuyó significativamente este parámetro en ambos grupos experimentales. Por otra parte, la reducción de la relación BF/AF fue significativamente mayor en las ratas SH

(1mg/kg: % de reducción: $-32,1 \pm 5,5\%$; $n=8$; 5mg/kg: % de reducción: $-46,3 \pm 4,9\%$; $n=8$; $p < 0.05$ vs ratas WKY) con respecto a los animales normotensos (1mg/kg: % de reducción: $-13,6 \pm 5,4\%$; $n=8$; 5mg/kg: $25,2 \pm 4,2\%$; $n=8$).



Farmacocinética del nebivolol

La figura 23 muestra el curso temporal de las concentraciones plasmáticas de *l*- y *d*-nebivolol en animales SH (n=8) y controles (n=8) después de la administración intravenosa. Se encontró una disminución biexponencial de los niveles plasmáticos de nebivolol compatibles con un modelo de dos compartimentos farmacocinéticos en todos los experimentos después de la administración de dosis de 3 o 10 mg/kg. Los parámetros farmacocinéticos resultantes se muestran en la Tabla 12. No se encontraron diferencias en α , $V_{d_{ss}}$ y la C_{max} de ambos enantiómeros en animales SH en comparación con las ratas normotensas WKY. El Cl de *l*-nebivolol fue significativamente menor en ratas SH con respecto a los animales WKY en ambos niveles de dosis. Además, se encontró una reducción no significativa en el Cl de *d*-nebivolol en SH en comparación con el grupo de normotensos (Tabla 12). En consecuencia, la constante de eliminación β de *l*-nebivolol se redujo en animales SH respecto de ratas WKY después de la aplicación de la dosis de 10 mg/kg. El nebivolol mostró una farmacocinética enantioselectiva, teniendo en cuenta que el Cl de *l*-nebivolol fue significativamente mayor al del *d*-nebivolol en ambos grupos experimentales. Además, el AUC de *d*-nebivolol fue mayor con respecto a la del *l*-enantiómero en ratas SH y controles. Ambos enantiómeros mostraron una farmacocinética lineal; tanto la C_{max} y AUC aumentaron de una manera proporcional a la dosis en ambos grupos experimentales (Tabla 12).

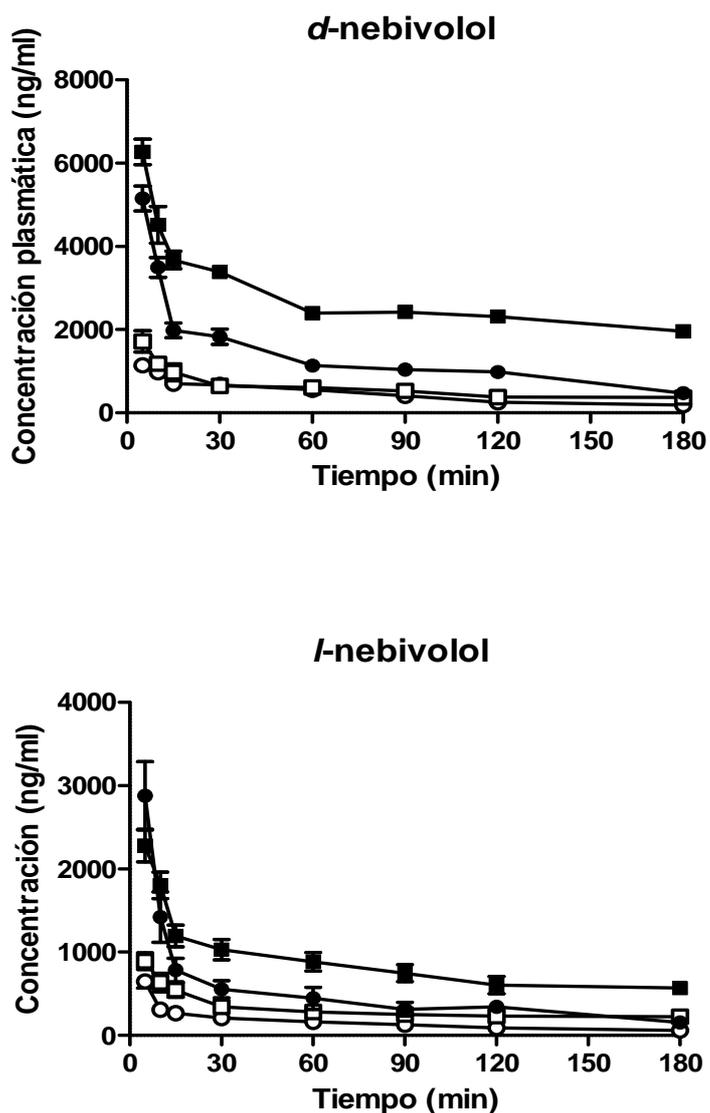


Figura 23: Concentración plasmática de *l*-nebivolol y *d*-nebivolol vs tiempo en animales control (círculos) y animales SH (cuadrados) luego de la administración de 3 mg/kg (símbolos abiertos) y 10 mg/kg (símbolos negros) de nebivolol. Cada punto equivale a la media \pm EEM para ocho ratas.

Tabla 12: Parámetros farmacocinéticos del *d*-nebivolol y *l*-nebivolol en animales WKY y SH después de la administración intravenosa de nebivolol en dosis de 3 mg/kg o 10 mg/kg. AUC (area bajo la curva), α (constante de distribución), β (constante de eliminación), Cl (aclaramiento), $V_{d_{ss}}$ (volumen de distribución en el estado estacionario), C_{max} (concentración máxima extrapolada)

Enantiómero	<i>d</i> -nebivolol				<i>l</i> -nebivolol			
	Grupo	WKY (n=16)		SH (n=16)		WKY (n=16)		SH (n=16)
Dosis	3 mg/kg	10 mg/kg	3 mg/kg	10 mg/kg	3 mg/kg	10 mg/kg	3 mg/kg	10 mg/kg
α (h ⁻¹)	7,2±2,9	8,3±2,0	7,5±1,3	11,2±2,1	10,1±0,7	10,7±1,7	7,5±1,5	6,7±0,7
β (h ⁻¹)	0,39±0,05	0,29±0,07	0,24±0,05	0,41±0,04	0,45±0,03	0,47±0,13	0,38±0,08	0,23±0,05*
$V_{d_{ss}}$ (l)	2,3±0,5	4,0±1,2	2,4±0,4	1,5±0,3	5,6±1,6 [§]	4,7±0,6	3,5±0,4	5,4±1,1 [§]
Cl (ml.min ⁻¹)	18,8±5,0	19,4±6,1	10,6±3,5	13,4±2,7	59,9±16,9 [§]	47,8±9,5	22,4±6,2*	19,3±3,5*
C_{max} (ng.ml ⁻¹)	1.777±216	6.665±1352 [#]	2.233±553	7.770±1216 [#]	1.270±215	5.060±773 [#]	1.318±204	2.507±216 ^{#§}
AUC _{0-∞} (ng.ml.h ⁻¹)	1.742±452	5.755±1670 [#]	3.480±834	7.244±1298 [#]	582±217 [§]	2.110±629 [#]	1.666±340*	5.008±984 ^{#*}
r ²	0,995	0,997	0,996	0,997	0,996	0,997	0,997	0,992
AIC	81,7 (57,6-92,8)	81,6 (65,6-118)	78,3 (66,2-89,4)	89,8 (64,2-112)	64,1 (57,0-75,0)	73,9 (55,4-91,6)	46,7 (14,9-65,2)	68,5 (31,6-98,2)

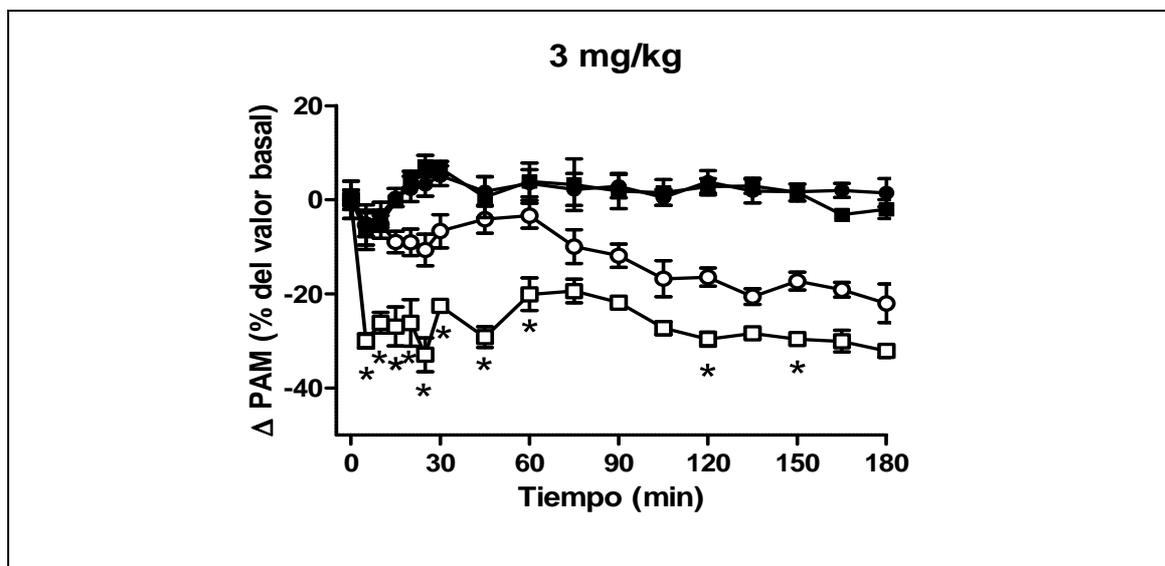
Datos expresados como media ± EEM.

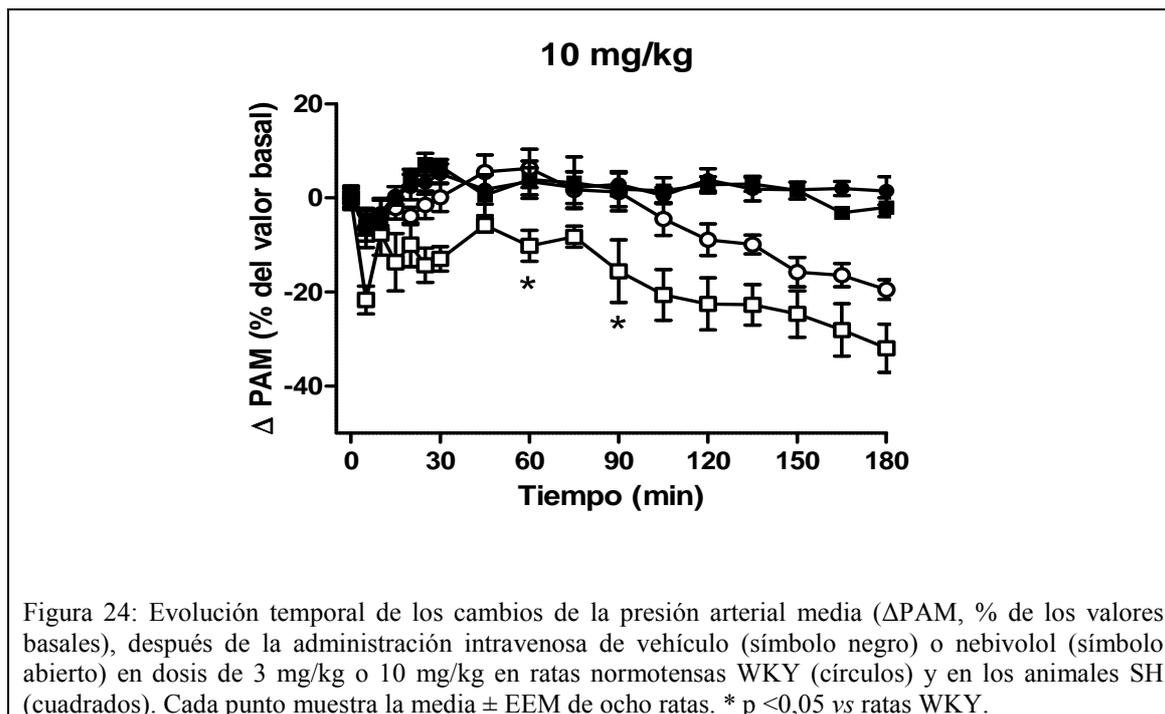
[#]p<0.05 vs 3 mg.kg⁻¹; *p<0.05 vs Control; [§]p<0.05 vs *d*-nebivolol

Farmacodinamia del nebivolol

Efecto hipotensor

La respuesta hipotensora luego de la administración intravenosa de nebivolol en una dosis de 3 o 10 mg/kg en animales SH y WKY se representa en la figura 24. No se encontraron cambios en la PAM entre animales SH y controles después de la administración del vehículo. La aplicación de nebivolol en ambas dosis produjo una marcada disminución de la PAM en ratas control y SH. Por otra parte, en estos niveles de dosis, la respuesta hipotensora al nebivolol fue significativamente mayor en los animales hipertensos SH en comparación con ratas normotensas WKY (Figura 24). La PAM no regresó a los valores basales durante todo el experimento en los dos grupos experimentales, lo que demuestran la duración prolongada de la respuesta antihipertensiva (Figura 24) y la imposibilidad del uso de modelos PK/PD debido a la pobre correlación entre la concentración plasmática y el efecto hipotensor.





Efectos sobre la frecuencia cardiaca

La figura 25 muestra el curso temporal de los cambios de FC en ratas normotensas WKY y SH después de vehículo o nebivolol en una dosis de 3 o 10 mg/kg. La administración de vehículo no modificó la FC en ninguno de los grupos experimentales. El nebivolol indujo una reducción dosis dependiente de la FC en ambos grupos experimentales (Figura 25) con recuperación parcial de los valores basales durante el seguimiento. La respuesta cronotrópica al nebivolol no difirió entre ratas SH y controles en las dosis evaluadas (Figura 25).

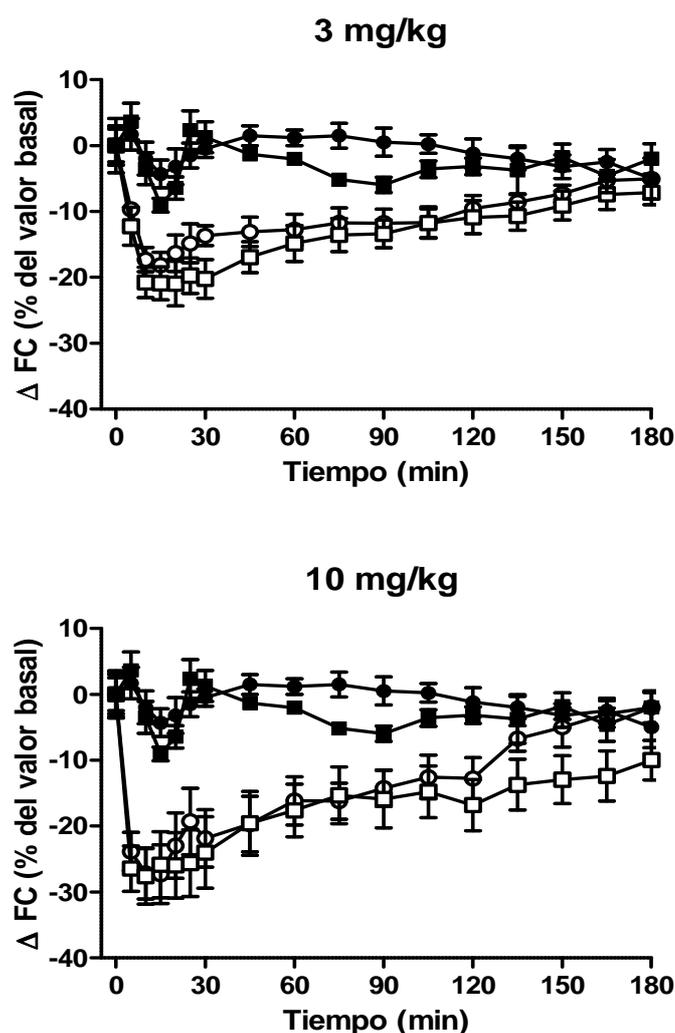
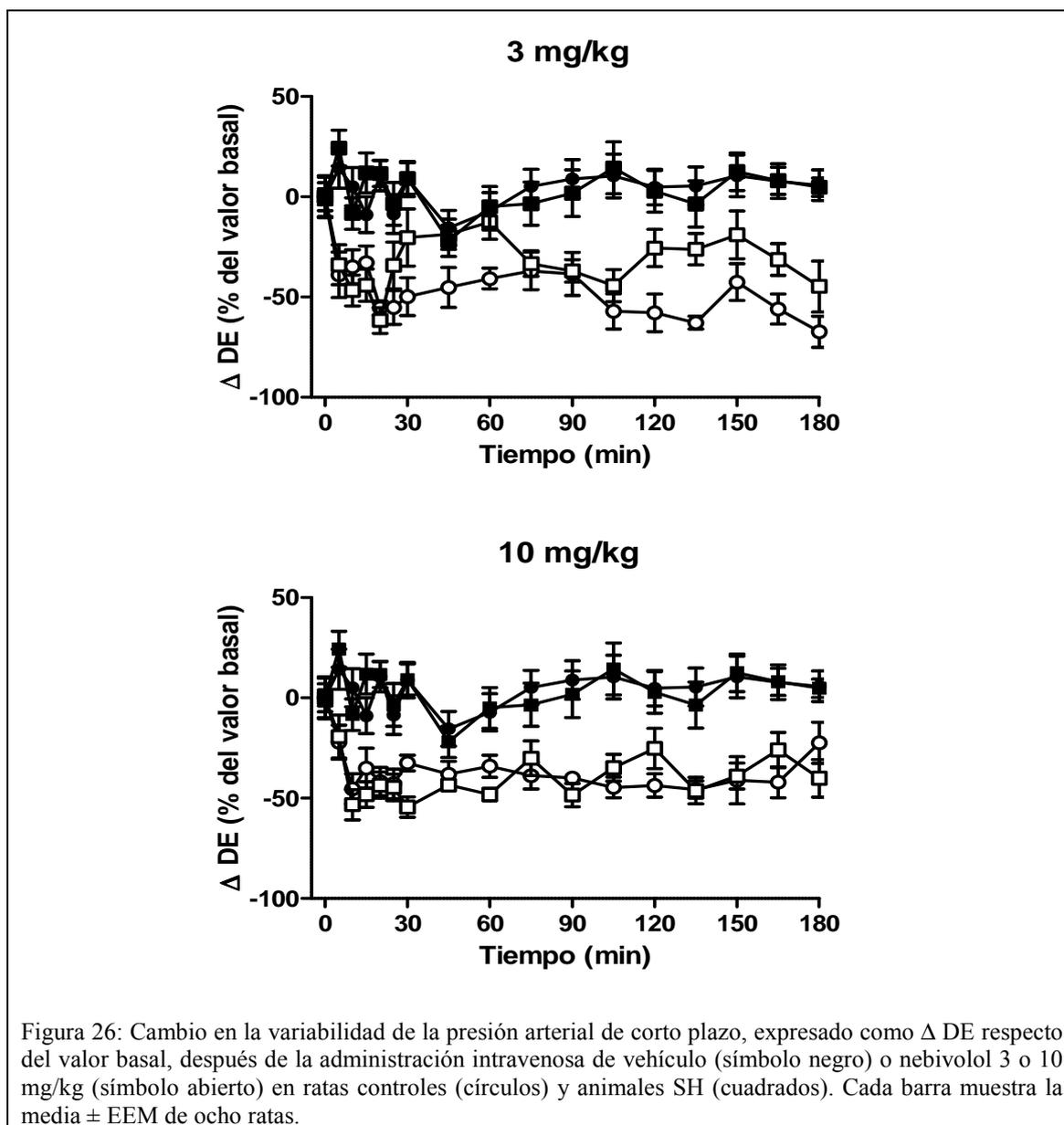


Figura 25: Evolución temporal de los cambios en la frecuencia cardíaca (ΔFC , % de los valores basales), después de la administración intravenosa de vehículo (símbolo negro) o nebivolol (símbolo abierto) en dosis de 3 mg/kg y 10 mg/kg en ratas normotensas WKY (círculos) y en los animales SH (cuadrados). Cada punto muestra la media \pm EEM de ocho ratas.

Efecto sobre la variabilidad de la presión arterial de corto plazo

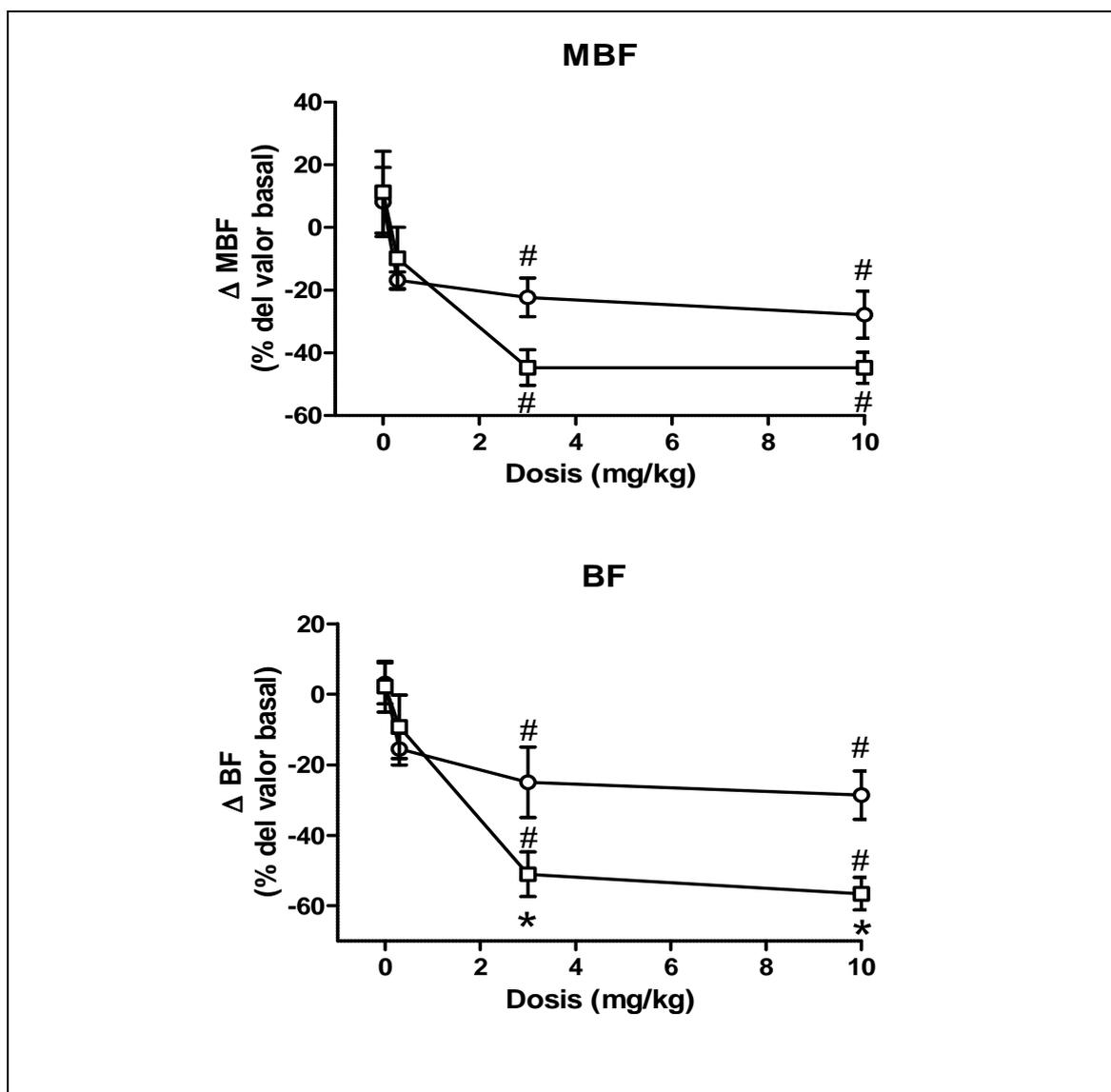
Como se evidencia en la figura 26, la administración intravenosa de nebivolol redujo marcadamente la VPA de corto plazo tanto en animales normotensos WKY como en ratas SH, con una reducción sostenida del DE de la presión arterial después de la administración de dosis de 3 o 10 mg/kg del fármaco. La administración del vehículo no indujo cambios en la VPA de corto plazo y no se encontraron diferencias en la magnitud de la reducción del DE al comparar ambos grupos experimentales (Figura 26).

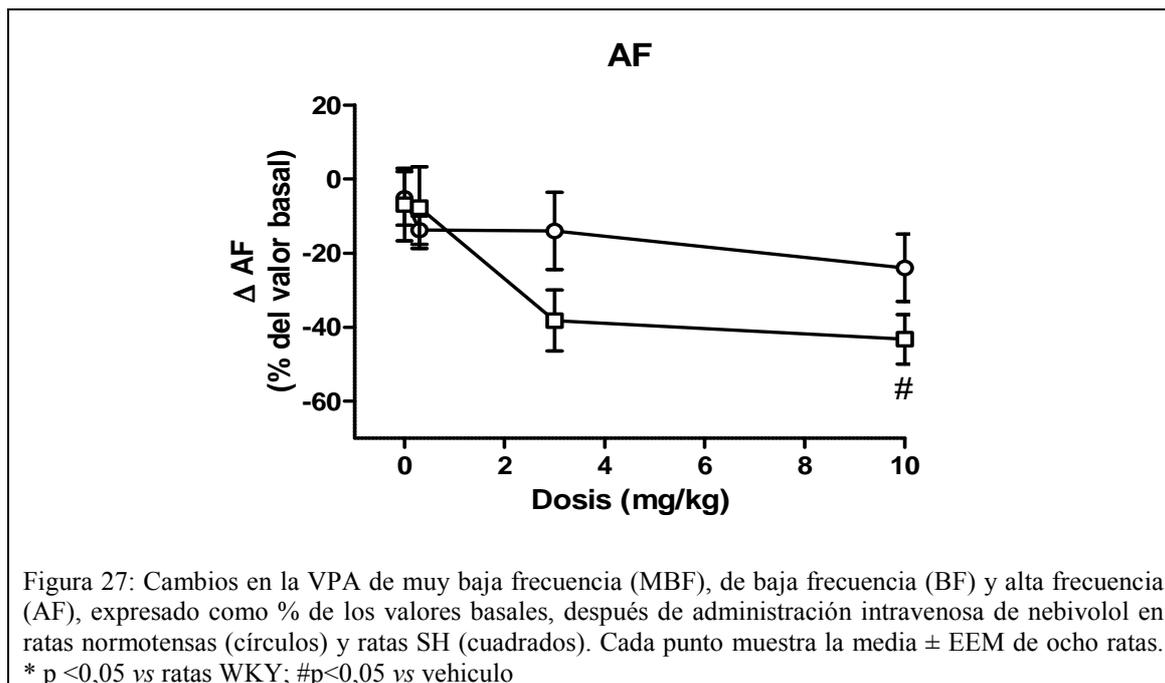


Efecto sobre la variabilidad de la presión arterial latido-a-latido

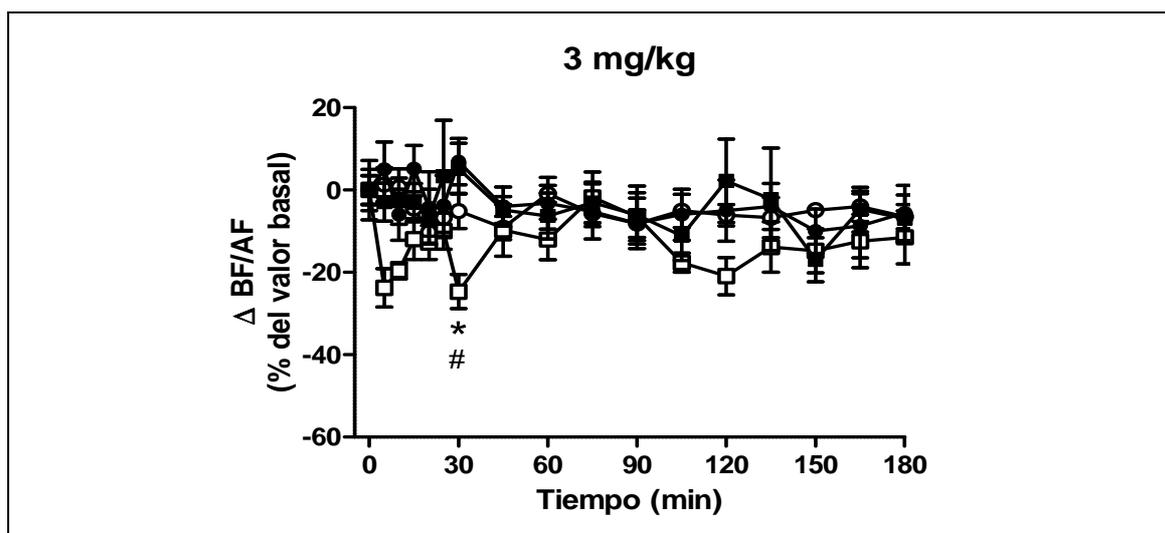
La VPA latido-a-latido también se redujo significativamente por la administración de nebivolol en los dos grupos experimentales. En ratas WKY, nebivolol en ambas dosis produjo una reducción significativa de la VPA de MBF y BF. En el caso de los animales hipertensos SH, la reducción se observó en los tres dominios de VPA latido-a-latido. Por otra parte, el nebivolol ejerció una mayor disminución de la variabilidad de BF en SH en comparación con los animales WKY en ambos niveles de dosis (Figura 27). La

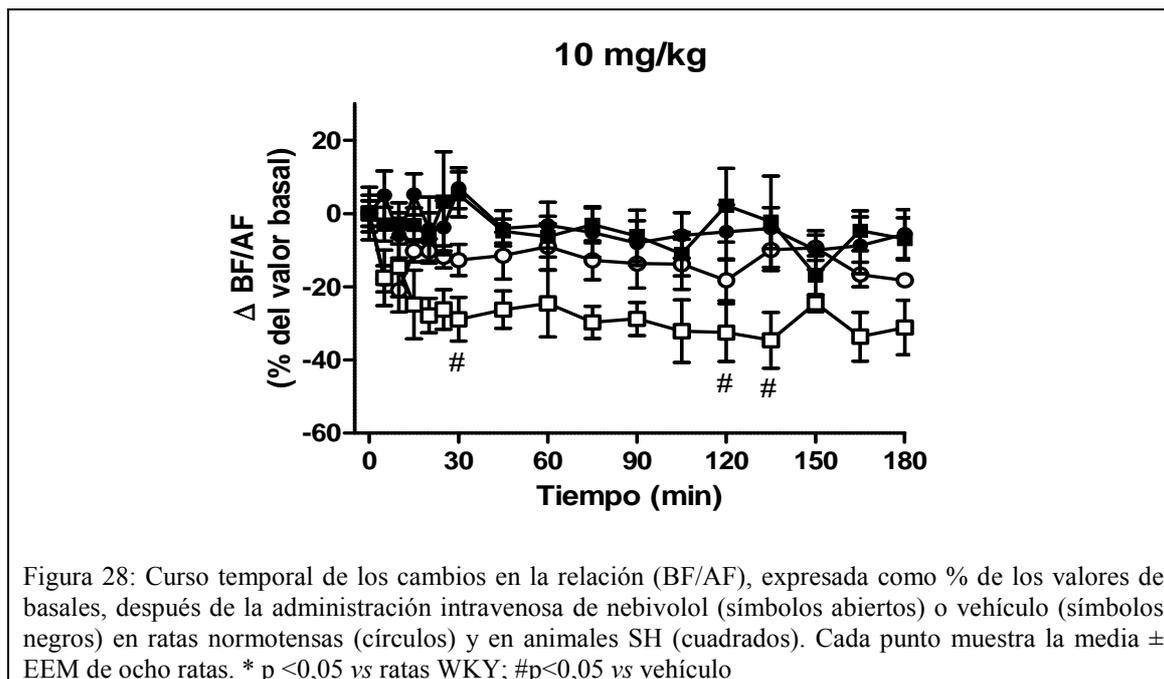
reducción en los dominios de MBF y AF no fue significativamente diferente entre los dos grupos experimentales (Figura 27).





Por último, los efectos de nebivolol sobre la relación BF/AF se evaluaron en ratas control WKY y animales SH después de la administración de vehículo o de nebivolol 3 o 10 mg/kg. Mientras que el vehículo no indujo cambio alguno, el nebivolol en ambas dosis produjo una reducción significativa de este parámetro en animales SH, pero no en animales WKY (Figura 28).





Animales Fructosa

La tabla 13 muestra el perfil metabólico de los animales hipertensos por sobrecarga de fructosa y la comparación con los controles. Los animales a los que se administró fructosa en agua de bebida mostraron una mayor glucemia, trigliceridemia e insulinemia en relación a los controles. Al comparar los parámetros cardiovasculares de los animales hipertensos por sobrecarga de fructosa con sus respectivos controles, se evidenciaron algunas diferencias significativas; la PAM basal fue mayor en las ratas fructosa (114 ± 2 mmHg; $n=32$; $p < 0,05$) con respecto a las ratas control (105 ± 2 mmHg; $n=32$). No se encontraron diferencias en la FC basal al comparar ambos grupos experimentales (ratas control: 382 ± 14 lpm; $n=32$; ratas fructosa: 377 ± 12 lpm; $n=32$).

Tabla 13: Parámetros metabólicos del modelo de sobrecarga dietaria de fructosa

Grupo experimental	Trigliceridemia (mg/ml)	Glucemia (mg/ml)	Insulinemia basal (ng/ml)	Insulinemia dos horas* (ng/ml)
Control	0,51 ± 0,08	1,38 ± 0,03	1,2 ± 0,2	3,1 ± 0,6
Fructosa	1,00 ± 0,10	1,56 ± 0,03	2,8 ± 0,4	6,2 ± 0,6
	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,05

* Determinaciones realizadas luego de dos horas de realizada una curva de tolerancia a la glucosa.

Los valores de trigliceridemia y glucemia corresponden a la media ± EEM de 32 animales. Los valores de insulinemia basal y a las dos horas de una prueba de tolerancia a la glucosa corresponden a la media ± EEM de 8 animales.

Las ratas hipertensas por sobrecarga de fructosa mostraron mayor VPA de corto plazo al compararse con el grupo control (DE: 4,00±0,16 mmHg vs 3,27±0,21 mmHg; p<0.05). En cuanto a la VPA latido-a-latido las ratas fructosa exhibieron un incremento de la misma en los dominios de MBF y de BF (MBF: 19,0±1,9 mmHg²; BF 12,8±1,3 mmHg²; n=32; p<0,05) en comparación con el grupo normotenso (MBF: 12,7±1,0 mmHg²; BF: 9,1±0,5 mmHg²; n=32). No se encontraron diferencias en la variabilidad de AF entre los grupos experimentales (ratas control: 3,2±0,3 mmHg²; n=32; ratas fructosa: 4,1±0,5 mmHg²; n=32). La actividad simpática vascular estimada por la relación BF/AF basal no fue significativamente diferente entre el grupo fructosa (3,5±0,2; n=32) y animales control (3,2±0,2; n=32).

Farmacocinética del carvedilol

La figura 29 muestra el curso temporal de las concentraciones plasmáticas de S- y R-carvedilol en animales control y ratas hipertensas por sobrecarga de fructosa después de la administración intravenosa del β-bloqueante a dosis de 1 mg/kg o 3 mg/kg. Se

observó una disminución biexponencial de los niveles plasmáticos de carvedilol en todos los grupos experimentales compatible con un modelo farmacocinético de dos compartimientos (Figura 29). No se encontraron diferencias en las constantes α y β al comparar ambos grupos experimentales. Para ambos enantiómeros, se detectó un incremento dependiente de la dosis en el Vd_{ss} en los animales control (Tabla 14). Por el contrario, sólo el Vd_{ss} del R-carvedilol mostró dependencia de la dosis en las ratas alimentadas con fructosa (Tabla 14). Después de la administración del carvedilol en la dosis de 3 mg/kg, el Vd_{ss} de ambos enantiómeros se redujo significativamente en los animales hipertensos comparado con el grupo normotenso (Tabla 14). Además, aunque el Cl de ambos enantiómeros no se vio afectado por el estado hipertensivo inducido por la sobrecarga de fructosa, el aclaramiento del S-carvedilol mostró un aumento dependiente de la dosis en las ratas control (Tabla 14). Como consecuencia de la dependencia de la dosis tanto del Vd_{ss} como del Cl, la C_{max} y el AUC de los dos enantiómeros aumentaron menos que lo proporcionalmente esperado en las ratas normotensas. En el grupo fructosa, solo el R-enantiómero exhibió un comportamiento no lineal.

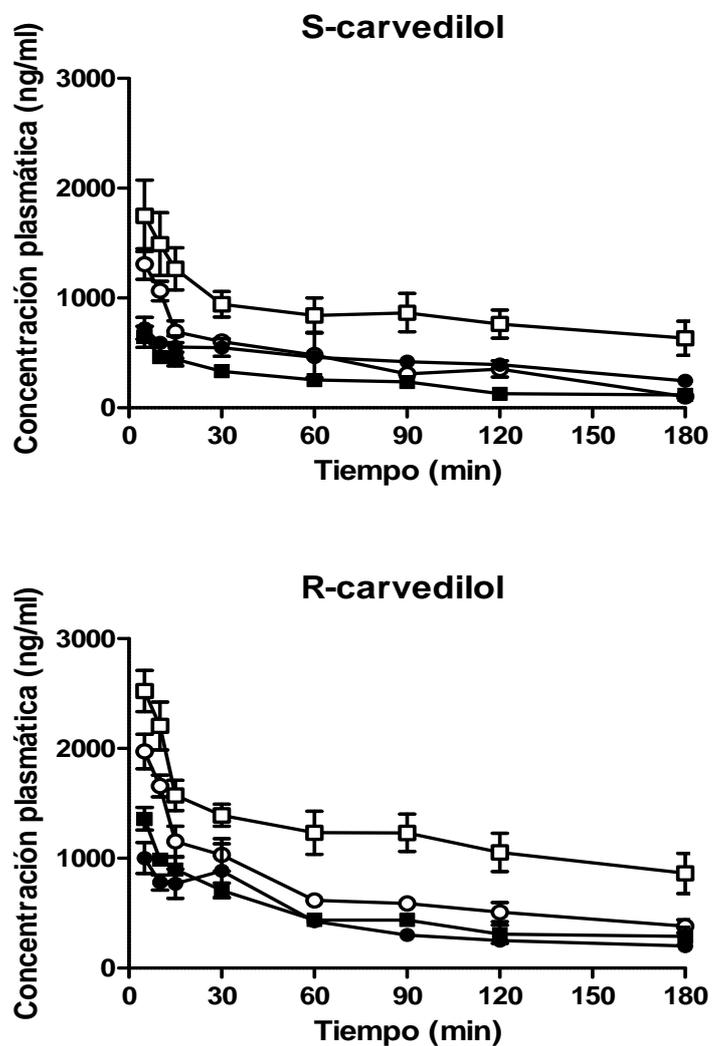


Figura 29: Concentración plasmática de S-carvedilol y R-carvedilol vs tiempo en animales control (círculos) y animales fructosa (cuadrados) luego de la administración de 1 mg/kg (símbolos abiertos) y 3 mg/kg (símbolos negros) de carvedilol. Cada punto equivale a la media \pm EEM para ocho ratas.

Tabla 14: Parámetros farmacocinéticos del S- y R- carvedilol en animales control y alimentados con fructosa después de la administración intravenosa de carvedilol en dosis de 1 mg/kg o 3 mg/kg. AUC (area bajo la curva), α (constante de distribución), β (constante de eliminación), Cl (aclaramiento), $V_{d_{ss}}$ (volumen de distribución en el estado estacionario), C_{max} (concentración máxima extrapolada).

Enantiómero	S-carvedilol				R-carvedilol			
	Control (n=12)		Fructosa (n=12)		Control (n=12)		Fructosa (n=12)	
Grupo	Control (n=12)		Fructosa (n=12)		Control (n=12)		Fructosa (n=12)	
Dosis	1 mg/kg	3 mg/kg	1 mg/kg	3 mg/kg	1 mg/kg	3 mg/kg	1 mg/kg	3 mg/kg
α (h^{-1})	12,3±1,2	8,0±1,3	14,3±1,4	9,3±1,9	7,8±1,8	6,3±1,3	8,3±1,2	8,0±1,5
β (h^{-1})	0,43±0,15	0,57±0,07 [§]	0,44±0,09	0,38±0,09	0,38±0,19	0,25±0,04	0,47±0,07	0,31±0,08
$V_{d_{ss}}$ (l)	1,13±0,26	2,24±0,29 ^{#§}	1,14±0,11 [§]	1,21±0,07 ^{§*}	0,77±0,11	1,51±0,09 [#]	0,53±0,03	0,89±0,07 ^{*#}
Cl (ml/min)	6,5±1,4	14,2±3,4 ^{#§}	9,1±1,0 [§]	8,9±1,6 [§]	4,5±1,2	6,7±1,1	4,4±0,5	4,7±1,3
C_{max} (ng/ml)	1.610±93	2.490±345	1.604±152	3.300±264	1.608±189	2777±321	2020±328	3500±226
$AUC_{0-\infty}$ (ng.ml/h)	1.675±372	2.487±665	1.006±141	3.802±766 [*]	2.447±487	4.300±803	2.064±296	4.273±609 [*]
r^2	0,997	0,998	0,995	0,995	0,997	0,996	0,993	0,993
AIC	24,8 (47,0-76,6)	76,5 (59,3-93,3)	47,8 (30,8-66,9)	52,8 (11,4-98,6)	65,1 (39,5-78,4)	65,1 (24,8-92,3)	53,0 (19,6-82,7)	63,0 (6,8-125,2)

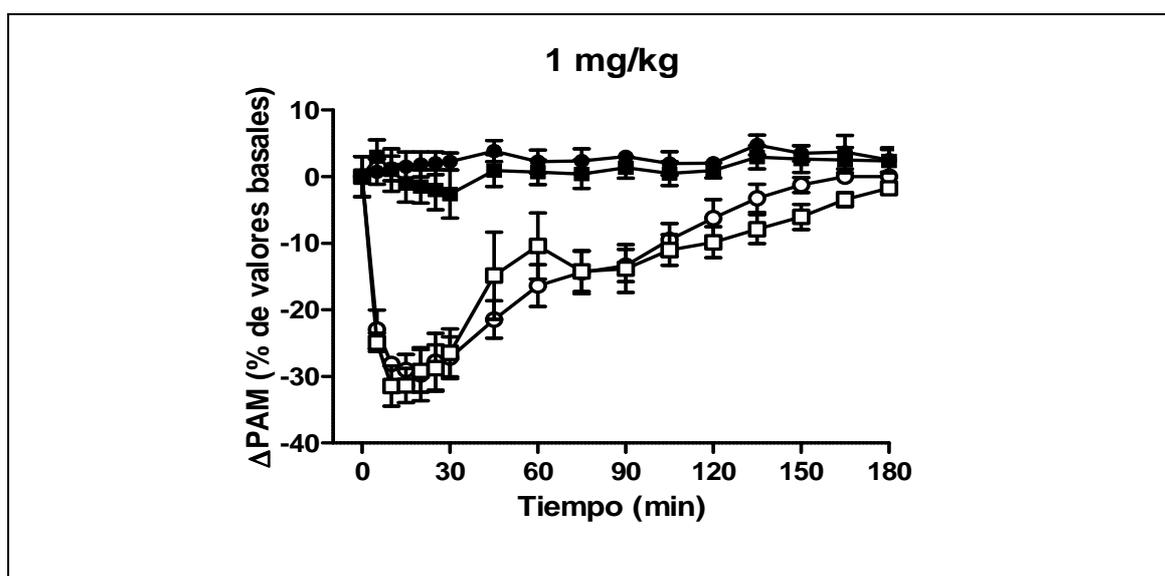
Datos expresados como media \pm EEM.

[#]p<0.05 vs 1 mg/kg; ^{*}p<0.05 vs Control; [§]p<0.05 vs R-carvedilol

Farmacodinamia del carvedilol

Efecto hipotensor

La figura 30 muestra el curso temporal de los cambios de la PAM en animales control y alimentados con fructosa después de la administración intravenosa de vehículo o carvedilol en una dosis de 1 o 3 mg/kg. La administración de vehículo no modificó la PAM en ninguno de los grupos experimentales (Figura 30). La respuesta hipotensora al carvedilol fue significativamente mayor en animales fructosa (Δ PAM: $-30,3 \pm 2,6\%$; $n=8$; $p<0,05$) en comparación con las ratas control (Δ PAM: $-19,6 \pm 1,7\%$; $n=8$) después de la administración intravenosa de carvedilol sólo en la dosis de 3 mg/kg, no hallándose diferencias significativas luego de administrar el β -bloqueante en la dosis de 1mg/kg (Figura 30).



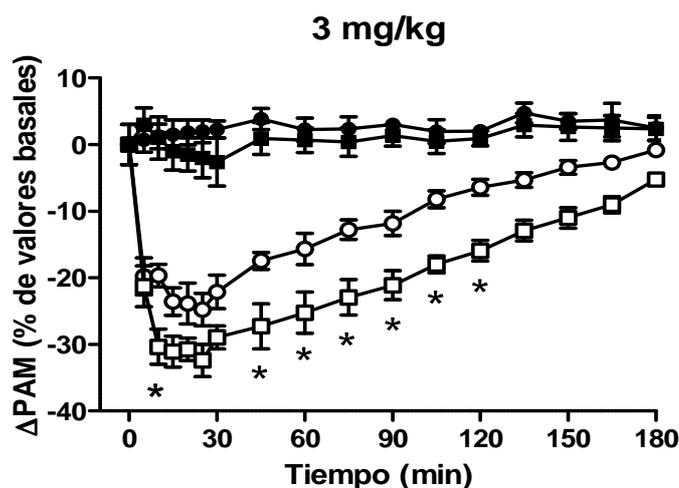


Figura 30: Evolución temporal de los cambios en la presión arterial media (Δ PAM, % de los valores basales), después de la administración intravenosa de vehículo (símbolo negro) o carvedilol (símbolo abierto) 1 mg/kg y 3 mg/kg en ratas normotensas (círculos) y en ratas fructosa (cuadrados). Cada punto muestra la media \pm EEM de ocho ratas. * $p < 0,05$ vs ratas control.

Se correlacionó el efecto hipotensor con las concentraciones de carvedilol racémico aplicando un modelo PK/PD de compartimiento de efecto con la ecuación E_{max} sigmoideal. No se encontraron diferencias en la estimación de E_{max} al comparar ambos niveles de dosis en animales normotensos e hipertensos (Tabla 15), lo que sugiere que el rango farmacodinámico completo de efecto hipotensor de carvedilol se alcanzó bajo condiciones experimentales y la ecuación E_{max} sigmoideal es adecuada para la estimación de parámetros PK/PD. La velocidad de transferencia de carvedilol desde el compartimiento central al del efecto no fue significativamente diferente en los grupos experimentales (Tabla 15). La respuesta hipotensora máxima fue significativamente mayor en las ratas alimentadas con fructosa en comparación con las ratas normotensas sólo en la dosis de 3 mg/kg. La potencia de la respuesta hipotensora al carvedilol fue similar al comparar ambos grupos experimentales con un aumento no significativo de la CE_{50} paralelo al incremento de la dosis (Tabla 15).

Tabla 15: Parámetros PK/PD para el efecto antihipertensivo de carvedilol en animales tratados con fructosa y animales control después de la administración intravenosa. CE_{50} : concentración que corresponde a la mitad de la respuesta máxima, E_{max} : respuesta máxima, γ : coeficiente de Hill, $t_{1/2eq}$: vida media de equilibrio entre el plasma y el compartimiento de efecto.

Grupo	Control		Fructosa	
	1 mg/kg (n=8)	3 mg/kg (n=8)	1 mg/kg (n=8)	3 mg/kg (n=8)
E_{max} (%)	30,6±1,5	24,5±2,1	34,7±3,9	35,0±2,8*
CE_{50} (ng/ml)	631±115	678±152	721±92	835±143
γ	2,2±0,2	2,0±0,1	2,2±0,2	2,4±0,2
$t_{1/2eq}$ (min)	5,5±1,2	4,2±1,4	5,7±1,8	7.6±1,4
r^2	0,955	0,956	0,949	0,985
AIC	61,5 (51,5- 73,2)	64,2 (60,5- 85,7)	66,6 (58,8- 105,6)	62,5 (47,1- 92,6)

Datos expresados como media \pm EEM.

* $p < 0.05$ vs ratas control

Efecto bradicardizante

La figura 31 muestra el curso temporal de los cambios de FC en animales control y con sobrecarga de fructosa después de la administración intravenosa de vehículo o carvedilol en una dosis de 1 o 3 mg/kg. La administración del vehículo no modificó la FC en ninguno de los grupos experimentales (Figura 31). La respuesta cronotrópica al carvedilol no fue significativamente diferente comparando animales fructosa (1mg/kg: % de reducción: -20,4±3,2%; n=8; 3 mg/kg: % de reducción: -30,4±3,7%; n=8) con los controles (1mg/kg: % de reducción: -18,9±2,3%; n=8; 3 mg/kg: % de reducción: -24,8±1,5%; n= 8).

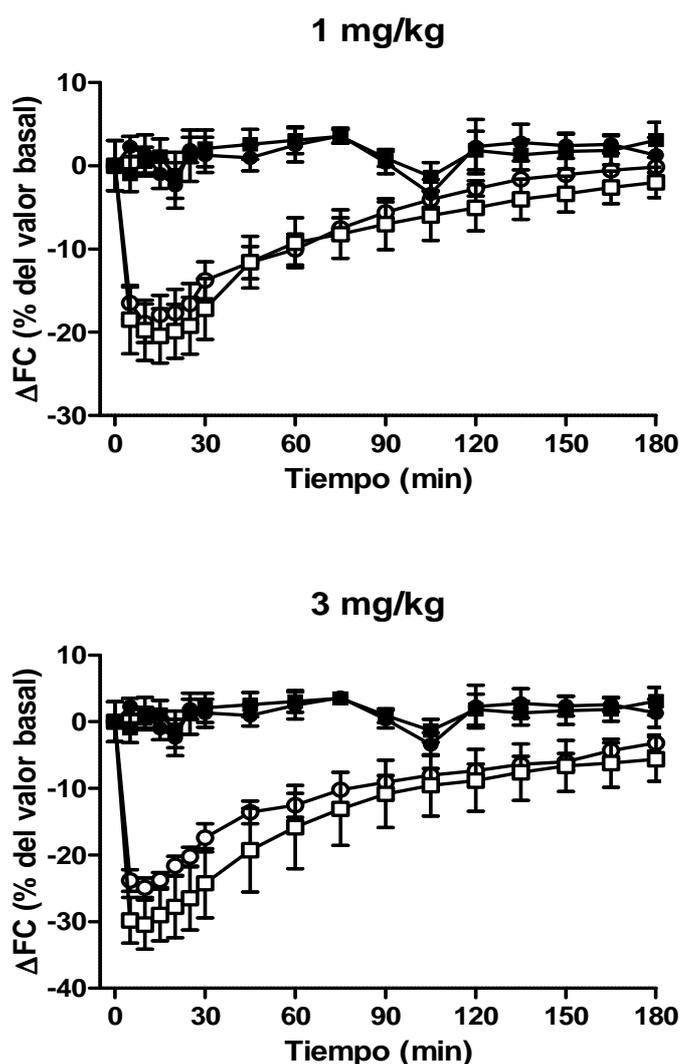


Figura 31: Evolución temporal de los cambios en la frecuencia cardíaca (ΔFC , % de los valores basales), después de la administración intravenosa de vehículo (símbolo negro) o carvedilol (símbolo abierto) en dosis de 1 mg/kg o 3 mg/kg en ratas normotensas (círculos) y ratas fructosa (cuadrados). Cada punto muestra la media \pm EEM de ocho ratas.

Para el análisis PK/PD se correlacionó el efecto bradicardizante con las concentraciones de S-carvedilol, a través de un modelo PK/PD de compartimiento de efecto con la ecuación E_{max} sigmoideal. No se encontraron diferencias en la estimación de E_{max} al comparar ambos niveles de dosis en animales normotensos e hipertensos (Tabla 16), lo que sugiere que se alcanzó el rango farmacodinámico completo del efecto bradicardizante de carvedilol bajo condiciones experimentales y la ecuación E_{max} sigmoideal es adecuada para la estimación de parámetros PK/PD. La respuesta

cronotrópica máxima y la potencia de S-carvedilol fueron similares comparando las ratas alimentadas con fructosa y ratas control (Tabla 16).

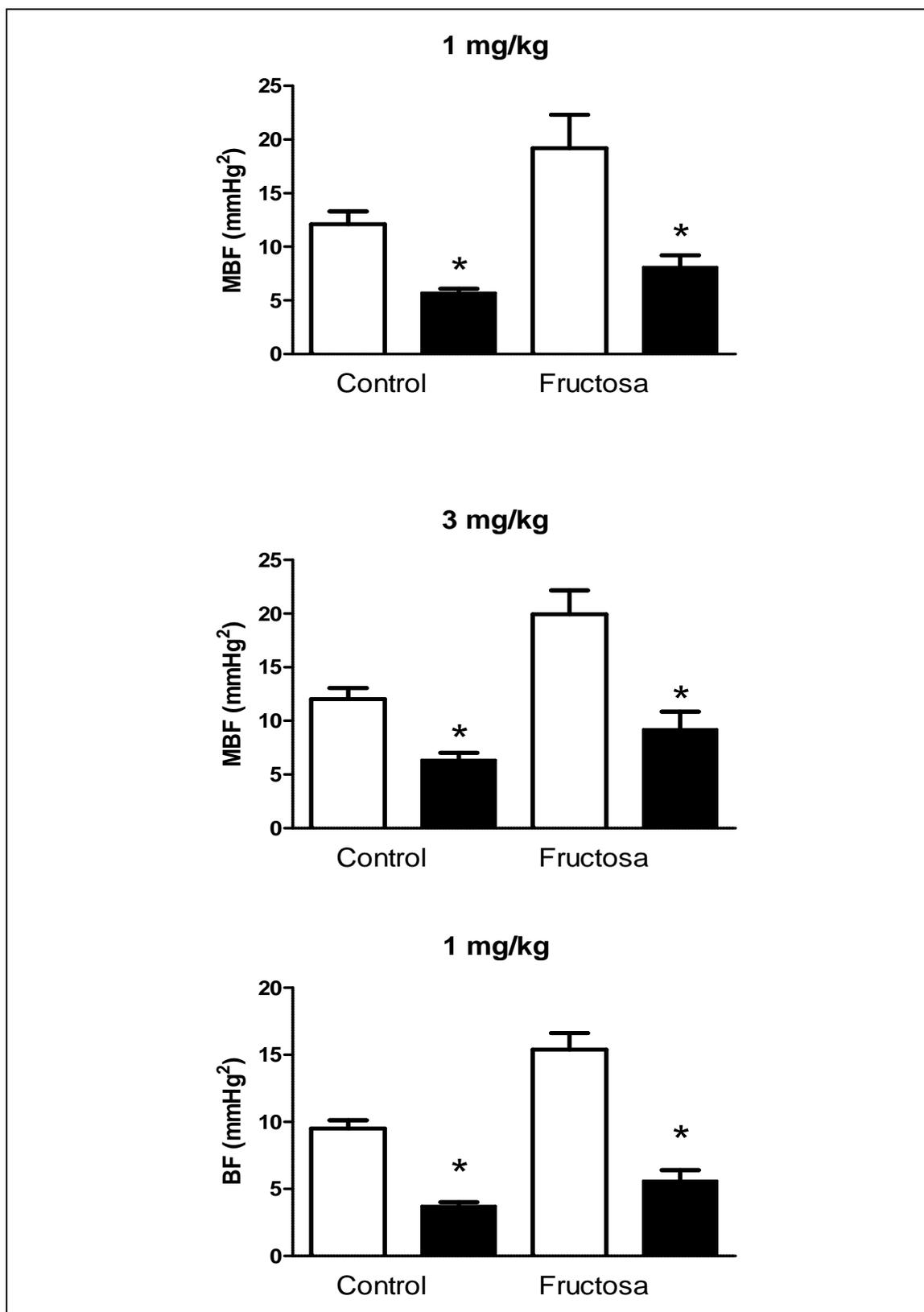
Tabla 16: Parámetros PK/PD para el efecto cronotrópico de carvedilol en animales tratados con fructosa y animales control después de la administración intravenosa en dosis de 1 mg/kg o 3 mg/kg. CE_{50} : Concentración que corresponde a la mitad de la respuesta máxima, E_{max} : respuesta máxima, γ : coeficiente de Hill, $t_{1/2eq}$: vida media de equilibrio entre el plasma y el compartimiento de efecto.

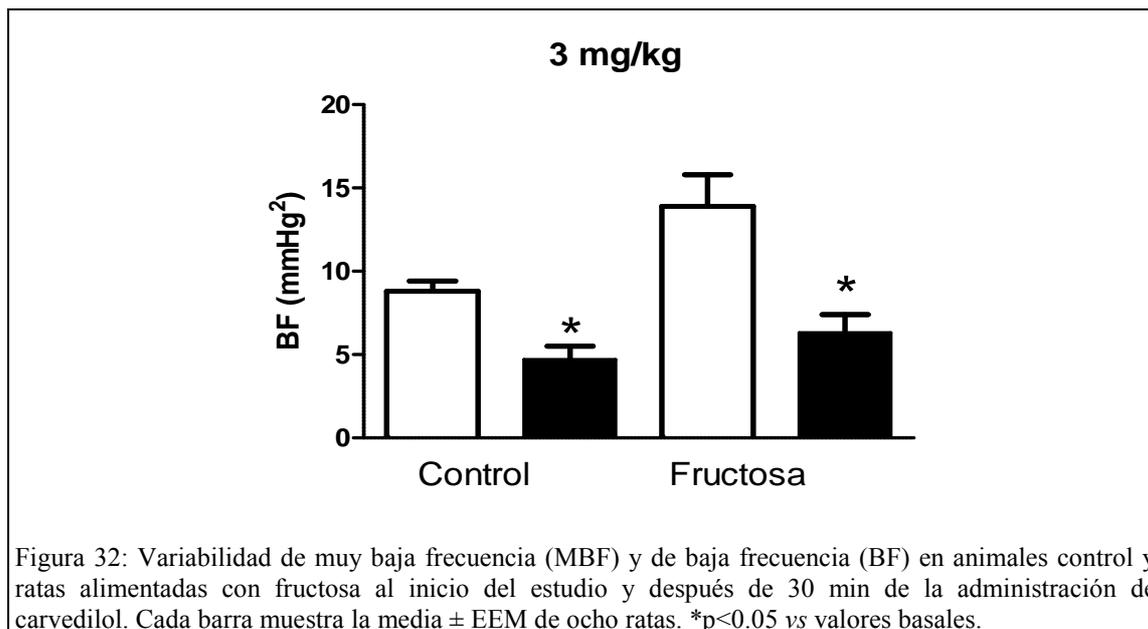
Grupo	Control		Fructosa	
	1 mg/kg (n=8)	3 mg/kg (n=8)	1 mg/kg (n=8)	3 mg/kg (n=8)
E_{max} (%)	20,5±2,5	26,5±2,5	22,4±3,4	31,1±3,6
CE_{50} (ng/ml)	630±110	670±150	720±90	840±150
γ	2,3±0,2	2,0±0,1	2,2±0,3	2,4±0,2
$t_{1/2eq}$ (min)	5,2±1,5	3,2±1,0	4,5±1,2	2,1±0,8
r^2	0,957	0,938	0,905	0,945
AIC	62,9 (52,8- 76,7)	74,9 (62,5- 89,7)	76,6 (55,8- 125,8)	68,5 (47,1- 93,4)

Datos expresados como media \pm EEM.

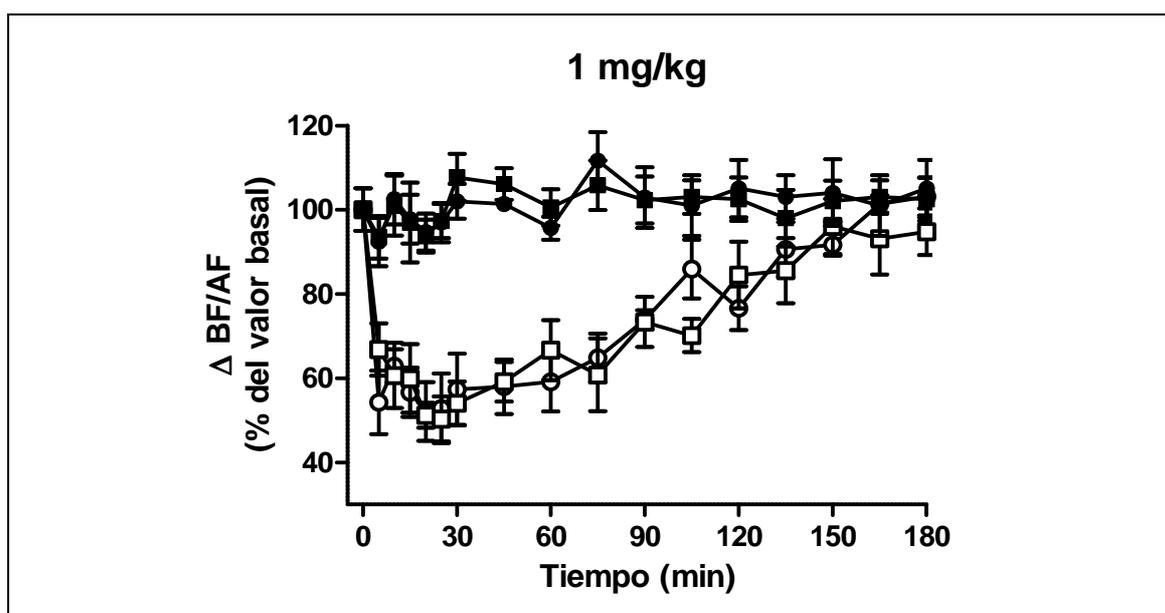
Efecto sobre la variabilidad de la presión arterial latido-a-latido

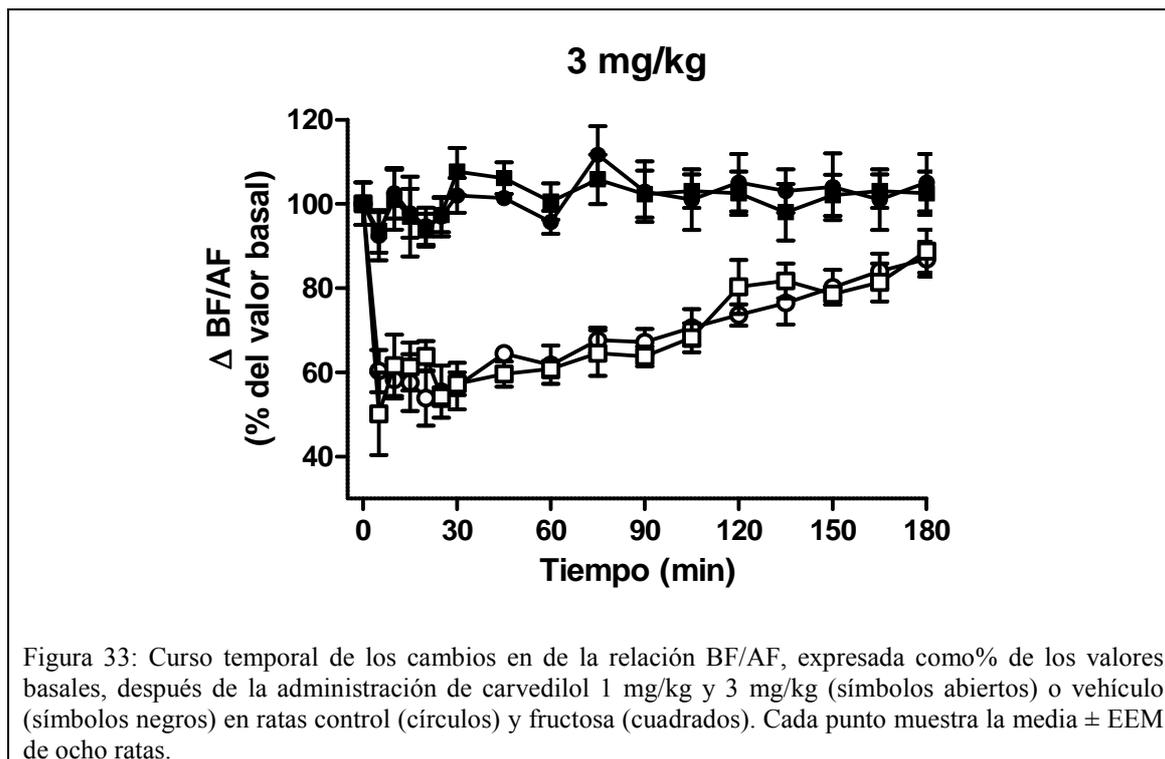
La administración de carvedilol redujo significativamente la VPA en el dominio MBF y BF en ambos grupos experimentales (Figura 32) sin afectar la variabilidad de AF. No se hallaron diferencias significativas entre los grupos experimentales. La administración de vehículo no modificó la VPA en ninguno de los grupos.





La figura 33 muestra el curso temporal de la relación BF/AF después de la administración de vehículo o carvedilol en una dosis de 1 o 3 mg/kg en ratas control e hipertensas por sobrecarga de fructosa. Mientras que la administración del vehículo no modificó la relación BF/AF (Figura 33), la administración de carvedilol indujo una reducción similar de este parámetro en ambos grupos experimentales (Figura 33).





Para el análisis PK/PD se correlacionó el efecto sobre la actividad simpática vascular con las concentraciones de carvedilol racémico a través de un modelo PK/PD de inhibición de respuesta fisiológica indirecta. No se encontraron diferencias en K_{in} y en la estimación de CI_{50} comparando ratas control y fructosa. La estimación de los parámetros de PK/PD para el efecto de carvedilol en el tono vascular simpático no cambió con el incremento de la dosis en ninguno de los grupos experimentales. (Tabla 17).

Tabla 17: Parámetros PK/PD para la actividad simpática vascular de carvedilol en animales control y con sobrecarga de fructosa después de la administración intravenosa en dosis de 1 mg/kg o 3 mg/kg. CI_{50} : Concentración que corresponde a la mitad de la respuesta inhibitoria máxima, K_{in} : constante de producción de la respuesta.

Grupo	Control		Fructosa	
	Dosis 1 mg/kg (n=8)	3 mg/kg (n=8)	1 mg/kg (n=8)	3 mg/kg (n=8)
K_{in} (min^{-1})	32,4±7,8	28,9±5,6	22,5±6,9	22,7±4,2
CI_{50} (ng/ml)	1.128±166	1.304±109	1.295±116	1.506±198
r^2	0,912	0,905	0,902	0,907
AIC	87,4 (77,7-90,4)	67,1 (55,2-80,9)	85,9 (74,2-90,8)	65,7 (25,5-94,9)

Datos expresados como media ± EEM.

Farmacocinética del nebivolol

La figura 34 muestra el curso temporal de las concentraciones plasmáticas del *l*-nebivolol y *d*-nebivolol en ratas control y alimentadas con fructosa después de la administración intravenosa del β -bloqueante. Una disminución biexponencial de los niveles plasmáticos compatible con un modelo de dos compartimentos farmacocinéticos se encontró en todos los experimentos después de la administración de nebivolol en dosis de 3 o 10 mg/kg. Los parámetros farmacocinéticos resultantes se muestran en la tabla 18. No se encontraron diferencias significativas en el Vd_{ss} ni en la constante α cuando se compararon las ratas fructosa con el grupo control. Luego de la administración de la dosis más alta, el Cl de ambos enantiómeros fue significativamente menor en las ratas alimentadas con fructosa con respecto a los animales control (Tabla 18). En consecuencia, estos resultados impactaron directamente en la constante β , siendo la misma significativamente menor para ambos enantiómeros en el grupo fructosa en comparación con los animales control después de la aplicación de la dosis de 10 mg/kg. El nebivolol mostró una farmacocinética enantioselectiva teniendo en cuenta que el Cl y el Vd_{ss} del *l*-nebivolol fueron significativamente mayor en comparación con *d*-nebivolol en ambos grupos experimentales. Por ello, el AUC y la $C_{m\acute{a}x}$ del *d*-nebivolol fueron mayores a las del *l*-nebivolol (Tabla 18).

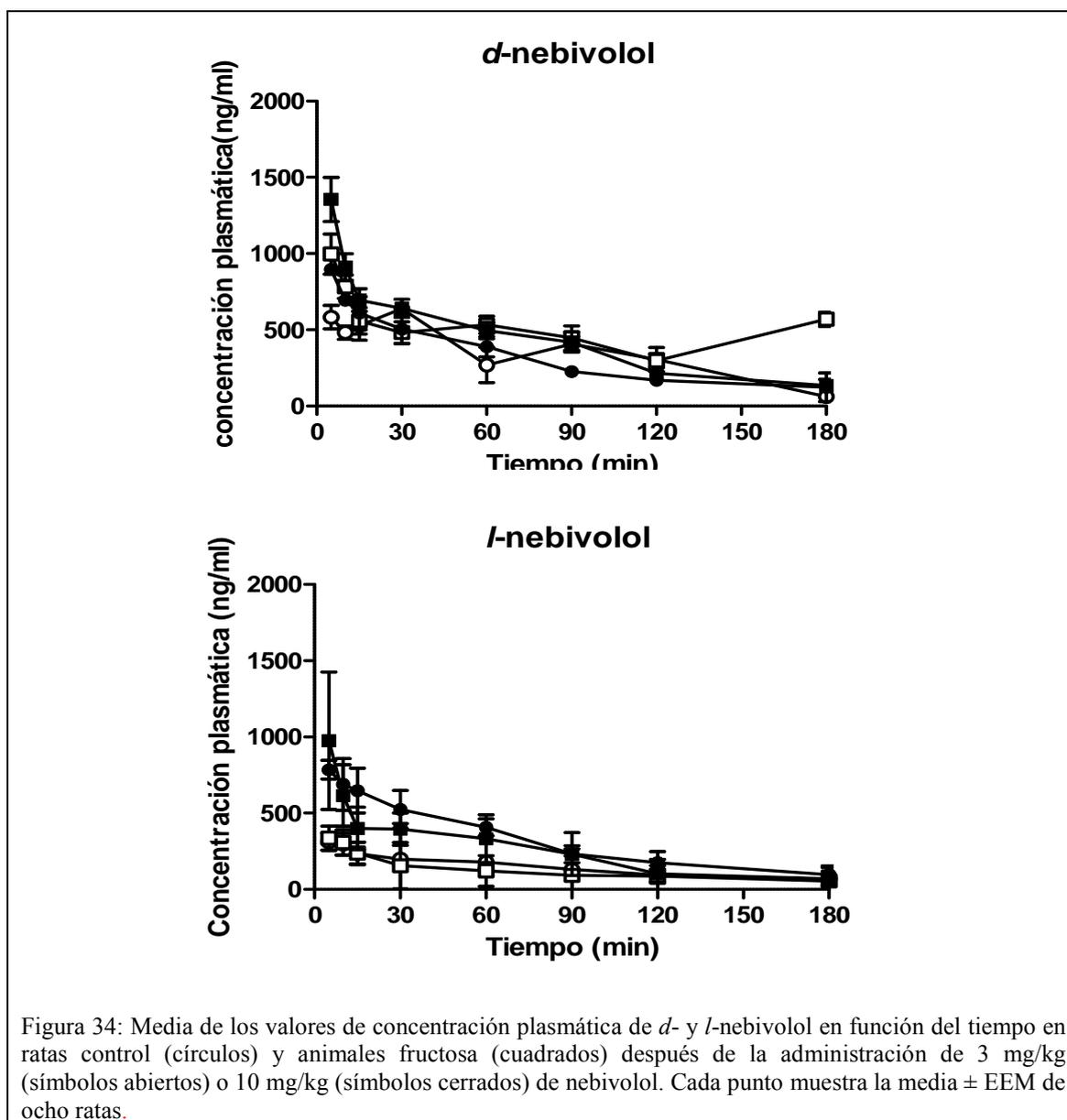


Tabla 18: Parámetros farmacocinéticos de l-nebivolol y d- nebivolol obtenidos a partir de muestras de sangre arterial: ABC (área bajo la curva), α (constante de distribución), β (constante de eliminación), Cl (aclaramiento), Vdss (volumen de distribución en equilibrio), Cmax (concentración máxima extrapolada) en animales control y alimentados con fructosa después de la administración intravenosa del fármaco (3 mg/kg y 10 mg/kg).

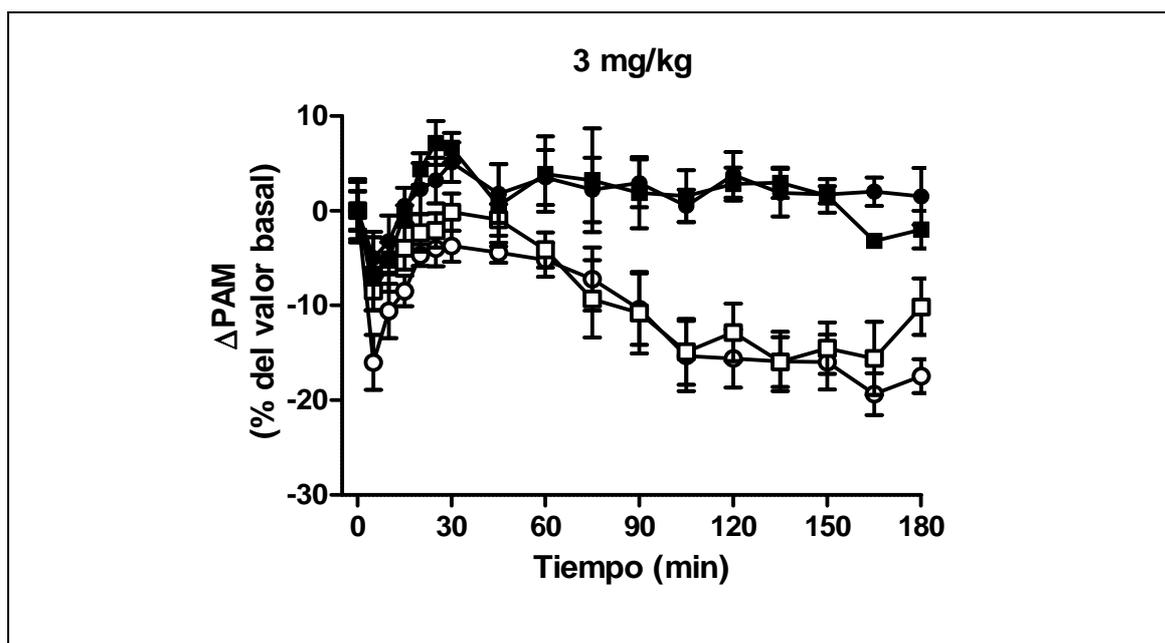
Enantiómero	<i>d</i> -nebivolol				<i>l</i> -nebivolol			
	Control (n=16)		Fructosa (n=16)		Control (n=16)		Fructosa (n=16)	
Grupo								
Dosis	3 mg/kg	10mg/kg	3 mg/kg	10mg/kg	3 mg/kg	10mg/Kg	3 mg/kg	10mg/kg
α (h ⁻¹)	10,1±2,7	10,6±0,4	11,8±0,9	9,9±1,5	13,9±0,8	14,0±1,7	13,4±1,5	12,8±1,3
β (h ⁻¹)	0,94±0,20	0,54±0,13	0,79±0,12	0,29±0,05*	0,80±0,13	1,00±0,16	1,04±0,24	0,48±0,11*
Vd _{ss} (l)	1,9±0,3	6,5±0,8 [#]	1,8±0,3	9,6±2,0 [#]	5,7±1,1 [§]	9,4±0,9 ^{#§}	5,2.±1,3 [§]	13,3±2,1 ^{#§}
Cl (ml/min)	33,1±9,2	64,2±10,1 [#]	19,1±2,8	38,3±13,6 ^{#*}	80,7±5,9 [§]	170±27,2 ^{#§}	86,4±8,8 [§]	127,8±39,3 ^{#§*}
C _{max} (ng/ml)	1.356±198	1.736±43 [#]	1.340±185	2.078±813 [#]	611±49 [§]	860±109 ^{#§}	1.169±88 [§]	1.158±352 ^{#§}
AUC _{0-∞} (ng.ml/h)	728±122	1.383±112 [#]	1.456±345	2.468±758 [#]	515±49 [§]	913±71 ^{#§}	303±40 [§]	1.394±663 ^{#§}
r ²	0.997	0.999	0.996	0.996	0.998	0.996	0.998	0.992
AIC	39,9 (22,6-44,7)	37,7 (24,6-48,6)	43,8 (28,9-51,8)	59,9 (46,8-81,6)	35,8 (33,2-59,0)	44,7 (21,0-46,8)	34,8 (32,6-44,5)	58,5 (31,6-78,2)

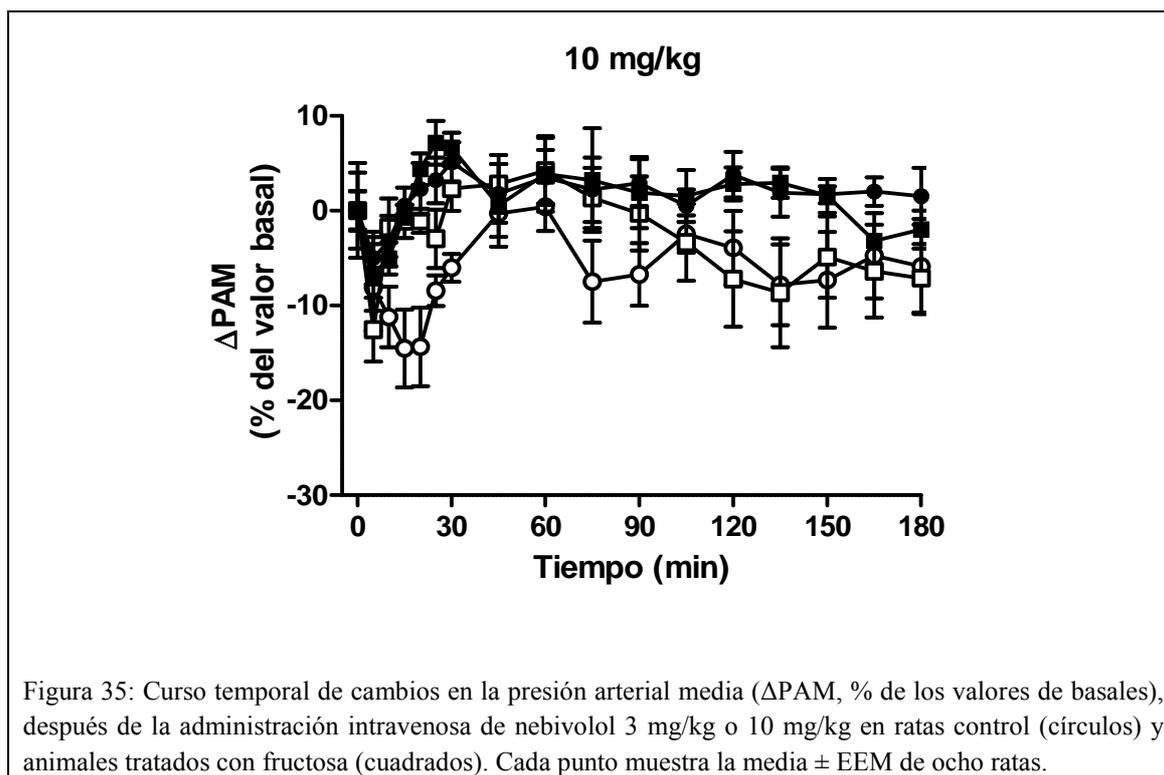
Los datos se expresan como media ± EEM. [#]p <0,05 vs 3 mg/kg; *p <0,05 vs ratas control; §p <0.05 vs *d*-nebivolol.

Farmacodinamia del nebivolol

Efecto hipotensor

La figura 35 muestra la respuesta hipotensora del nebivolol en una dosis de 3 o 10 mg/kg en animales hipertensos por sobrecarga de fructosa y en ratas control. No se encontraron diferencias en la PAM entre ambos grupos experimentales después de la administración del vehículo. Tampoco se hallaron diferencias significativas en el efecto hipotensor del nebivolol entre los grupos (Figura 35). La PAM no volvió a los valores basales en ambos grupos a lo largo del experimento lo que demuestra la existencia de una extensa respuesta antihipertensiva del nebivolol administrado de manera intravenosa.





Efecto bradicardizante

La figura 36 muestra el curso temporal de los cambios en la FC en ratas control y fructosa después de la administración intravenosa del vehículo o de nebivolol en una dosis de 3 o 10 mg/kg. La administración del vehículo no modificó la FC en ninguno de los grupos experimentales. El nebivolol indujo una reducción de la FC dependiente de la dosis en ambos grupos experimentales con recuperación parcial de los valores basales. Se observó, además, una menor eficacia en el efecto bradicardizante en animales fructosa comparado con los animales control.

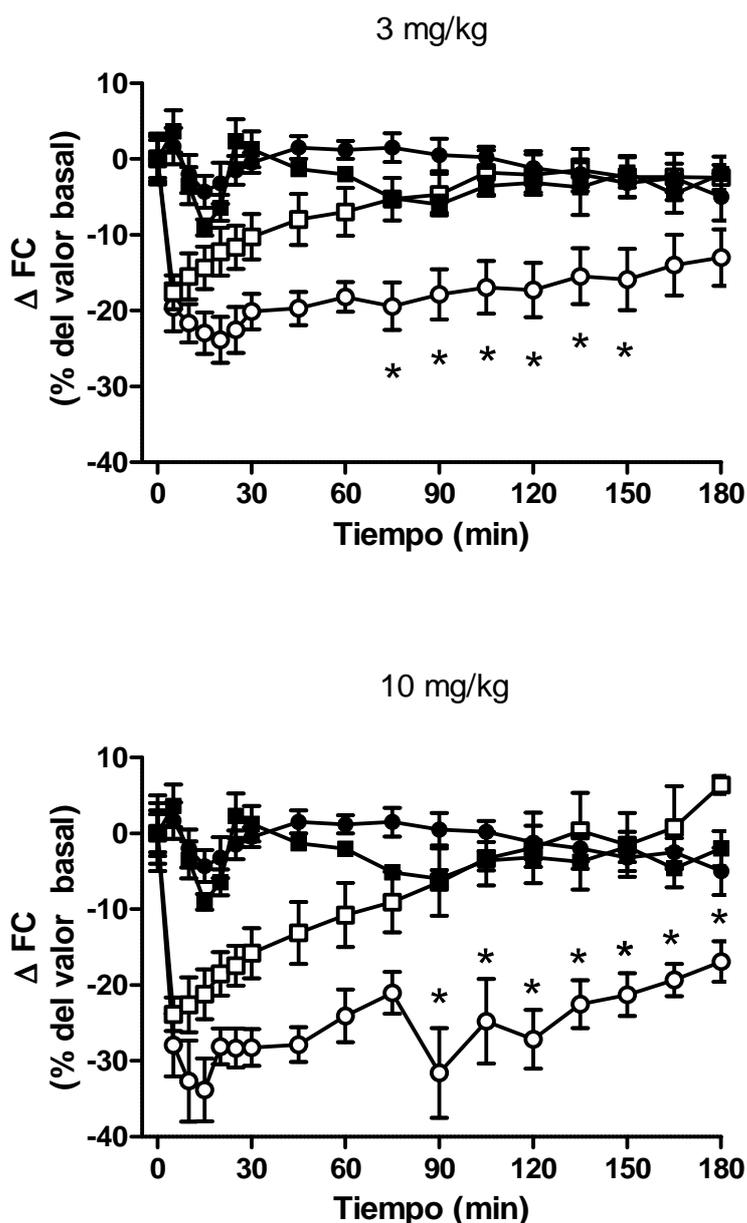


Figura 36: Evolución temporal de los cambios en la frecuencia cardíaca (ΔFC % de los valores basales), después de la administración de nebivolol 3 y 10 mg/kg en ratas control (círculos) y animales tratados con fructosa (cuadrados). Cada punto muestra la media \pm EEM de ocho ratas. * $p < 0,05$ vs ratas fructosa.

Efectos sobre la variabilidad de la presión arterial de corto plazo

La administración intravenosa del nebivolol redujo sensiblemente la VPA de corto plazo tanto en animales control como en las ratas con sobrecarga de fructosa; esto se observa claramente en la reducción sostenida del DE de la presión arterial después de la

administración de ambas dosis del β -bloqueante (Figura 37). No se encontraron diferencias en la magnitud de la atenuación al comparar los dos grupos en la dosis de 3 mg/kg. Sin embargo, aparecen diferencias significativas al comparar el descenso del DE en la dosis de 10 mg/kg, exhibiendo las ratas con sobrecarga de fructosa una mayor disminución de la VPA de corto plazo. Además, el aumento de la dosis de nebivolol de 3 mg/kg a 10 mg/kg produjo una mayor reducción en los animales alimentados fructosa, lo que sugiere la presencia de una relación concentración-respuesta para los efectos de nebivolol en la reducción de la VPA de corto plazo en este grupo experimental.

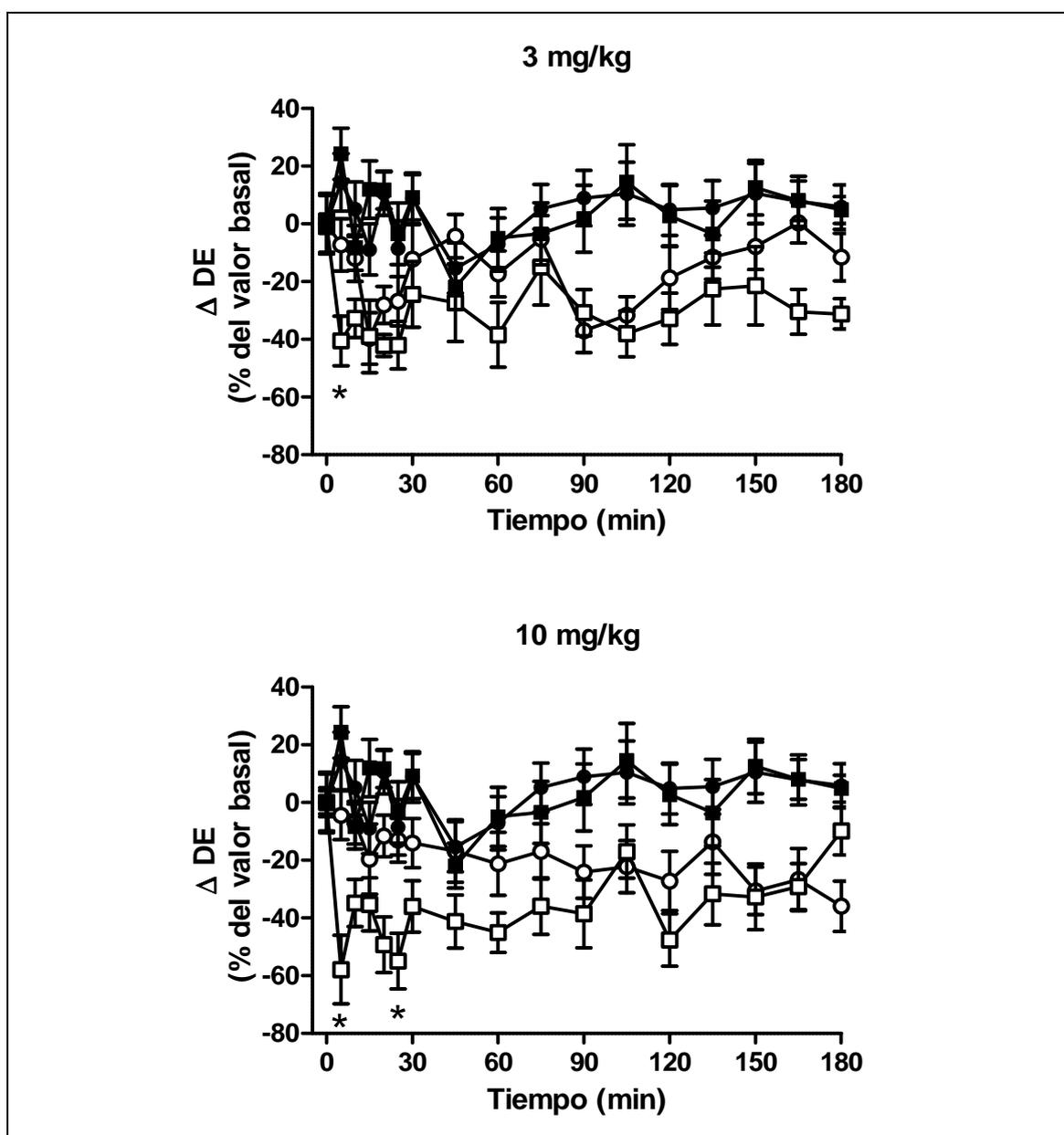
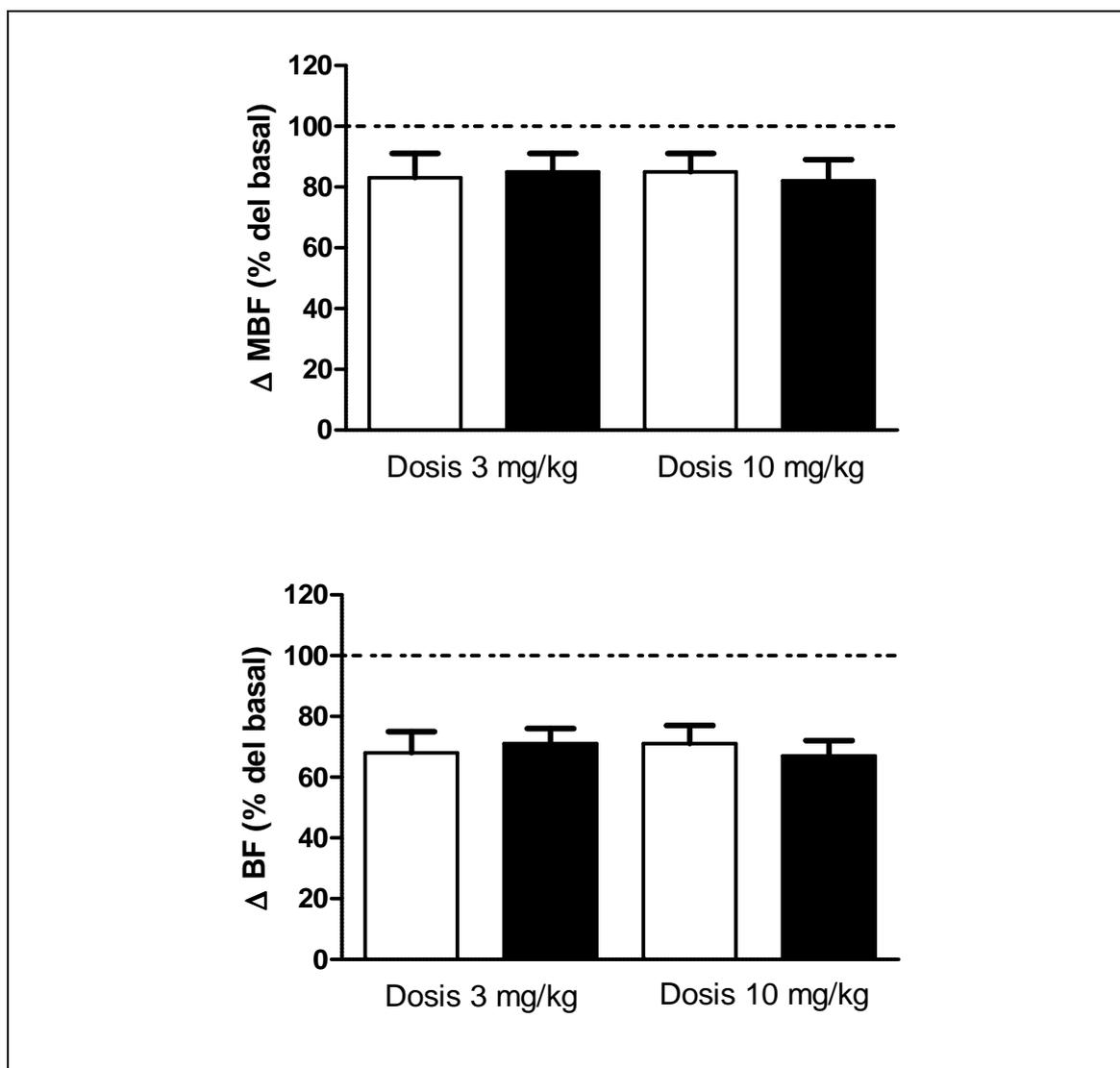


Figura 37: Cambio en la variabilidad de la presión arterial de corto plazo (Δ DE, % del valor basal) después de la administración de nebivolol en dosis de 3 mg/kg y 10 mg/kg en ratas normotensas control (círculos) y los animales fructosa (cuadrados). Cada punto muestra la media \pm EEM de ocho ratas. * $p < 0,05$ vs ratas control.

Efectos sobre la variabilidad de la presión arterial latido-a-latido

La VPA latido-a-latido también se redujo por la administración de nebivolol en ambos grupos experimentales en los tres dominios de frecuencia. La figura 38 muestra la atenuación en los dominios de AF, BF y MBF entre los dos grupos experimentales tras la administración del fármaco, no habiéndose encontrado diferencias significativas en la reducción de dichos dominios en las dosis estudiadas.



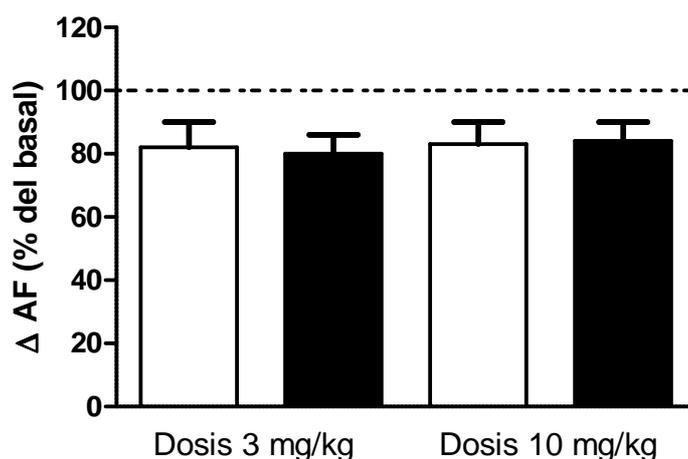
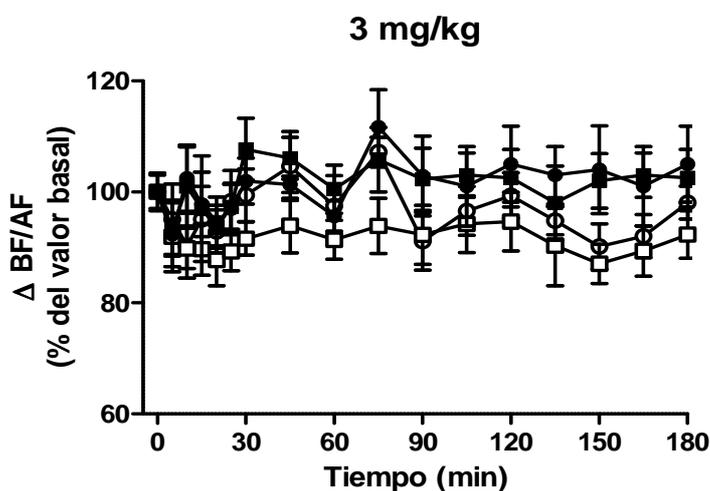


Figura 38: Dosis-respuesta de la VPA de muy baja frecuencia (MBF), de baja frecuencia (BF) y alta frecuencia (AF), expresado como % de los valores de línea de base en ratas control (blanco) y animales tratados con fructosa (negro) después de administración de nebivolol a dosis de 3 mg/kg y 10 mg/kg. Cada barra muestra la media \pm EEM de ocho ratas.

Sin embargo, no se encontró una reducción significativa en el cociente BF/AF en ninguno de los dos grupos experimentales, tanto en una como en otra dosis (Figura 39).



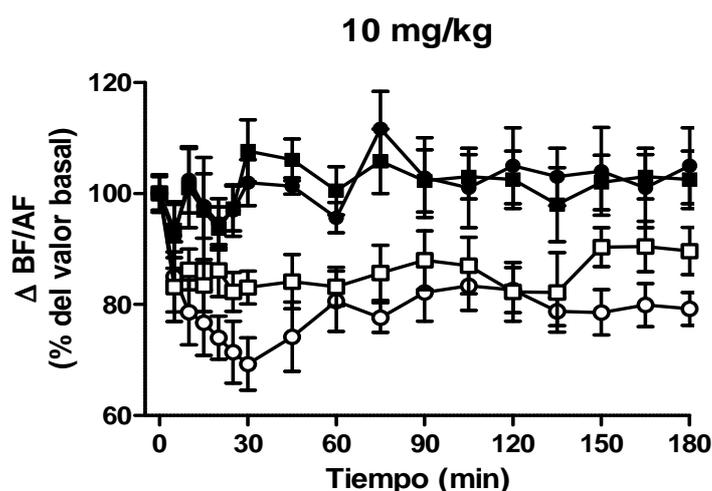


Figura 39: Evolución temporal de los cambios en la del cociente BF/AF, expresado en % de los valores basales, después de la administración de nebivolol 3 mg/kg y 10 mg/kg en animales control (círculos) y tratados con fructosa cuadrados. Cada punto muestra la media \pm EEM de ocho ratas.

Comparación de la respuesta cardiovascular de carvedilol y atenolol

Además de la evaluación extensa de las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de carvedilol, otro objetivo de este trabajo fue la comparación de la respuesta cardiovascular entre el bloqueante de tercera generación y el bloqueante cardiosselectivo atenolol en los tres modelos de hipertensión experimental.

Animales L-NAME

En el modelo de hipertensión por ingesta de L-NAME, la respuesta hipotensora de carvedilol 1 o 5 mg/kg fue marcadamente superior en comparación con la administración de atenolol 10 mg/kg (Figura 40). En cambio, la respuesta bradicardizante de carvedilol 1 o 5 mg/kg no fue estadísticamente diferente de la observada luego de la aplicación intravenosa de atenolol (Figura 41).

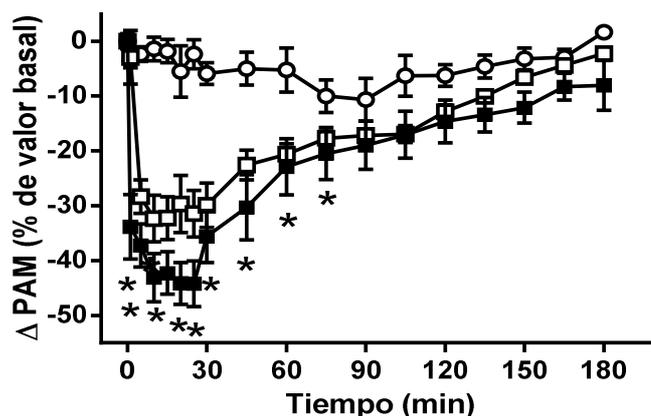


Figura 40: Evolución temporal de los cambios en la PAM (Δ PAM,% de los valores basales), después de la administración intravenosa de atenolol 10 mg/kg (círculos blancos), carvedilol 1 mg/kg (cuadrados blancos) o carvedilol 5 mg/kg (cuadrados negros) en ratas hipertensas L-NAME. Cada punto muestra la media \pm EEM de ocho ratas. * $p < 0,05$ vs atenolol.

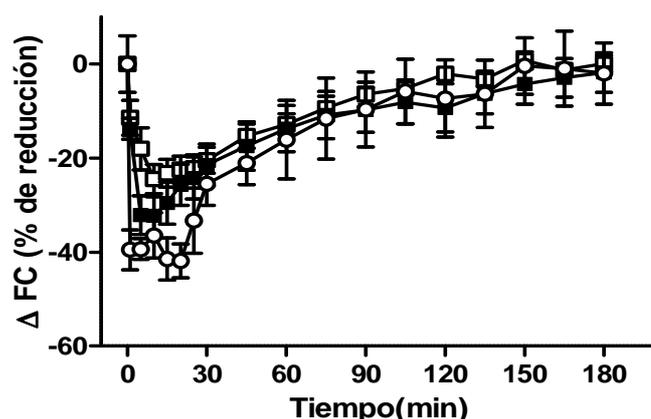


Figura 41: Evolución temporal de los cambios en la frecuencia cardíaca (Δ FC, % de los valores basales), después de la administración intravenosa de atenolol 10 mg/kg (círculos blancos), carvedilol 1 mg/kg (cuadrados blancos) o carvedilol 5 mg/kg (cuadrados negros) en ratas L-NAME. Cada punto muestra la media \pm EEM de ocho ratas.

En términos de reducción de la VPA de corto plazo, si bien tanto atenolol como carvedilol redujeron el DE del registro de presión arterial, la disminución de este parámetro de la VPA fue significativamente superior con carvedilol, en ambas dosis, respecto de atenolol 10 mg/kg (Figura 42). El análisis del curso temporal del cambio de la relación BF/AF evidenció además que la administración intravenosa de atenolol 10

mg/kg no modifica este parámetro; en cambio, carvedilol 1 o 5 mg/kg redujo la razón BF/AF respecto de los valores iniciales y de la respuesta del atenolol (Figura 43).

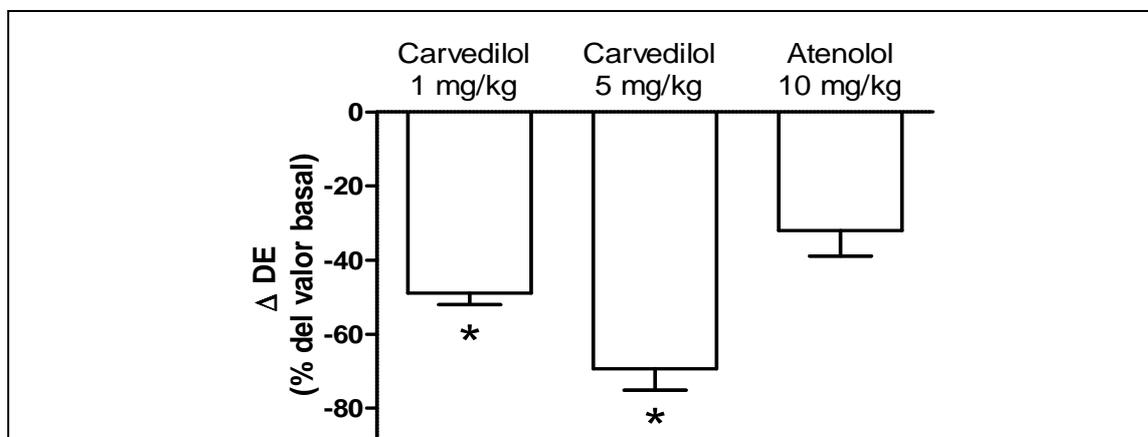


Figura 42: Cambio en la variabilidad de la presión arterial de corto plazo (Δ DE, % del valor basal) después de la administración de carvedilol en dosis de 1 mg/kg y 5 mg/kg y atenolol en dosis de 10 mg/kg en ratas L-NAME. * $p < 0,05$ vs atenolol. Cada barra muestra la media \pm EEM de ocho ratas.

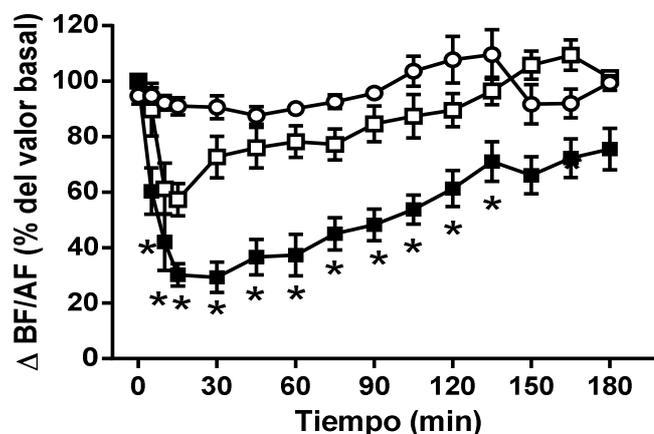


Figura 43: Evolución temporal de los cambios del cociente BF/AF, expresado en % de los valores basales, después de la administración de Carvedilol 1 mg/kg (cuadrado blanco) y 5 mg/kg (cuadrado negro) y Atenolol 10 mg/kg (círculo blanco) en animales L-NAME. Cada punto muestra la media \pm EEM de ocho ratas. * $p < 0,05$ vs atenolol.

Animales SH

En el modelo de hipertensión genética, la respuesta hipotensora de carvedilol 1 o 5 mg/kg fue también superior en comparación con la administración de atenolol 10 mg/kg (Figura 44). En cambio, tal como sucedió con el grupo L-NAME, la respuesta bradicardizante de carvedilol 1 o 5 mg/kg no fue estadísticamente diferente de la observada luego de la aplicación intravenosa de atenolol (Figura 45).

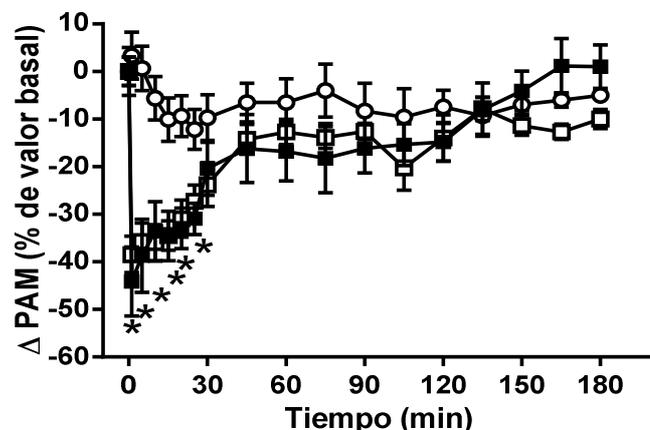


Figura 44: Evolución temporal de los cambios en la PAM (Δ PAM, % de los valores basales), después de la administración intravenosa de atenolol en dosis de 10 mg/kg en ratas hipertensas SH (círculos blancos) y de carvedilol 1 mg/kg (cuadrados blancos) y 5 mg/kg (cuadrados negros). Cada punto muestra la media \pm EEM de ocho ratas. * $p < 0,05$ vs atenolol.

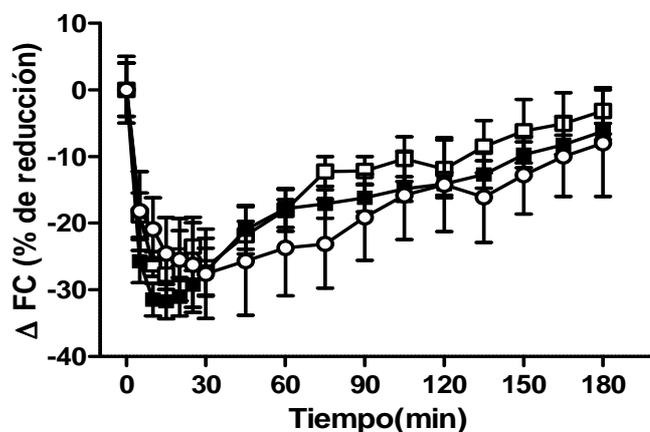
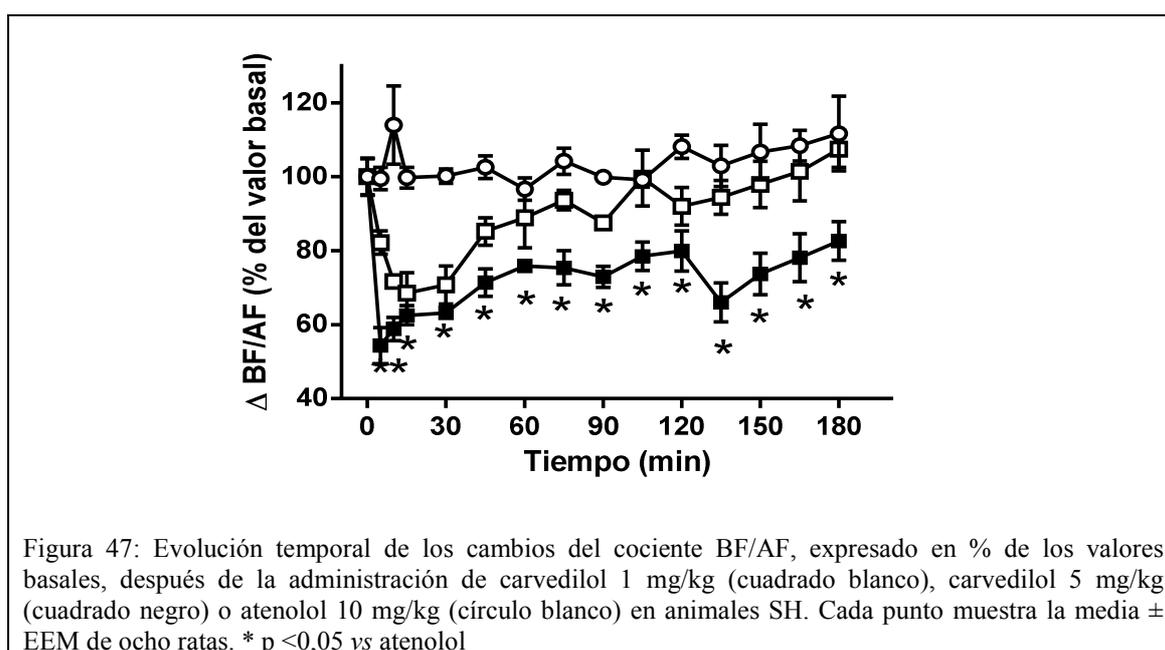
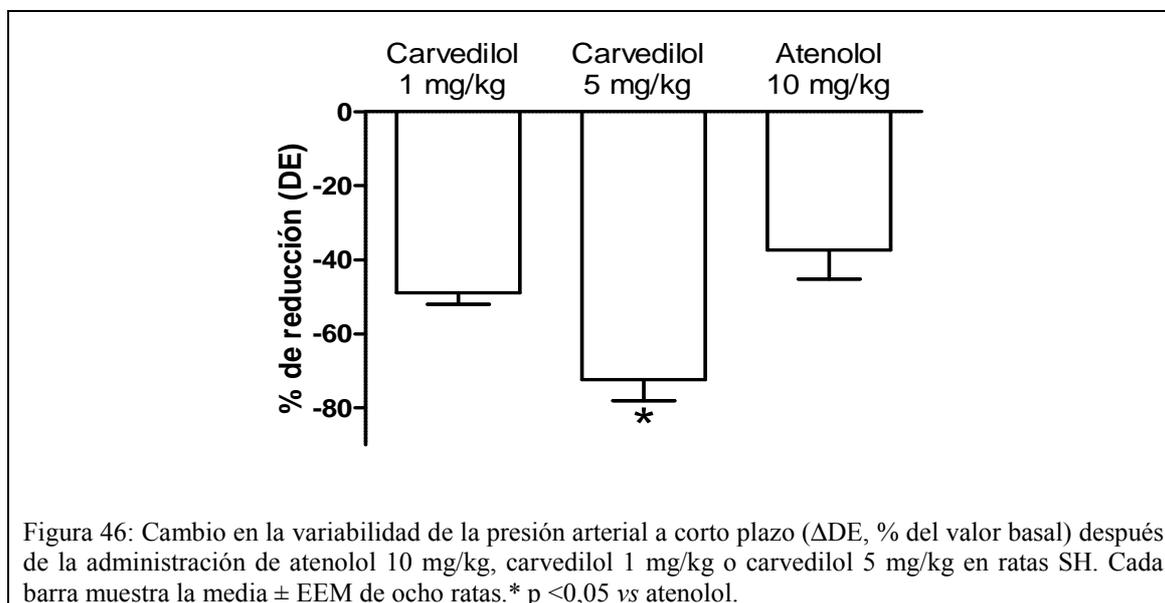


Figura 45: Evolución temporal de los cambios en la frecuencia cardíaca (Δ FC, % de los valores basales), después de la administración intravenosa de atenolol (círculos) en dosis de 10 mg/kg en animales SH y de carvedilol 1 mg/kg (cuadrados blancos) y 5 mg/kg (cuadrados negros). Cada punto muestra la media \pm EEM de ocho ratas.

En cuanto a la comparación en la reducción de la VPA de corto plazo, tanto atenolol como carvedilol redujeron el DE del registro de presión arterial, encontrándose diferencias significativas solamente en la dosis más alta de carvedilol respecto de atenolol 10 mg/kg (Figura 46). El análisis del curso temporal del cambio de la razón BF/AF evidenció que la administración intravenosa de atenolol 10 mg/kg no modifica

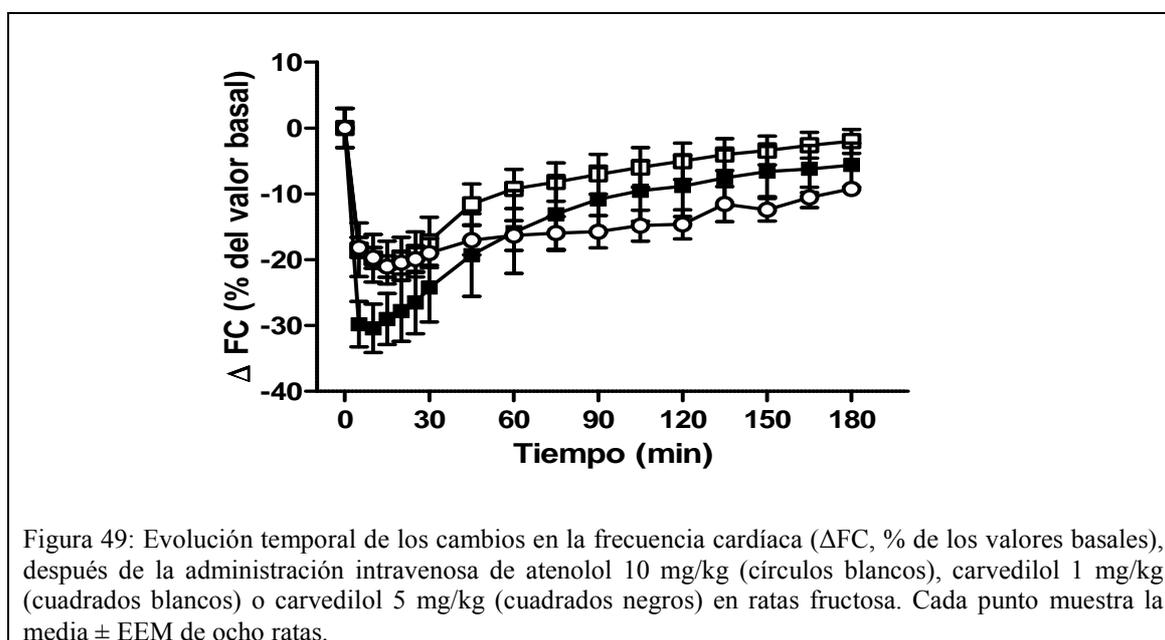
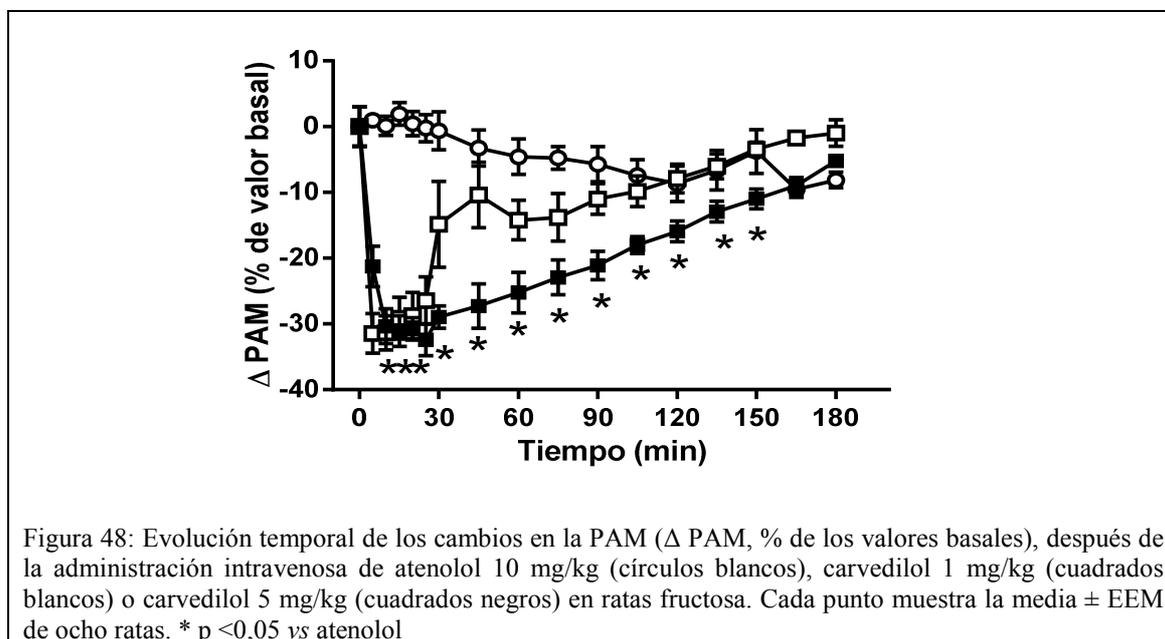
este parámetro; en cambio, al igual que en el grupo L-NAME, carvedilol 1 o 5 mg/kg redujo la razón BF/AF respecto de los valores iniciales (Figura 47).



Animales Fructosa

Para el caso de los animales alimentados con fructosa, la respuesta hipotensora de carvedilol 1 o 5 mg/kg fue superior en comparación con la administración de atenolol

10 mg/kg (Figura 48). En cambio, no se hallaron diferencias en la respuesta bradicardizante entre carvedilol 1 o 5 mg/kg y atenolol (Figura 49).



Al analizar el curso temporal del cambio de la razón BF/AF se evidenció que el carvedilol tanto en la dosis de 1 mg/kg como en la de 5 mg/kg reduce significativamente este parámetro; por el contrario, el atenolol no produce cambio alguno en la razón BF/AF (Figura 50).

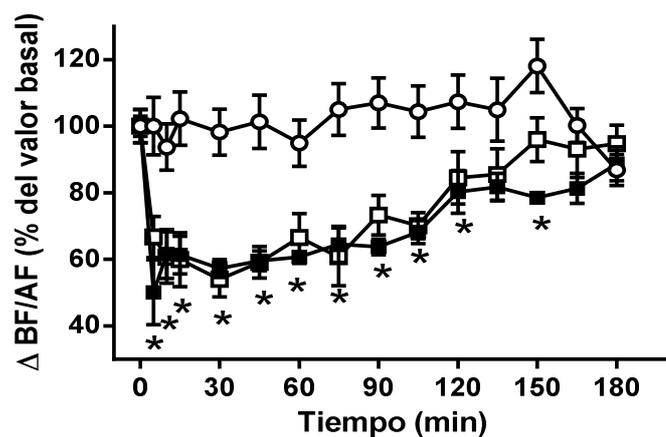


Figura 50: Evolución temporal de los cambios del cociente BF/AF, expresado en % de los valores basales, después de la administración intravenosa de atenolol 10 mg/kg (círculos blancos), carvedilol 1 mg/kg (cuadrados blancos) o carvedilol 5 mg/kg (cuadrados negros) en ratas fructosa. Cada punto muestra la media \pm EEM de ocho ratas. * $p < 0,05$ vs atenolol

Comparación de la respuesta cardiovascular de nebivolol y atenolol

Además de la descripción de la farmacocinética enantioselectiva y de la farmacodinamia de nebivolol, este trabajo se enfocó en la comparación de la respuesta cardiovascular entre este bloqueante β -adrenérgico vasodilatador y el bloqueante cardiosselectivo atenolol en los tres modelos de hipertensión experimental.

Animales L-NAME

En el modelo de hipertensión por ingesta de L-NAME, la respuesta hipotensora de nebivolol 3 o 10 mg/kg mostró una respuesta hipotensora superior a la inducida por atenolol 10 mg/kg (Figura 51), tanto en los primeros 30 minutos como luego de 150 minutos (Figura 51). En cambio, la respuesta bradicardizante de nebivolol 3 o 10 mg/kg fue estadísticamente inferior a la registrada luego de la aplicación intravenosa de atenolol (Figura 52).

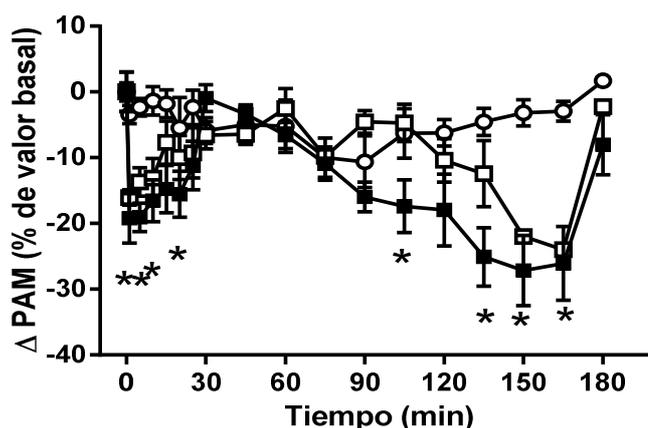


Figura 51: Evolución temporal de los cambios en la PAM (Δ PAM, % de los valores basales), después de la administración intravenosa de atenolol 10 mg/kg (círculos blancos), nebivolol 3 mg/kg (cuadrados blancos) o nebivolol 10 mg/kg (cuadrados negros) en ratas L-NAME. Cada punto muestra la media \pm EEM de ocho ratas. * $p < 0,05$ vs atenolol

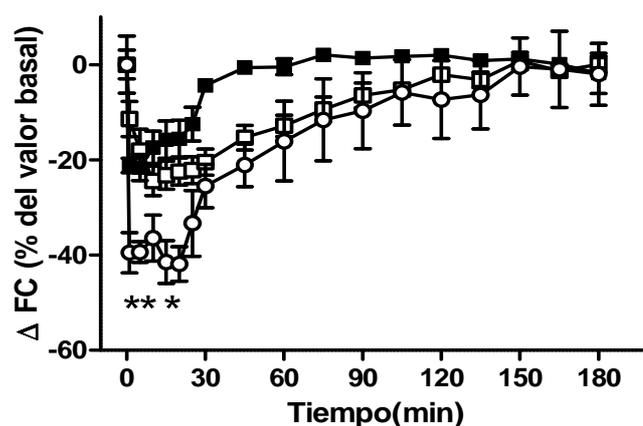


Figura 52: Evolución temporal de los cambios en la frecuencia cardíaca (Δ FC, % de los valores basales), después de la administración intravenosa de atenolol 10 mg/kg (círculos blancos), nebivolol 3 mg/kg (cuadrados blancos) o nebivolol 10 mg/kg (cuadrados negros) en ratas L-NAME. Cada punto muestra la media \pm EEM de ocho ratas. * $p < 0,05$ vs nebivolol

Además de la mayor respuesta antihipertensiva, el nebivolol mostró una capacidad superior de atenuar la VPA de corto plazo en comparación con el atenolol en el modelo de hipertensión por ingesta de L-NAME. La reducción del DE de la presión arterial fue de sólo $-32,8 \pm 7,1\%$ con atenolol 10 mg/kg en comparación con $-60,5 \pm 6,6\%$ y $-73,2 \pm 3,6\%$ con nebivolol 3 y 10 mg/kg, respectivamente (Figura 53). El análisis del curso temporal del cambio de la razón BF/AF evidenció que la administración intravenosa de atenolol 10 mg/kg no modifica este parámetro. En cambio, nebivolol 3 o 10 mg/kg redujo la razón BF/AF respecto de los valores iniciales y de la respuesta del atenolol (Figura 54).

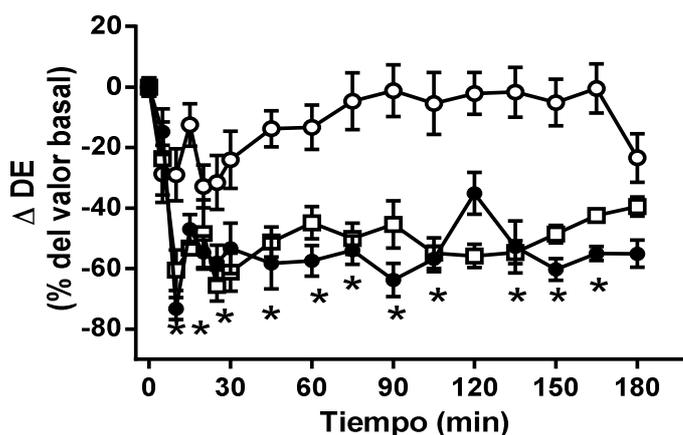


Figura 53: Cambio en la variabilidad de la presión arterial de corto plazo (Δ DE, % del valor basal) después de la administración intravenosa de atenolol 10 mg/kg (círculos blancos), nebivolol 3 mg/kg (cuadrados blancos) o nebivolol 10 mg/kg (cuadrados negros) en ratas L-NAME. Cada punto muestra la media \pm EEM de ocho ratas. * $p < 0,05$ vs atenolol

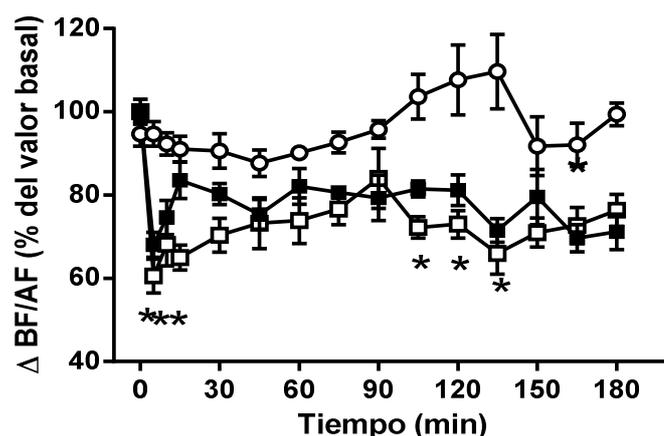


Figura 54: Evolución temporal de los cambios del cociente BF/AF, expresado en % de los valores basales, después de la administración intravenosa de atenolol 10 mg/kg (círculos blancos), nebivolol 3 mg/kg (cuadrados blancos) o nebivolol 10 mg/kg (cuadrados negros) en ratas L-NAME. Cada punto muestra la media \pm EEM de ocho ratas. * $p < 0,05$ vs atenolol

Animales SH

En el modelo de hipertensión genética, la respuesta hipotensora de nebivolol 3 o 10 mg/kg mostró una respuesta hipotensora superior a atenolol 10 mg/kg, tanto en los primeros 30 minutos como luego de 150 minutos (Figura 55). Respecto del efecto cronotrópico, no se hallaron diferencias significativas entre ambos β -bloqueantes. (Figura 56).

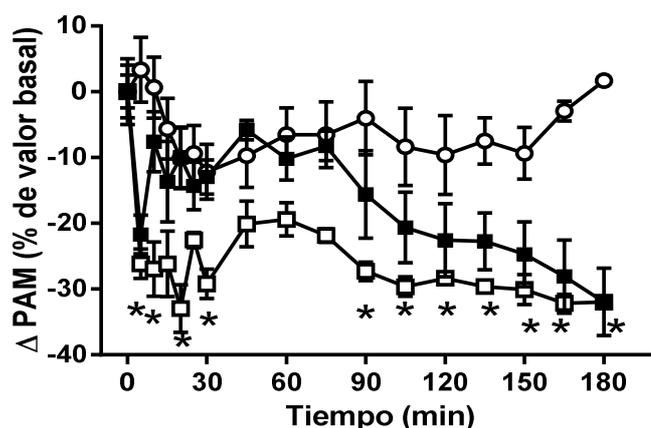


Figura 55: Evolución temporal de los cambios en la PAM (Δ PAM, % de los valores basales), después de la administración intravenosa de atenolol 10 mg/kg (círculos blancos), nebivolol 3 mg/kg (cuadrados blancos) o nebivolol 10 mg/kg (cuadrados negros) en ratas SH. Cada punto muestra la media \pm EEM de ocho ratas. * $p < 0,05$ vs atenolol

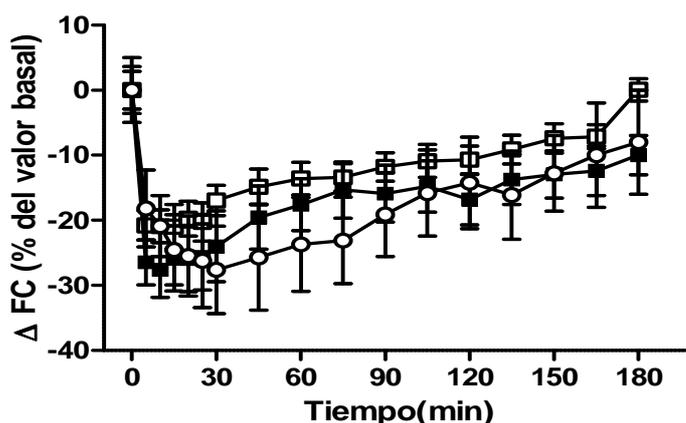


Figura 56: Evolución temporal de los cambios en la frecuencia cardíaca (Δ FC, % de los valores basales), después de la administración intravenosa de atenolol 10 mg/kg (círculos blancos), nebivolol 3 mg/kg (cuadrados blancos) o nebivolol 10 mg/kg (cuadrados negros) en ratas SH. Cada punto muestra la media \pm EEM de ocho ratas.

Además de la mayor respuesta antihipertensiva, el nebivolol mostró una capacidad superior para atenuar la VPA de corto plazo que el atenolol en el modelo de hipertensión genética, sobre todo en los primeros 30 minutos (Figura 57). El análisis del curso temporal del cambio de la razón BF/AF evidenció una diferencia significativa entre el atenolol y el nebivolol aunque más marcadamente en la dosis de 10 mg/kg del nebivolol (Figura 58).

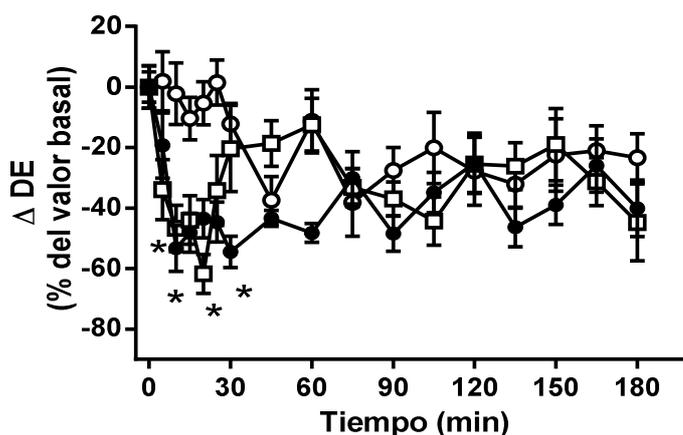


Figura 57: Cambio en la variabilidad de la presión arterial de corto plazo (Δ DE, % del valor basal) después de la administración intravenosa de atenolol 10 mg/kg (círculos blancos), nebivolol 3 mg/kg (cuadrados blancos) o nebivolol 10 mg/kg (cuadrados negros) en ratas SH. Cada punto muestra la media \pm EEM de ocho ratas. * $p < 0,05$ vs atenolol

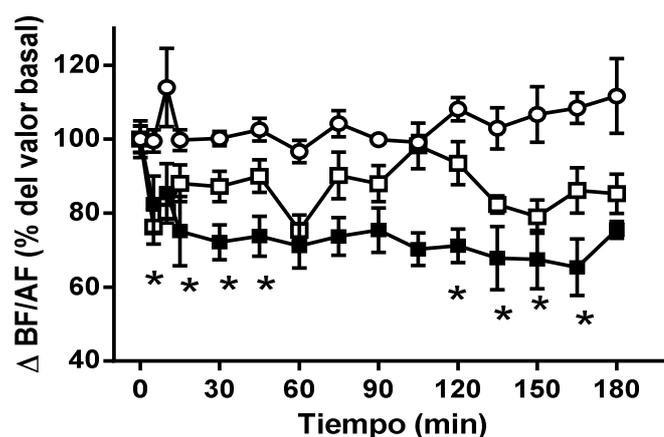
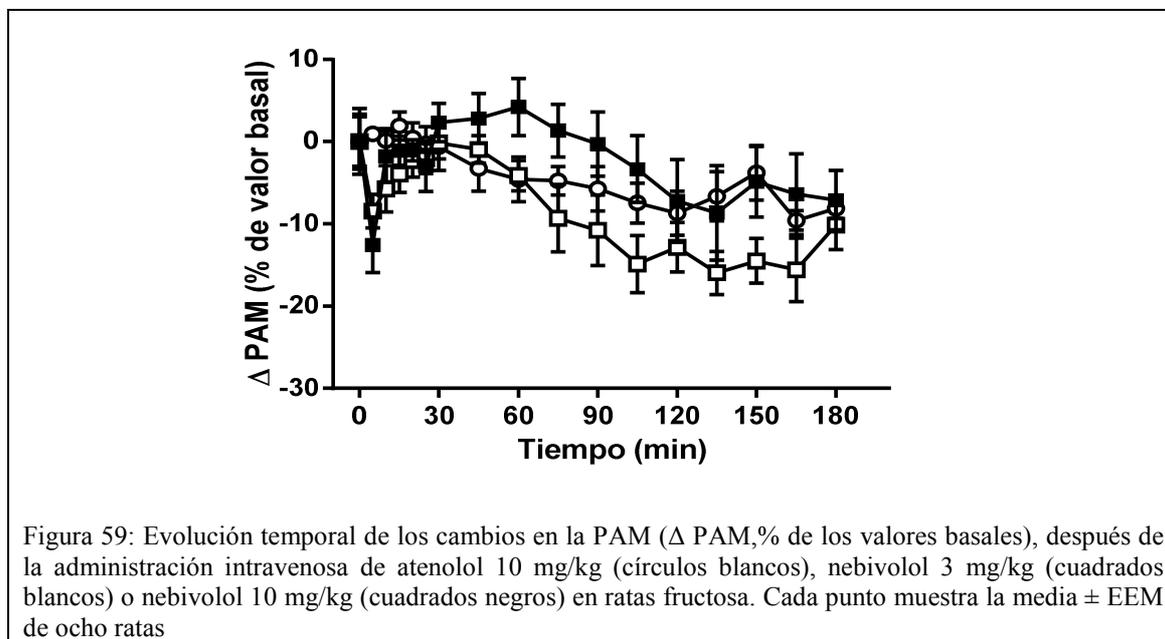


Figura 58: Evolución temporal de los cambios del cociente BF/AF, expresado en % de los valores basales, después de la administración intravenosa de atenolol 10 mg/kg (círculos blancos), nebivolol 3 mg/kg (cuadrados blancos) o nebivolol 10 mg/kg (cuadrados negros) en ratas SH. Cada punto muestra la media \pm EEM de ocho ratas. * $p < 0,05$ vs atenolol

Animales Fructosa

En el modelo de hipertensión por sobrecarga de fructosa, la respuesta hipotensora de nebivolol 3 o 10 mg/kg no mostró diferencias significativas al compararse con atenolol 10 mg/kg (Figura 59). Para la respuesta bradicardizante se observó una mayor actividad

luego de la administración intravenosa de atenolol en comparación con nebivolol en ambas dosis (Figura 60).



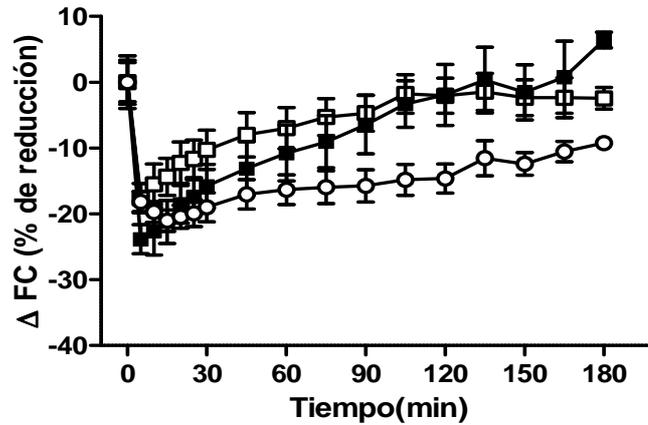


Figura 60: Evolución temporal de los cambios en la frecuencia cardíaca (ΔFC , % de los valores basales), después de la administración intravenosa de atenolol 10 mg/kg (círculos blancos), nebivolol 3 mg/kg (cuadrados blancos) o nebivolol 10 mg/kg (cuadrados negros) en ratas fructosa. Cada punto muestra la media \pm EEM de ocho ratas.

En el caso de la VPA de corto plazo, evidenciada por el descenso del DE, tampoco se observaron diferencias significativas al comparar al nebivolol en ambas dosis con el atenolol (Figura 61). El análisis del curso temporal del cambio de la razón BF/AF mostró una leve diferencia entre el atenolol y el nebivolol aunque solamente en la dosis de 10 mg/kg del nebivolol (Figura 62).

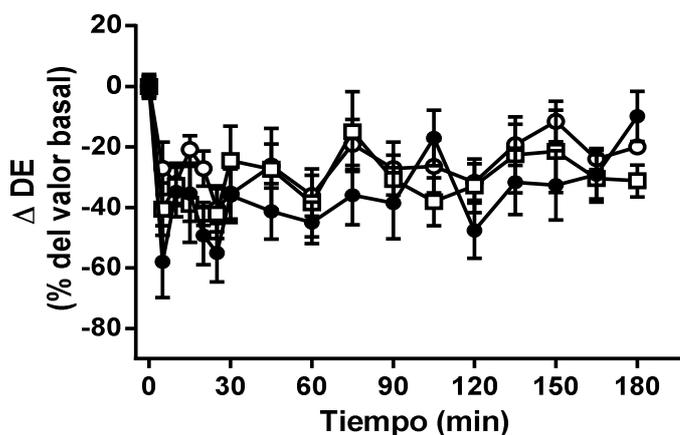


Figura 61: Cambio en la variabilidad de la presión arterial de corto plazo (ΔDE , % del valor basal) después de la administración intravenosa de atenolol 10 mg/kg (círculos blancos), nebivolol 3 mg/kg (cuadrados blancos) o nebivolol 10 mg/kg (cuadrados negros) en ratas fructosa. Cada punto muestra la media \pm EEM de ocho ratas.

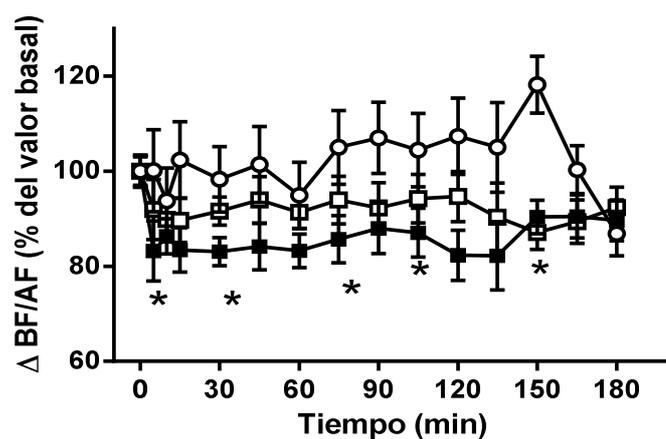


Figura 62: Evolución temporal de los cambios del cociente BF/AF, expresado en % de los valores basales, después de la administración intravenosa de atenolol 10 mg/kg (círculos blancos), nebivolol 3 mg/kg (cuadrados blancos) o nebivolol 10 mg/kg (cuadrados negros) en ratas fructosa. Cada punto muestra la media \pm EEM de ocho ratas. * $p < 0,05$ vs atenolol

DISCUSIÓN

El objetivo del presente trabajo de tesis fue la evaluación exhaustiva de las propiedades farmacocinéticas y cardiovasculares de los β -bloqueantes de tercera generación - carvedilol y nebivolol- en diferentes modelos de hipertensión experimental, con especial énfasis en el efecto sobre la VPA.

Farmacocinética enantioselectiva de carvedilol y nebivolol

Las características farmacocinéticas de los diferentes antihipertensivos han sido escasamente evaluadas en los distintos modelos de hipertensión experimental. Algunos fármacos antihipertensivos, como los antagonistas AT_1 y los bloqueantes β -adrenérgicos lipofílicos, se eliminan por reacciones de oxidación mediadas por el citocromo P450. Es ampliamente conocida la existencia de numerosas isoenzimas de citocromo P450 que tienen la capacidad de biotransformar un sinnúmero de fármacos o sustancias endógenas. Pese a que existen 30 isoenzimas descritas, los fármacos se biotransforman principalmente a través de las isoformas CYP 1A2, 2D6, 2C9, 2C19 y 3A4 (Wilkinson, 2001). Es aquí donde reside la importancia que reviste el conocimiento de la isoforma particular involucrada en el metabolismo de un fármaco, ya que de esta manera se puede predecir en qué situaciones estaría modificado el mismo. Existen algunas evidencias que indican la presencia de alteraciones en la expresión del citocromo P450 en modelos experimentales de hipertensión arterial (Orellana y Guajardo, 2004). Por lo tanto, es de interés el estudio de las posibles alteraciones farmacocinéticas de las drogas antihipertensivas, ya que el conocimiento de las propiedades cinéticas en individuos hipertensos permitiría una mejor caracterización farmacológica de estas drogas. Por otro lado, dada la relación existente entre los niveles plasmáticos y el efecto antihipertensivo,

es de marcada relevancia el conocimiento de las posibles alteraciones en el perfil farmacocinético de los agentes cardiovasculares. En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio hemos detectado alteraciones en el perfil farmacocinético de metoprolol y de irbesartan en ratas SH y animales hipertensos por coartación aórtica, respectivamente (Höcht y cols., 2006; Höcht y cols., 2004).

La farmacocinética del carvedilol se ha estudiado previamente en voluntarios sanos (Phuong y cols., 2004; Zhou y Wood, 1995; Neugebauer y cols., 1990) y en ratas normotensas (Fujimaki, 1992), estableciendo que este β -bloqueante presenta alta extracción hepática y que los enantiómeros de carvedilol se metabolizan a través del citocromo CYP2D6 y CYP1A2 y el citocromo CYP3A4 intestinal (Ishida, 2008). Varios estudios han descrito la existencia de un perfil farmacocinético enantioselectivo del carvedilol, teniendo en cuenta que S-carvedilol muestra mayor $V_{d_{ss}}$, Cl pre-sistémico y eliminación en relación con R-carvedilol (Stahl y cols., 1993; Fujimaki, 1992; Di Verniero y cols., 2010). En concordancia con estos resultados, en todos los grupos experimentales estudiados en el presente trabajo se obtuvieron valores más altos para $V_{d_{ss}}$ y Cl de S-carvedilol en comparación con R-carvedilol. Estos hallazgos establecen que el perfil farmacocinético enantioselectivo de carvedilol reportado previamente en animales normotensos se mantiene en los diferentes modelos de hipertensión experimental.

La comparación de los parámetros farmacocinéticos de la dosis baja y alta de carvedilol estableció la existencia de una cinética no lineal. Aunque estudios previos describieron una farmacocinética lineal de carvedilol en ancianos después de la administración oral de 25-50 mg de la droga (Louis y cols., 1987), un efecto de primer paso saturable para el carvedilol fue hallado en ratas después de una dosis elevada por vía oral de racemato (Stahl y cols., 1993). Nuestros resultados sugieren que después de la aplicación de una

dosis intravenosa única en el intervalo de 1-5 mg/kg, S- y R-carvedilol muestran un patrón farmacocinético no lineal decreciente, tanto en animales control como en los distintos grupos de animales hipertensos estudiados, principalmente como consecuencia de un aumento del $V_{d_{ss}}$ y del Cl. Como resultado de este comportamiento, los valores hallados de C_{max} y AUC son menores a los esperados en todos los grupos experimentales luego del aumento de la dosis. Teniendo en cuenta este comportamiento no lineal, se ha planteado la hipótesis de que la saturación de proteínas plasmáticas podría ser un factor involucrado en este patrón. Con el fin de comprobar dicha hipótesis, se analizó la unión a proteínas plasmáticas de diferentes concentraciones de carvedilol (2-20 $\mu\text{g/ml}$) mediante la técnica de microdiálisis *in vitro* en un grupo de animales hipertensos (L-NAME) y en ratas control normotensas. Como resultado se obtuvo que la fracción no unida del carvedilol aumentó, en ambos grupos experimentales, a medida que se incrementaron las concentraciones plasmáticas del mismo, situación que podría explicar, al menos parcialmente, la mayor distribución tisular y eliminación del fármaco después de la administración intravenosa de 5 mg/kg con respecto a la dosis más baja.

Por último, la comparación de los parámetros farmacocinéticos de carvedilol estimados en animales normotensos e hipertensos estableció que el perfil cinético de los enantiómeros R y S se ve afectado por el estado hipertensivo en los tres grupos experimentales estudiados. Específicamente, se observó una disminución en el Cl del carvedilol en los grupos SH y L-NAME en comparación con sus respectivos controles normotensos y una reducción del $V_{d_{ss}}$ en el modelo por sobrecarga de fructosa comparado con su grupo control. En el primer caso y aunque los mecanismos implicados en este hallazgo no están claros, teniendo en cuenta el hecho de que el aclaramiento de carvedilol depende del flujo sanguíneo hepático (Verbeeck, 2008), se podría sugerir la existencia de una menor perfusión hepática en ratas SH y L-NAME en

comparación con los animales control después de la administración de carvedilol. En relación a esto, Isanta (1987) también ha descrito un menor aclaramiento plasmático de diltiazem, un bloqueante de canales de calcio con alta extracción hepática (Isanta y cols., 1987; Höcht y cols., 2010), en ratas SH con respecto a los animales normotensos WKY. Sin embargo, se requiere de estudios complementarios con el fin de confirmar dicha hipótesis.

En el caso del nebivolol, estudios farmacocinéticos previos realizados en humanos establecieron que este bloqueante β -adrenérgico de tercera generación presenta alta extracción hepática y se metaboliza ampliamente por el citocromo P450 2D6 a su metabolito activo hidroxilado (Gao y Vanhoutte, 2012). Al igual que el carvedilol, el nebivolol presenta propiedades farmacocinéticas estereoselectivas. La biodisponibilidad oral es influenciada por la enantioselectividad, considerando que el pico y el valle de las concentraciones plasmáticas de *d*-nebivolol son superiores a las del *l*-nebivolol tanto en administración única como en un régimen de dosis múltiples (Lefebvre y cols., 2007). Nuestros resultados concuerdan con los trabajos previos, ya que las concentraciones plasmáticas máximas de *d*-nebivolol fueron mayores que las de *l*-nebivolol, después de la administración intravenosa del β -bloqueante en todos los modelos experimentales. En este contexto, el aclaramiento de *l*-nebivolol fue significativamente mayor que el de *d*-nebivolol, resultando en la reducción de las AUC del primero en animales normotensos e hipertensos.

A diferencia de lo observado con carvedilol, solo se hallaron datos concordantes con una farmacocinética no lineal del nebivolol en el grupo de animales hipertensos por sobrecarga de fructosa, que mostró un claro incremento del Cl y del $V_{d_{ss}}$ al aumentar la dosis estudiada. En el caso de los dos grupos hipertensos restantes, no fueron observados cambios en dichos parámetros farmacocinéticos.

Por último, de la comparación de los parámetros entre los diferentes modelos experimentales, surge que la farmacocinética del nebivolol también se ve alterada en el estado hipertensivo pero sólo en los grupos con sobrecarga de fructosa y SH con marcadas diferencias en el Cl del fármaco, no hallándose cambios significativos en el grupo L-NAME. Como posible hipótesis de estos cambios en el Cl que se observan en los animales hipertensos, podemos sugerir las mismas causas que las descritas anteriormente para el carvedilol; es decir, una disminución en el flujo sanguíneo hepático (Verbeeck, 2008), que resultaría en una menor perfusión hepática después de la administración de nebivolol.

Efecto hipotensor de carvedilol y nebivolol

El trabajo de tesis también se enfocó en la evaluación del efecto hipotensor de carvedilol y nebivolol en diferentes modelos experimentales con la finalidad de establecer una posible relación entre la concentración plasmática de los enantiómeros de los bloqueantes β -adrenérgicos y la respuesta cardiovascular. Además, se han comparado las respuestas sobre la presión arterial y la FC entre carvedilol o nebivolol y el bloqueante β -adrenérgico de segunda generación atenolol para evaluar la posible contribución de las acciones farmacológicas adicionales en la respuesta cardiovascular de los fármacos bajo estudio.

En los estudios de carvedilol, mediante la utilización de un modelo PK/PD con compartimiento de efecto, se ha encontrado una relación entre los niveles plasmáticos del carvedilol racémico y la respuesta hipotensora en todos los grupos experimentales. Análisis previos de nuestro laboratorio y otros grupos de investigación han documentado una buena correlación entre la concentración plasmática de diferentes bloqueantes β -adrenérgicos y el cambio en la presión arterial en modelos preclínicos y

en humanos mediante el empleo del modelo PK/PD con compartimiento de efecto (Höcht y cols., 2014). El análisis PK/PD detectó un incremento en la respuesta hipotensora al carvedilol en animales hipertensos por administración de L-NAME en comparación con sus controles. Tanto la potencia como la eficacia, representadas por la CE_{50} y el $E_{máx}$ respectivamente, fueron mayores en el grupo de animales hipertensos. Para el caso de los animales SH, se observó un marcado incremento en la eficacia antihipertensiva del carvedilol en el grupo de animales hipertensos en comparación con los controles pero sin hallarse un aumento en la potencia de dicho efecto. Por último, para el grupo de animales con sobrecarga de fructosa también se observó un aumento de la respuesta hipotensora al carvedilol en comparación con las ratas control, aunque sólo en la dosis más alta, sin hallarse diferencias significativas en la potencia.

La superior eficacia antihipertensiva del carvedilol en los diferentes modelos experimentales de hipertensión evaluados sugiere un compromiso del sistema nervioso simpático en el mantenimiento de la elevación de la presión arterial inducida por diferentes mecanismos patogénicos. Estos resultados se sustentan con hallazgos de otros grupos de investigación que establecieron la participación del sistema nervioso simpático en el mantenimiento del estado hipertensivo en los distintos modelos estudiados. Así, en experimentos previos, los animales L-NAME evidenciaron mayor actividad neuronal de eferencias simpáticas y mayor susceptibilidad al bloqueo ganglionar en comparación con animales normotensos (Augustyniak y cols., 2006; Biancardi y cols., 2007). En ratas con sobrecarga de fructosa, la inhibición del sistema nervioso simpático mediante la administración de clonidina o la simpatectomía ha demostrado prevenir el desarrollo del estado hipertensivo (Hwang y cols., 1987; Verma y cols., 1999). Más recientemente, Tran y cols. (2014) revelaron la existencia de una elevación en la concentración sérica de catecolaminas en ratas con sobrecarga de

fructosa y la capacidad del bloqueante α_1 -adrenérgico prazosin de prevenir la elevación de la presión arterial en este modelo experimental de síndrome metabólico. Diferentes estudios han establecido que la sobreactividad simpática explica gran parte de la elevación de la presión arterial en el modelo genético de hipertensión experimental (Norman y Dzielak, 1986). En el mismo sentido, Yuan y cols. (2013) documentaron mayor respuesta al bloqueo ganglionar, incremento de la actividad del nervio simpático cardíaco y elevación de la concentración plasmática de noradrenalina en ratas SH en comparación con el grupo normotenso WKY.

Sin embargo, considerando las diferencias de respuesta entre los animales hipertensos y los respectivos grupos controles normotensos, la importancia del sistema nervioso simpático vascular parece depender del modelo experimental. En este contexto, los datos de los experimentos sugieren que el sistema nervioso simpático presenta un papel más preponderante en el mantenimiento del estado hipertensivo en el modelo genético de ratas SH y en animales L-NAME. En cambio, la participación de este sistema parece limitada en animales con sobrecarga de fructosa.

Con el fin de demostrar esta hipótesis, se evaluó el efecto del fármaco sobre la actividad simpática vascular mediante el análisis espectral del registro continuo de la presión arterial. Diferentes trabajos previos revisados por Strauss (2007) han establecido que la identificación de los componentes de frecuencia de la VPA latido-a-latido mediante el análisis espectral puede proporcionar información sobre los mecanismos implicados en la regulación de la presión arterial. En este contexto, los péptidos del SRA, las catecolaminas, el ON y la función vascular miogénica afectan a la VPA en el dominio de MBF (Stauss, 2007). La variabilidad de BF en ratas se ve afectada por la modulación simpática del tono vascular y endotelial derivada del ON (Stauss, 2007). Por otra parte, el cociente BF/AF ha sido validado como un marcador de la actividad vascular

simpática en estudios preclínicos y clínicos (Souza y cols., 2008; Fazan y cols., 2008).

La variabilidad en el dominio AF estaría influenciada principalmente por los cambios en el gasto cardíaco (Janssen y cols., 1995).

Al analizar los diferentes valores basales de la VPA en todos sus dominios se observó la existencia de una mayor variabilidad en los dominios de MBF y BF en todos los grupos hipertensos en comparación con los respectivos controles normotensos, lo que sugiere un compromiso de los diferentes sistemas endógenos, incluyendo el SRA, ON y la función vascular miogénica en la regulación de la presión arterial. Además, al observarse un aumento de la variabilidad de BF, se podría inferir que existe un incremento en la actividad simpática vascular en el mantenimiento de la fase hipertensiva inducida en todos los modelos estudiados. Por último, al comparar el cociente BF/AF en los distintos grupos experimentales con sus controles normotensos, se observó un mayor valor del mismo para los animales hipertensos SH y L-NAME, no habiéndose encontrado diferencias significativas en el grupo de animales hipertensos por sobrecarga de fructosa. Estos hallazgos confirmarían la menor participación del sistema nervioso simpático vascular en animales con sobrecarga de fructosa en comparación con las ratas SH y la hipertensión inducida por ingesta de L-NAME.

Después de administrar carvedilol en las dos dosis estudiadas se observaron diversos resultados en relación al cambio de la VPA en los diferentes dominios de frecuencia. Así, si bien se detectó un descenso significativo de la VPA de MBF y BF en todos los grupos después de la administración de carvedilol, la reducción de la VPA en estos dominios fue mayor en los grupos L-NAME y SH en comparación a sus respectivos controles. En cambio, al comparar los resultados obtenidos para el grupo fructosa y su grupo control, no se observaron diferencias significativas en la reducción de la VPA en ninguno de los dominios de frecuencia así como tampoco en el cociente BF/AF. En el

caso de los animales SH se observó también una marcada disminución del cociente BF/AF en los animales hipertensos en comparación con su control después de la administración del β - bloqueante. Para el grupo L-NAME los resultados muestran una mayor reducción del cociente BF/AF en animales hipertensos en comparación con controles a expensas de la caída de la VPA de BF, ya que en este grupo experimental, el carvedilol no produjo disminución en la VPA de AF. Teniendo en cuenta la validez de la relación BF/AF como potencial marcador de la actividad vascular simpática (Fazan y cols., 2008; Souza y cols., 2008), en el presente trabajo se evaluó el efecto de la administración de carvedilol en la relación BF/AF mediante el modelado PK/PD en el grupo hipertenso L-NAME y fructosa y sus respectivos controles. Para el análisis PK/PD se eligió un modelo de respuesta fisiológica indirecta inhibitoria, en el cual partimos de la suposición de que el carvedilol puede inhibir completamente la K_{in} en términos de tono vascular teniendo en cuenta que, en algunos experimentos, carvedilol logra la supresión casi completa de la variabilidad BF. Estos resultados son similares a los reportados por Ponchon (1997), que encontró que una dosis de prazosin subpresora reduce la variabilidad de BF en 72-78%. Desde un punto de vista fisiológico, como la VPA de BF depende del tono simpático, se espera que el bloqueo total de los receptores α -adrenérgicos vasculares cause la supresión de la VPA de BF (Stauss, 2007; Ponchon y Elghozi, 1997). En nuestro estudio se observó una buena relación entre las concentraciones plasmáticas de carvedilol racémicas y su efecto sobre la relación BF/AF, lo que sugiere que el modelado PK/PD con un modelo fisiológico de respuesta indirecta inhibitorio puede ser una herramienta óptima para la cuantificación de los efectos del fármaco sobre la actividad vascular simpática. Teniendo en cuenta los resultados descriptos anteriormente, se observaron resultados dispares al analizar ambos grupos hipertensos y sus controles. Mientras que la CI_{50} de carvedilol fue

significativamente menor en las ratas L-NAME que en su grupo control, sugiriendo una mayor actividad simpaticolítica de carvedilol en los animales hipertensos, no se hallaron cambios significativos en el análisis PK/PD para el grupo fructosa al compararlo con su control.

En contraposición a la rápida recuperación de los valores iniciales de presión arterial detectada en los experimentos con carvedilol, nebivolol ejerció una respuesta hipotensora sostenida en todos los grupos experimentales, teniendo en cuenta que la presión arterial no volvió a los valores basales durante todo el tiempo de duración de los experimentos. En realidad, el cambio temporal de la presión arterial inducido por la administración endovenosa de una dosis única de nebivolol, se caracterizó por un rápido efecto antihipertensivo inicial seguido de la normalización de la presión y el posterior descenso tensional sostenido, patrón que fue observado en todos los grupos experimentales. Este tipo de respuesta hipotensora sostenida al nebivolol ha sido descrita previamente por otros autores (Van de Water y cols., 1988). De acuerdo con nuestros resultados, van de Water ha encontrado que la reducción de la presión arterial después de la administración intraperitoneal de nebivolol en una dosis de 1,25 mg/kg en animales SH despiertos fue máxima después de los 180 min de haber administrado el fármaco. Este patrón farmacodinámico de nebivolol contrasta con otros β -bloqueantes como carvedilol y atenolol. Varios mecanismos pueden contribuir a la eficacia hipotensora sostenida de nebivolol, incluyendo la lenta velocidad de disociación del receptor y la generación de metabolitos activos (Kuroedov y cols., 2004; Meier y cols., 2004). En consonancia con estos hallazgos, estudios clínicos han establecido que la toma oral de nebivolol una vez al día mantiene un efecto antihipertensivo sostenido a lo largo de 24 horas (Van Bortel y cols., 2008).

Producto de la respuesta hipotensora sostenida del nebivolol, en el presente estudio no encontramos una correlación entre la respuesta cardiovascular inducida por nebivolol y los niveles plasmáticos del bloqueante β -adrenérgico utilizando los modelos PK/PD clásicos. Las explicaciones de la ausencia de una asociación entre farmacocinética y farmacodinamia del nebivolol son varias, entre ellas, como se mencionó antes, la lenta disociación del receptor y la generación de metabolitos que contribuyen en la acción cardiovascular. Por otro lado, en el presente estudio tampoco encontramos una relación entre la dosis de nebivolol administrada y la magnitud de la respuesta hipotensora. Inclusive, en animales SH se observó una acción hipotensora temprana inferior con la administración de la dosis más alta de nebivolol con respecto a la administración de la dosis de 3 mg/kg. Este resultado paradójico puede ser explicado en base a los resultados obtenidos por Van de Water (1988), quien documentó una menor reducción de la resistencia vascular después de la aplicación de dosis más altas de nebivolol con respecto a dosis más bajas por mecanismos aun no dilucidados.

La comparación de la respuesta hipotensora inducida por nebivolol en los modelos de hipertensión experimental respecto de los grupos controles normotensos estableció un comportamiento diferente según la etiología del cuadro hipertensivo. Mientras que los animales SH y el modelo por ingesta de L-NAME experimentaron un mayor descenso inicial de la presión arterial con la administración de nebivolol en comparación con los grupos controles, la respuesta hipotensora de este bloqueante β -adrenérgico de tercera generación no se encontró incrementada en el modelo por sobrecarga de fructosa. De acuerdo al perfil farmacológico, la acción antihipertensiva del nebivolol dependería tanto de la reducción del gasto cardíaco asociada al bloqueo selectivo del receptor β_1 -adrenérgico como de la relajación vascular provocada por el aumento de la disponibilidad del ON. Sin embargo, estudios previos han establecido que nebivolol

reduce la resistencia vascular periférica manteniendo el gasto cardíaco en pacientes con hipertensión arterial, sugiriendo que la acción vascular predomina por sobre el mecanismo cardíaco en el efecto antihipertensivo de este β -bloqueante de tercera generación (Gao y Vanhoutte, 2012). Por lo tanto, los hallazgos del presente estudio sugieren un compromiso del ON en el mantenimiento del estado hipertensivo en animales con hipertensión genética y en aquellos con tratamiento crónico con L-NAME. Con la finalidad de esclarecer los mecanismos neurohumorales involucrados en la mayor respuesta hipotensora de nebivolol en los modelos experimentales evaluados, se ha comparado el efecto de la aplicación de fármaco sobre los distintos dominios de frecuencia de la VPA latido-a-latido. La administración de nebivolol en las dos dosis de trabajo indujo una reducción significativa de la VPA en los dominios de MBF y BF en todos los grupos experimentales, sin embargo sólo se hallaron diferencias significativas en la magnitud de dicha reducción en los grupos SH y L-NAME en relación a sus respectivos controles. Estos resultados sugieren que, al menos en parte, el nebivolol ejerce un mayor efecto hipotensor en estos animales hipertensos mediante el incremento de la liberación de ON. El análisis del cociente BF/AF como marcador de la actividad simpática vascular estableció la existencia de una mayor reducción de este parámetro en las ratas hipertensas SH y L-NAME en comparación con sus respectivos grupos controles normotensos, hallazgo que sugiere una mayor actividad simpaticolítica de nebivolol en estos modelos. En su conjunto, estos resultados confirman la existencia de una sobreactividad vascular simpática, así como un rol importante del ON en los grupos hipertensos SH y L-NAME. Luego, pueden sugerir también que el incremento de la eficacia antihipertensiva del nebivolol en estos grupos experimentales se deba, en algún punto, a la acción simpaticolítica y al incremento en la liberación de ON. En concordancia con esto, varios trabajos anteriores han descrito acciones simpaticolíticas

de nebivolol que están relacionadas con el aumento de la biodisponibilidad de ON (Chiladakis y cols., 2004; Sacco y cols., 2005). Además Sacco (2005) ha encontrado que la aplicación central de nebivolol de forma aguda en el cerebro incrementa la liberación de ON, reduciendo de este modo la actividad del sistema nervioso simpático. Por el contrario, en el modelo por sobrecarga de fructosa no se hallaron diferencias en el cambio de la VPA latido-a-latido en los diferentes dominios de frecuencia ni en el cociente BF/AF con respecto al grupo normotenso. Estos resultados sugieren que la eficacia del nebivolol en términos del aumento del ON derivado del endotelio y la reducción de la actividad simpática vascular es similar en animales hipertensos con sobrecarga de fructosa respecto de ratas normotensas, explicando la ausencia de diferencias significativas en la reducción de la PAM.

Efecto cronotrópico de carvedilol y nebivolol

El presente estudio también se enfocó en la comparación del efecto cronotrópico de carvedilol y nebivolol en los diferentes modelos experimentales de hipertensión arterial. Estudios de cohorte han demostrado que el incremento de la FC en reposo se asocia con mayor riesgo de muerte por causa cardiovascular en pacientes con hipertensión arterial (Courand y Lantelme, 2014). Sin embargo, ensayos clínicos intervencionistas no han podido demostrar al día de hoy que la reducción de la FC es beneficiosa en pacientes hipertensos. En los estudios de carvedilol se ha observado una buena correlación entre los niveles plasmáticos del enantiómero –S del bloqueante β -adrenérgico de tercera generación y la respuesta bradicardizante en los diferentes modelos experimentales. El análisis PK/PD del efecto cronotrópico del carvedilol en los distintos grupos experimentales muestra respuestas dispares: por un lado se detectó un incremento en la eficacia en el grupo de ratas SH en comparación con los animales control, sin

observarse cambios en la potencia. Esto podría sugerir una sobreactivación simpática cardíaca en dicho modelo de hipertensión, aunque la FC basal no muestre cambios significativos entre los animales control y los hipertensos. Es bien sabido que este es un marcador con varias limitaciones de la actividad simpática cardíaca (Grassi, 1998). Estos resultados están de acuerdo con el hecho de que la liberación de noradrenalina cardíaca se incrementa en los animales SH con respecto a los controles WKY (Abboud 1982; Tsoporis y Leenen 1988; Adams, 1989). Además, en un trabajo anterior realizado en nuestro laboratorio, mediante el uso de un modelado PK/PD hemos encontrado una mayor eficacia para el efecto cronotrópico del metoprolol en ratas SH, comparando con animales control normotensos (Höcht y cols., 2006). Por el contrario, no se observaron diferencias significativas en la eficacia ni en la potencia del efecto cronotrópico del carvedilol en los animales hipertensos con sobrecarga de fructosa y en el grupo hipertenso por administración de L-NAME, en comparación con sus respectivos controles. Para estos dos casos parecería no existir una sobreactivación simpática cardíaca. La ausencia de una mayor respuesta cronotrópica en animales sometidos a sobrecarga de fructosa está de acuerdo con el hecho de que la reactividad *in vitro* de los receptores β_1 -adrenérgicos atriales a la estimulación con noradrenalina o a la inhibición con el agonista inverso metoprolol no se encuentra modificada en ratas con sobrecarga de fructosa en comparación con animales normotensos (Höcht y cols., 2008). En el mismo sentido, el grupo de investigación de Dos Santos y cols. (2010) no encontró diferencias en la actividad simpática cardíaca y el balance del tono simpático-vagal en ratas tratadas con L-NAME durante 2-14 días y el respectivo grupo control.

Al igual que los estudios con carvedilol, en el análisis del efecto cronotrópico del nebivolol se obtuvieron resultados dispares en cuanto a la magnitud del efecto y la diferencia entre los grupos hipertensos y sus controles. Así, como observamos que no

existen diferencias significativas en los grupos L-NAME y SH al compararlos con sus respectivos controles, sí las encontramos al comparar los animales hipertensos por sobrecarga de fructosa con animales control. Llamativamente, Para este caso observamos una reducción del efecto bradicardizante del nebivolol en animales con sobrecarga de fructosa respecto del grupo control. Si bien este hallazgo podría sugerir una alteración de la función del receptor β_1 -cardíaco en este modelo experimental, diversos estudios previos desestiman la existencia de una hiperactividad simpática cardíaca y alteraciones en el receptor β -adrenérgico en este modelo de síndrome metabólico (Di Verniero y cols., 2008).

Efecto de carvedilol y nebivolol sobre la variabilidad de la presión arterial a corto plazo

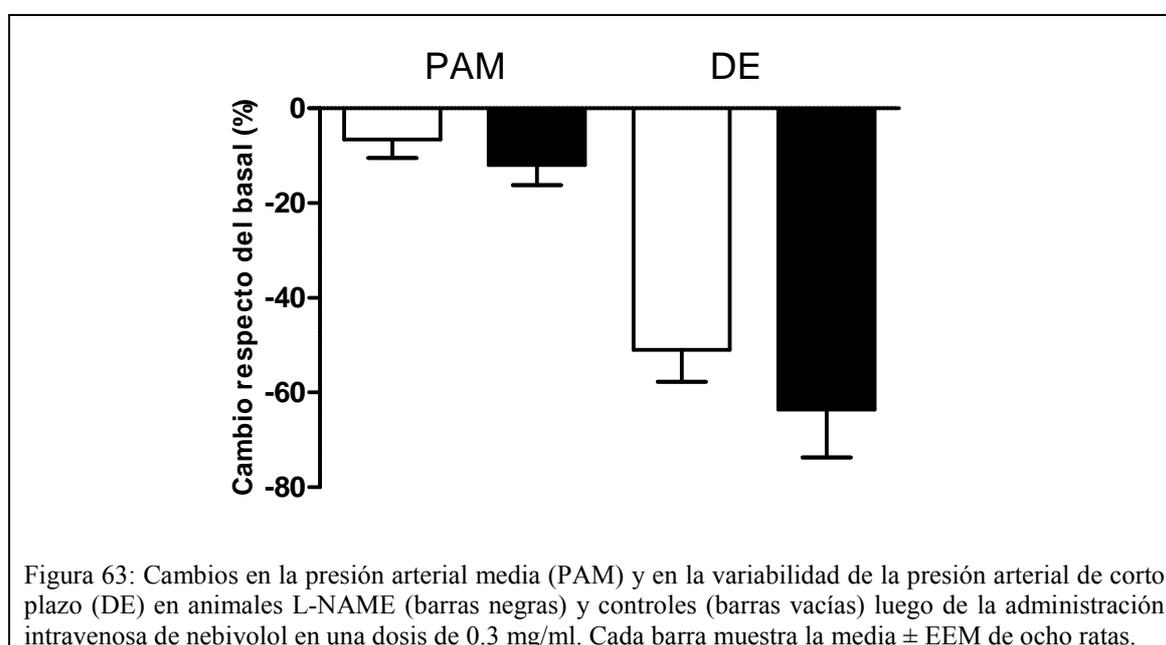
El presente trabajo también evaluó los efectos agudos de carvedilol y nebivolol sobre el DE del registro de la presión arterial como marcador de VPA de corto plazo en los diferentes grupos experimentales. Hallazgos recientes han enfatizado en el papel de la VPA en la morbilidad y mortalidad cardiovascular en sujetos normotensos e hipertensos (Rothwell, 2011). La fluctuación excesiva de la presión arterial juega un papel importante en la progresión del daño de órgano y en el desencadenamiento de eventos vasculares, en particular accidentes cerebrovasculares (Rothwell, 2011). Por otra parte, el aumento de VPA ha sido asociado con la hipertrofia ventricular izquierda en sujetos normotensos (Schutte y cols., 2011). Teniendo en cuenta la contribución de la VPA en el desarrollo de eventos cardiovasculares, la reducción de este parámetro puede ser considerado como una posible nueva diana en medicina cardiovascular (Schillaci y cols., 2011). En comparación con sus controles, todos los modelos experimentales de hipertensión mostraron valores basales de DE más altos, lo que confirma que la VPA de

corto plazo aumenta con los niveles de presión arterial. En el presente trabajo, la administración iv de carvedilol redujo drásticamente el DE del registro de la presión arterial, tanto en grupos hipertensos como en controles, lo que sugiere que este β -bloqueante de tercera generación no sólo controla efectivamente la hipertensión sino también atenúa la VPA de corto plazo.

Por su parte, la administración de nebivolol también redujo de manera notable el DE del registro de la presión arterial en todos los grupos experimentales, lo que nuevamente sugiere que también este β -bloqueante vasodilatador no sólo logra controlar de manera efectiva la elevación de la presión arterial sino también atenúa la VPA de corto plazo. El presente estudio ha reportado diferencias significativas en la reducción de la VPA a corto plazo luego de la dosis más alta en animales hipertensos. Específicamente, al incrementar la dosis a 10 mg/kg se registró una mayor reducción del DE en los animales hipertensos, sobre todo en los grupos L-NAME y de sobrecarga de fructosa, respecto de los controles normotensos.

Teniendo en cuenta la relación directa entre el nivel de presión arterial y la magnitud de la VPA a corto plazo, la reducción de la VPA inducida por nebivolol y carvedilol podría ser una consecuencia indirecta del efecto hipotensor. Sin embargo, varios hallazgos establecen que la disminución del DE promovida por los bloqueantes β -adrenérgicos de tercera generación es independiente de la respuesta antihipertensiva. En primer lugar, en el caso de nebivolol, a pesar de que la reducción de la presión arterial evidenció un patrón bifásico con una normalización de la misma seguida de una reducción sostenida del nivel tensional, la disminución del DE del registro de presión fue constante a lo largo de las 3 horas de seguimiento. En segunda instancia, nuestro grupo de investigación ha evaluado la eficacia de diferentes antihipertensivos a dosis subpresoras para establecer la independencia de la reducción de la VPA respecto del efecto

hipotensor en ratas con desnervación sinoaórtica (Bertera y cols., 2013). En este modelo experimental, la aplicación de una dosis baja de carvedilol 0.1 mg/kg o nebivolol 0.3 mg/kg indujo un marcado descenso de la VPA de corto plazo a pesar de mostrar escasos efectos sobre la PAM. En igual sentido, en estudios previos hemos demostrado que nebivolol 0.3 mg/kg en animales hipertensos por L-NAME y en ratas normotensas induce una marcada reducción del DE del registro de presión arterial a pesar de los limitados efectos sobre el nivel de la misma (Figura 63). Aunque los mecanismos implicados en los efectos beneficiosos de los β -bloqueantes de tercera generación en la reducción de la VPA de corto plazo son desconocidos, la mejora de la función endotelial mediada por carvedilol y nebivolol podría contribuir en su capacidad para reducir las oscilaciones de la presión arterial (Bertera, 2013).



Comparación de los efectos cardiovasculares de carvedilol y nebivolol con atenolol

Como se comentó anteriormente, la experiencia clínica ha establecido que los bloqueantes β -adrenérgicos no vasodilatadores, en especial atenolol, se asocian con menor protección del paciente hipertenso contra el desarrollo de eventos cardiovasculares y con un mayor riesgo de efectos adversos metabólicos. Dentro de las posibles explicaciones de la menor cardioprotección promovida por estos agentes se ha postulado su incapacidad de reducir la presión arterial central y la VPA de corto y largo plazo. Por otro lado, atenolol genera reducción del flujo sanguíneo muscular favoreciendo el desarrollo de insulinoresistencia y la posible aparición de diabetes mellitus tipo 2 de nuevo diagnóstico. Los nuevos bloqueantes β -adrenérgicos con acciones pleiotrópicas, como carvedilol y nebivolol, presentan potencialmente un mejor perfil farmacológico producto de su acción vasodilatadora. Por tal motivo, hemos postulado que carvedilol y nebivolol son superiores a atenolol en cuanto a la reducción de los factores que contribuyen en el desarrollo del daño de órgano blanco, como la presión arterial central y la VPA a corto plazo.

Con el objetivo de comprobar esta hipótesis se analizaron los efectos antihipertensivos, cronotrópicos, de disminución de VPA de corto plazo y de la actividad simpática, (reflejada en la razón BF/AF), de carvedilol, nebivolol y atenolol, en los modelos de hipertensión experimental estudiados. En el caso del carvedilol, en los tres modelos de hipertensión se observa claramente que el efecto hipotensor del mismo es mayor comparado con la respuesta obtenida con atenolol. En cambio, diferentes resultados se obtuvieron al estudiar el efecto cronotrópico. El efecto bradicardizante registrado luego de la administración intravenosa de carvedilol fue comparable al alcanzado con atenolol. El mayor efecto hipotensor alcanzado con carvedilol sugiere una eficacia

superior en el control de la presión arterial central respecto al atenolol. En el presente trabajo se ha cuantificado la presión arterial directa a nivel carotídeo, la cual es considerada conjuntamente con la presión arterial aórtica como parámetro de la presión arterial central (Trudeau, 2014). Es importante tener en cuenta que la presión arterial carotídea representa el nivel tensional al cual está expuesto el cerebro, órgano blanco de la hipertensión arterial. Hallazgos del estudio *The Conduit Artery Function Evaluation* (CAFE) han dejado en claro que el tratamiento antihipertensivo con atenolol es menos efectivo que la toma oral de amlodipina en la reducción de la presión arterial central en pacientes hipertensos, lo que explicaría su menor capacidad de prevenir el accidente cerebrovascular en la población anciana. La mayor eficacia del carvedilol en la reducción de la presión arterial central se explica por efecto vasodilatador mediado por el antagonismo α -adrenérgico. Los hallazgos experimentales obtenidos en los diferentes modelos de hipertensión confirman en cierta medida la superioridad clínica de carvedilol respecto de atenolol. Un estudio clínico retrospectivo realizado sobre pacientes con hipertensión arterial estableció que la toma oral de carvedilol o nebivolol reducen la presión arterial central en comparación con el tratamiento con atenolol, a pesar de ejercer una disminución similar de la presión arterial periférica (Polónia y cols., 2010).

El análisis del cambio en el DE del registro continuo de presión arterial estableció, además, que carvedilol atenúa en mayor medida la VPA de corto plazo en comparación con el atenolol en ratas L-NAME y en animales SH. La mayor eficacia de carvedilol sobre atenolol en términos de control de la VPA no estaría relacionada con la reducción superior de la presión arterial central. Esta afirmación se fundamenta por el hecho de que en animales con desnervación sinoaórtica, el incremento de la reducción de la VPA a corto plazo con carvedilol fue notorio inclusive luego de la administración de dosis

subdepresoras (Bertera y cols., 2013). Al día de hoy no se cuenta con estudios clínicos que se hayan enfocado en la comparación del efecto del tratamiento crónico con carvedilol o atenolol sobre la VPA de corto o largo plazo.

Finalmente, la evaluación de los cambios en el cociente BF/AF ha establecido que la aplicación endovenosa de carvedilol promueve una mayor reducción de la sobreactividad simpática vascular que el tratamiento con atenolol en los tres modelos experimentales de hipertensión estudiados. La marcada diferencia en este efecto vascular se explica por el bloqueo de receptores α -adrenérgicos propio del carvedilol. Este resultado confirmaría que la actividad simpaticolítica de carvedilol representa un potencial mecanismo de acción involucrado en las mejores propiedades hemodinámicas en términos de reducción de la presión arterial central respecto de β -bloqueantes cardioselectivos sin actividad vascular.

La comparación directa de los efectos cardiovasculares de nebivolol y atenolol estableció una mayor reducción de la presión arterial carotídea con nebivolol respecto de atenolol en los animales L-NAME y SH, sin diferencias significativas en el modelo por sobrecarga de fructosa. Estos resultados confirman la importancia de la acción vasodilatadora de los bloqueantes β -adrenérgicos de tercera generación en la atenuación de la presión arterial central. En concordancia con nuestros hallazgos, estudios clínicos comparativos han demostrado la superioridad de nebivolol por sobre bloqueantes β -adrenérgicos convencionales en la disminución de la presión arterial central en pacientes hipertensos. En este contexto, Kampus y cols. (2011) llevaron a cabo un ensayo de diseño aleatorio y doble ciego sobre 80 pacientes hipertensos que recibieron nebivolol 5 mg o metoprolol 50-100 mg durante 1 año. Aunque ambos tratamientos fueron equivalentes en términos de reducción de la presión arterial periférica y de la FC, los pacientes asignados a nebivolol se beneficiaron de una reducción de la presión

arterial central sistólica y diastólica y del espesor de la pared del ventrículo izquierdo (Kampus y cols., 2011). Estos hallazgos establecen que, producto de sus propiedades vasodilatadoras, el tratamiento con nebivolol ofrece beneficios superiores en comparación con bloqueantes β -adrenérgicos convencionales en la reducción del daño de órgano blanco asociado a la hipertensión arterial.

El análisis de la respuesta bradicardizante evidenció la ausencia de diferencias significativas en el descenso de la FC generado por ambos bloqueantes β -adrenérgicos en ratas SH, mientras que la respuesta bradicardizante de nebivolol fue inferior a la inducida por atenolol en los modelos de hipertensión inducidos por la toma oral de L-NAME o fructosa. Una de las posibles explicaciones a la menor respuesta bradicardizante inducida por nebivolol es su mayor cardioselectividad y, por ende, la menor interacción con receptores β_2 -adrenérgicos en el nodo sinusal. En consonancia con nuestros resultados, Dhakam y cols. (2008) demostraron que el tratamiento oral con nebivolol se asocia con menor reducción de la frecuencia cardíaca de pacientes con hipertensión sistólica aislada en comparación con la toma oral de atenolol.

Los resultados en cuanto a la disminución de la VPA de corto plazo demuestran que nebivolol también presenta una mayor capacidad para reducir el DE del registro de presión arterial en comparación con atenolol, aunque sólo en el caso de los animales hipertensos por L-NAME se detectó una diferencia significativa entre ambos fármacos. La reducción de la razón BF/AF es asimismo marcadamente superior luego de administrar nebivolol en ambas dosis al compararse con atenolol en el modelo de hipertensión por ingesta de L-NAME. En el modelo SH la reducción es mayor aunque principalmente al comparar al atenolol con el nebivolol en la dosis más alta. Algo similar sucede en el grupo hipertenso por sobrecarga de fructosa, donde la diferencia significativa a favor del nebivolol en la relación BF/AF se observa solamente con la

dosis de 10mg/kg de nebivolol. Estos hallazgos establecen que nebivolol presenta una importante acción simpaticolítica vascular, mientras que atenolol carece de la misma; mecanismo que podría explicar la mayor reducción de la presión arterial central inducida por el β -bloqueante de tercera generación.

En su conjunto, estos resultados establecen que los bloqueantes β -adrenérgicos de tercera generación, a diferencia de atenolol, presentan efectos cardiovasculares benéficos adicionales, entre ellos la reducción de la presión arterial central y de la VPA de corto plazo, que podrían resultar en una mayor protección cardiovascular en la hipertensión arterial. Por otro lado, la capacidad de atenuar la presión arterial carotídea y la VPA de corto plazo por parte de los bloqueantes β -adrenérgicos de tercera generación depende del modelo de hipertensión experimental, siendo superior en las ratas con hipertensión inducida por L-NAME y en animales SH respecto al modelo por sobrecarga de fructosa. En cuanto a las implicancias clínicas, los β -bloqueantes de tercera generación serían particularmente efectivos en la hipertensión esencial y en pacientes con disfunción endotelial con efectos más modestos en sujetos con síndrome metabólico. Finalmente, es importante destacar que nuestros resultados sugieren que la menor cardioprotección generada por atenolol en comparación con otros antihipertensivos de primera línea no debería ser extrapolada a los bloqueantes β -adrenérgicos de tercera generación con acción vasodilatadora. En consonancia con esta afirmación, un estudio clínico comparativo estableció que el tratamiento con nebivolol promueve una mayor reducción del índice de masa del ventrículo izquierdo en comparación con ramipril, un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (Cağlar y Dincer, 2011). Teniendo en cuenta la importancia, documentada en numerosos trabajos, que reviste la reducción de la VPA en lo que se refiere a la disminución de daño de órgano blanco, tanto el carvedilol como el nebivolol se

presentan como una alternativa por demás atractiva para el tratamiento de la hipertensión arterial.

CONCLUSIÓN

En este trabajo se propuso estudiar la relación existente entre los niveles plasmáticos de los enantiómeros del carvedilol y nebivolol y su respuesta antihipertensiva y bradicardizante en diferentes modelos de hipertensión arterial, entre ellos la rata SH, la rata con sobrecarga de fructosa y animales hipertensos por administración crónica de L-NAME. Además, se analizaron los perfiles farmacocinéticos del carvedilol y el nebivolol en los diferentes modelos de hipertensión experimental y se estudiaron los distintos componentes de la VPA en cada grupo con el fin de caracterizar la participación de los diferentes sistemas neurohormonales. Por último, se comparó la eficacia de carvedilol y nebivolol contra atenolol en cuanto a la disminución de VPA de corto plazo, un marcador independiente del riesgo cardiovascular, y la VPA latido-a-latido en los diferentes rangos de frecuencia.

Entre los objetivos alcanzados se ha demostrado, mediante la aplicación de modelos PK/PD, la existencia de una relación entre los niveles plasmáticos del enantiómero -S del carvedilol y la respuesta bradicardizante y entre las concentraciones séricas de carvedilol racémico y el efecto hipotensor. En el caso del carvedilol se ha demostrado además la existencia de una farmacocinética enantioselectiva en todos los modelos estudiados. La respuesta antihipertensiva del carvedilol mostró una mayor eficacia en los diferentes modelos de hipertensión arterial, producto del incremento en la actividad simpaticolítica vascular determinada a través del análisis espectral del registro de presión arterial. Los estudios realizados también documentaron que el carvedilol es altamente efectivo en la reducción de la VPA de corto plazo, tanto en animales normotensos como en los diferentes modelos de hipertensión arterial. Dicha efectividad

supera claramente a la del β -bloqueante de segunda generación, atenolol. En la evaluación del nebivolol, los estudios realizados en los tres modelos de hipertensión experimental establecieron que este agente también se caracteriza por presentar cinética enantioselectiva, la cual se encuentra afectada en la rata SH y en animales con sobrecarga de fructosa. A diferencia del carvedilol no se ha demostrado una relación entre el nivel plasmático de nebivolol con la respuesta antihipertensiva debido a la respuesta hipotensora sostenida. Los modelos experimentales de hipertensión espontánea o por administración crónica de L-NAME evidencian mayor respuesta hipotensora al nebivolol en comparación con animales normotensos producto a la mayor acción vasodilatadora. En cambio, no se registraron cambios en el efecto hipotensor en animales con sobrecarga de fructosa respecto del grupo control. Los experimentos llevados a cabo en los tres modelos de hipertensión experimental establecieron, además, que el nebivolol es capaz de atenuar en forma altamente efectiva la VPA de corto plazo tanto en animales normotensos como en ratas hipertensas. Al igual que en el caso del carvedilol, el nebivolol también ha mostrado una eficacia mayor a la del atenolol para la reducción de la presión arterial central y de la VPA de corto plazo y latido- a-latido.

PERSPECTIVAS

Los hallazgos del trabajo de tesis, en conjunto con evidencias clínicas recientes, sugieren la importancia de un cambio en el concepto del papel de los bloqueantes β -adrenérgicos de tercera generación en el tratamiento de la hipertensión arterial no complicada. Los β -bloqueantes representan un grupo farmacológico de relevancia en el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares, considerando sus acciones antihipertensivas, antiisquémicas, antiarrítmicas y cardioprotectoras. Sin embargo, a partir de la evidencia de una menor eficacia en la prevención de eventos cardiovasculares mayores, en pacientes con hipertensión arterial respecto de otros antihipertensivos de primera línea, los β -bloqueantes han quedado relegados en esta indicación. Las últimas guías farmacoterapéuticas -JNC VIII y NICE- excluyen a este grupo terapéutico dentro de los antihipertensivos para el inicio del tratamiento de la hipertensión arterial e inclusive tampoco recomiendan el agregado de β -bloqueantes en pacientes con hipertensión no controlada con un único antihipertensivo. Varias de las recomendaciones incluidas en las guías farmacoterapéuticas se basan en gran medida en los resultados obtenidos de estudios de meta-análisis que compararan grupos farmacológicos más que en estudios clínicos comparativos. Estos análisis, si bien deben ser considerados válidos, están limitados por el hecho de que agrupan las evidencias obtenidas de ensayos clínicos de diferentes fármacos dentro de un grupo terapéutico, los cuales no necesariamente comparten las mismas acciones farmacológicas. En el caso de los β -bloqueantes, las revisiones sistemáticas que compararon la eficacia de este grupo respecto de otras clases de antihipertensivos incluyeron en mayor proporción ensayos clínicos realizados con el atenolol.

En este contexto, la evidencia clínica y los resultados de esta tesis sugieren que la consideración de β -bloqueantes como un grupo farmacológico homogéneo en términos de propiedades farmacológicas y beneficios clínicos representa probablemente un error terapéutico. Los β -bloqueantes vasodilatadores de tercera generación –carvedilol y nebivolol- carecen de las limitaciones descritas para el antagonista cardioselectivo atenolol, entre ellas el desarrollo de insulinoresistencia, las alteraciones lipídicas y la baja capacidad de reducir la presión arterial central y la VPA. En este último punto, los hallazgos de esta tesis han demostrado que tanto carvedilol como nebivolol son marcadamente superiores al atenolol en cuanto a la reducción de la presión arterial carotídea y la VPA de corto plazo, en especial en los modelos experimentales de hipertensión esencial y disfunción endotelial. La experiencia clínica ha establecido además que los β -bloqueantes vasodilatadores de tercera generación inducen un efecto antihipertensivo similar a otros grupos de fármacos de primera línea y tienen un perfil metabólico y de eventos adversos favorable (Kallistratos y cols., 2014).

Teniendo en cuenta este análisis, resulta primordial la realización de extensos estudios clínicos que comparen la eficacia y seguridad de carvedilol y nebivolol respecto de otros antihipertensivos de primera línea –bloqueantes cálcicos e inhibidores del SRA- en la prevención de eventos cardiovasculares mayores en pacientes con hipertensión arterial no complicada. Tanto carvedilol como nebivolol fueron intensamente evaluados en pacientes con insuficiencia cardíaca y los estudios clínicos que determinaron su eficacia antihipertensiva son relativamente limitados en términos de cantidad de pacientes incluidos y grupos comparadores. Dado que hoy en día las decisiones terapéuticas se sostienen en la medicina basada en la evidencia, es probable que los β -bloqueantes vasodilatadores de tercera generación logren mayor consideración en el

tratamiento de la hipertensión arterial sólo a partir de la obtención de resultados favorables en ensayos clínicos comparativos.

REFERENCIAS

Abboud FM. The sympathetic system in hypertension. State-of-the-art review. *Hypertension* 1982; 3: 208-25.

Adams MA, Bobik A, Korner PI. Differential development of vascular and cardiac hypertrophy in genetic hypertension. Relation to sympathetic function. *Hypertension* 1989; 14: 191-202.

Aimone LD. Overview of pharmacokinetics. *Curr Protoc Pharmacol* 2005; 7: 1–26.

Akselrod S, Gordon D, Ubel FA, Shannon DC, Berger AC, Cohen RJ. Power spectrum analysis of heart rate fluctuation: a quantitative probe of beat-to-beat cardiovascular control. *Science* 1981; 213: 220-2.

Augustyniak RA, Victor RG, Morgan DA, Zhang W. L-NAME- and ADMA-induced sympathetic neural activation in conscious rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006; 290: R726-3.

Bauer JA, Balthasar JP, Fung HL Application of pharmacodynamic modeling for designing time-variant dosing regimens to overcome nitroglycerin tolerance in experimental heart failure. *Pharm Res* 1997; 14: 1140-5.

Bertera F, Di Verniero CA, Mayer MA, Chiappetta D, Buontempo F, Polizio AH, Taira CA, Höcht C. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of carvedilol in fructose hypertensive rats. *Xenobiotica* 2012; 42: 206-19.

Bertera FM, Del Mauro JS, Lovera V, Chiappetta D, Polizio AH, Taira CA, Höcht C. Acute effects of third generation β -blockers on short-term and beat-to-beat blood pressure variability in sinoaortic-denervated rats. *Hypertens Res* 2013; 36: 349-55.

Bertera FM, Di Verniero CA, Mayer MA, Bramuglia GF, Taira CA, Höcht C: Is urethane-chloralose anaesthesia appropriate for pharmacokinetic-pharmacodynamic assessment? Studies with carvedilol. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2009; 59: 13-20.

Bhushan R, Dixit S. Enantioresolution of five β -blockers by reversed-phase high-performance liquid chromatography using fifteen chiral derivatizing reagents having amino acids or their amides as chiral auxiliaries on a cyanuric chloride platform. *Biomed Chromatogr* 2012; 26: 239-46.

Biancardi VC, Bergamaschi CT, Lopes OU, Campos RR. Sympathetic activation in rats with L-NAME-induced hypertension. *Braz J Med Biol Res* 2007; 40: 401-8.

Blanc J, Lambert G, Elghozi JL. Activation of the renin-angiotensin system and blood pressure variability in rats. *Arch Mal Coeur Vaiss* 2000; 93: 1019-22.

Brynne L, Karlsson MO, Paalzow LK. Concentration-effect relationship of l-propranolol and metoprolol in spontaneous hypertensive rats after exercise-induced tachycardia. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 286: 1152-8.

Cağlar N, Dincer I. Comparison between neбивolol and ramipril in patients with hypertension and left ventricular hypertrophy: a randomized open blinded end-point (PROBE) trial. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2011; 15: 1359-68.

Carella AM, Antonucci G, Conte M, Di Pumpo M, Giancola A, Antonucci E. Antihypertensive treatment with beta-blockers in the metabolic syndrome: a review. *Curr Diabetes Rev* 2010; 6: 215-21.

Chiladakis JA, Georgiopoulou E, Alexopoulos D. Autonomic effects of nebivolol versus atenolol in healthy subjects. *Cardiovasc Drugs Ther* 2004; 18: 469-73.

Consejo Argentino de Hipertensión Arterial "Dr. Eduardo Braun Menéndez". Normas de diagnóstico y tratamiento de Hipertensión Arterial. *Rev Argent Cardiol* 1998; 66: 1-102.

Courand PY, Lantelme P. Significance, prognostic value and management of heart rate in hypertension. *Arch Cardiovasc Dis* 2014; 107: 48-57.

Csajka C, Verotta D. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling: history and perspectives. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 2006; 33: 227-79.

D'Argenio DZ, Schumitzky A: ADAPT II User's Guide: Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Systems Analysis Software. Los Angeles: Biomedical Simulations Resource, 1997.

Dayneka NL, Garg V, Jusko WJ. Comparison of four basic models of indirect pharmacodynamic responses. *J Pharmacokinet Biopharm* 1993; 21: 457-78.

Derendorf H, Lesko LJ, Chaikin P, Colburn WA, Lee P, Miller R, Powell R, Rhodes G, Stanski D, Venitz J. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling in drug research and development. *J Clin Pharmacol* 2000; 40: 1399-418.

Dhakam Z, McEniery CM, Burton T, Brown MJ, Wilkinson B. A comparison of atenolol and nebivolol in isolated systolic hypertension. *J Hypertens* 2008; 26: 351-6.

Dhakam Z, Yasmin, McEniery CM, Burton T, Brown MJ, Wilkinson IB. A comparison of atenolol and nebivolol in isolated systolic hypertension. *J Hypertens* 2008; 26: 351-6.

Di Verniero CA, Bertera F, Buontempo F, Bernabeu E, Chiappetta D, Mayer MA, Bramuglia GF, Taira CA, Höcht C. Enantioselective pharmacokinetic pharmacodynamic modelling of carvedilol in a N-nitro-l-arginine methyl ester rat model of secondary hypertension. *J Pharm Pharmacol* 2010; 62: 890-900.

Di Verniero CA, Silberman EA, Mayer MA, Opezzo JA, Taira CA, Höcht C: In vitro and in vivo pharmacodynamic properties of metoprolol in fructose-fed hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2008; 51: 532-41.

Díez J, López B, González A, Querejeta R. Clinical aspects of hypertensive myocardial fibrosis. *Curr Opin Cardiol* 2001; 16: 328-35.

Dornas WC1, Silva ME. Animal models for the study of arterial hypertension. *J Biosci* 2011; 36: 731-7.

Dos Santos FM, Martins Dias DP, da Silva CA, Fazan R Jr, Salgado HC. Sympathetic activity is not increased in L-NAME hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2010; 298: R89-95.

Eckberg DL. Sympathovagal balance: a critical appraisal. *Circulation* 1997; 4; 96: 3224-32.

Elliott WJ, Childers WK. Should beta blockers no longer be considered first-line therapy for the treatment of essential hypertension without comorbidities? *Curr Cardiol Rep* 2011; 13: 507-16.

Esler M, Zweifler A, Randall O, DeQuattro V. Pathophysiologic and pharmacokinetic

determinants of the antihypertensive response to propranolol. *Clin Pharmacol Ther* 1997; 22: 299-308.

European Society of Hypertension–European Society of Cardiology guidelines for the management of arterial hypertension. *J Hypertens* 2003; 21: 1011-53.

Fazan R Jr, Huber DA, Silva CA, Dias da Silva VJ, Salgado MC, Salgado HC. Sildenafil acts on the central nervous system increasing sympathetic activity. *J Appl Physiol* 2008; 104: 1683-9.

Frishman WH. Beta blockers as cardioprotective agents: Part I--Insights into mechanisms of action. *Am J Manag Care* 2002; 8: 13-7.

Frishman WH. Carvedilol. *N Engl J Med* 1998; 339: 1759-65.

Fujimaki M. Stereoselective disposition and tissue distribution of carvedilol enantiomers in rats. *Chirality* 1992; 4: 148–54.

Gao Y, Vanhoutte PM. Nebivolol: an endothelium-friendly selective β_1 -adrenoceptor blocker. *J Cardiovasc Pharmacol* 2012; 59: 16-21.

Gengo F, Green JA. Beta Blockers. Applied pharmacokinetics. Principles of therapeutic drug monitoring. Evans WE, Schentag JJ, Jusko WJ (eds.). 2da ed, 1986.

Gibaldi M, Perrier D: Pharmacokinetics, 2nd ed., New York: Marcel Dekker Inc., 1982.

Grassi G, Bombelli M, Brambilla G, Trevano FQ, Dell'oro R, Mancia G. Total cardiovascular risk, blood pressure variability and adrenergic overdrive in hypertension: evidence, mechanisms and clinical implications. *Curr Hypertens Rep* 2012; 14: 333-8.

Grassi G. Role of the sympathetic nervous system in human hypertension. *J Hypertens* 1998; 16: 1979-87.

Herrera AM1, Scott DO, Lunte CE. Microdialysis sampling for determination of plasma protein binding of drugs. *Pharm Res* 1990; 7: 1077-81.

Höcht C, Bertera FM, Del Mauro JS, Taira CA. Models for evaluating the pharmacokinetics and pharmacodynamics for β -blockers. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2014; 10: 525-41.

Höcht C, Bertera FM, Mayer MA, Taira CA. Issues in drug metabolism of major antihypertensive drugs: beta-blockers, calcium channel antagonists and angiotensin receptor blockers. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2010; 6: 199-211.

Höcht C, Del Mauro JS, Bertera FM, Taira CA. Drugs affecting blood pressure variability: an update. *Curr Pharm Des* 2015; 21: 744-55.

Höcht C, Di Verniero C, Opezzo JA, Bramuglia GF, Taira CA Pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) modeling of cardiovascular effects of metoprolol in spontaneously hypertensive rats: a microdialysis study. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2006; 373: 310-8.

Höcht C, Di Verniero C, Opezzo JA, Bramuglia GF, Taira CA. Pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) modeling of cardiovascular effects of metoprolol in spontaneously hypertensive rats: a microdialysis study. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2006; 373: 310-8.

Höcht C, Mayer MA, Opezzo JAW, Bertera FM, Taira CA: Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of antihypertensive drugs: from basic research to clinical practice. *Curr Hypertens Rev* 2008; 4: 289–302.

Höcht C, Opezzo JA, Taira CA. Pharmacokinetics and the cardiovascular effects of irbesartan in aortic coarctated rats. *Pharmacology* 2004; 70: 23-30.

Howlett JG. Nebivolol: vasodilator properties and evidence for relevance in treatment of cardiovascular disease. *Can J Cardiol* 2014; 30 (5 Suppl): S29-37.

Isanta JR, Lasheras B, Fos D, Cenarruzabeitia E. Comparative diltiazem plasma clearance in normotensive and hypertensive rats. *J Pharm Sci* 1987; 76: 862-5.

Ishida K1, Taira S, Morishita H, Kayano Y, Taguchi M, Hashimoto Y. Stereoselective oxidation and glucuronidation of carvedilol in human liver and intestinal microsomes. *Biol Pharm Bull* 2008; 31: 1297-300.

Izzo Jr. JL. Sympathetic nervous system in acute and chronic blood pressure elevation. *Hypertension* 2000; 42-58.

Janssen BJ, Oosting J, Slaaf DW, Persson PB, Struijker-Boudier HA. Hemodynamic basis of oscillations in systemic arterial pressure in conscious rats. *Am J Physiol* 1995; 269: H62-H71.

Kallistratos MS, Poulimenos LE, Manolis AJ. Vasodilator β -blockers: a different class of antihypertensive agents? *Future Cardiol* 2014; 10: 669-71

Kampus P, Serg M, Kals J, Zagura M, Muda P, Karu K, Zilmer M, Eha J. Differential effects of neбиволол and metoprolol on central aortic pressure and left ventricular wall thickness. *Hypertension* 2011; 57: 1122-8.

Keating GM, Jarvis B. Carvedilol: a review of its use in chronic heart failure. *Drugs* 2003; 63: 1697-74.

Kikuya M, Ohkubo T, Metoki H et al. Day-by-day variability of blood pressure and heart rate at home as a novel predictor of prognosis: the Ohasama study. *Hypertension* 2008; 52: 1045-50.

Kolb B, Rotella DL, Stauss HM. Frequency response characteristics of cerebral blood flow autoregulation in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292: H432-8.

Krakoff LR, Gillespie RL, Ferdinand KC, Fergus IV, Akinboboye O, Williams KA, Walsh MN, Bairey Merz CN, Pepine CJ. 2014 hypertension recommendations from the eighth joint national committee panel members raise concerns for elderly black and female populations. *J Am Coll Cardiol* 2014; 64: 394-402.

Kuroedov A, Cosentino F, Lüscher TF. Pharmacological mechanisms of clinically favorable properties of a selective beta1-adrenoceptor antagonist, nebivolol. *Cardiovasc Drug Rev* 2004; 22: 155-68.

Lefebvre J, Poirier L, Poirier P, Turgeon J, Lacourciere Y. The influence of CYP2D6 phenotype on the clinical response of nebivolol in patients with essential hypertension. *Br J Clin Pharmacol* 2007; 63: 575-82.

Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R; Prospective Studies Collaboration. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet* 2002; 360: 1903-13.

Louis WJ, McNeil JJ, Workman BS, Drummer OH, Conway EL: A pharmacokinetic study of carvedilol (BM 14.190) in elderly subjects: preliminary report. *J Cardiovasc Pharmacol* 1987; 10 (Suppl 11): S89-93.

Mancia G, Bombelli M, Corrao G, Facchetti R, Madotto F, Giannattasio C, Trevano FQ, Grassi G, Zanchetti A, Sega R. Metabolic syndrome in the Pressioni Arteriose Monitorate E Loro Associazioni (PAMELA) study: daily life blood pressure, cardiac damage, and prognosis. *Hypertension* 2007; 49: 40–7.

Mandema JW, Verotta D, Sheiner LB. Building population pharmacokinetic--pharmacodynamic models. I. Models for covariate effects. *J Pharmacokinetic Biopharm* 1992; 20: 511-28.

Mason RP, Giles TD, Sowers JR. Evolving mechanisms of action of beta blockers: focus on neбиволол. *J Cardiovasc Pharmacol* 2009; 54: 123-8.

Meier K, Gorbey S, Lemmer B. Effects of neбиволол and metoprolol on nitric oxide urinary excretion, on expression of eNOS and on blood pressure in SH-rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2004; 369 (Suppl 1): R42.

Meredith PA. Clinical relevance of optimal pharmacokinetics in the treatment of hypertension. *J Hypertens Suppl* 1997; 15: S27-31.

Nafz B, Just A, Stauss HM, Wagner CD, Ehmke H, Kirchheim HR, Persson PB. Blood-pressure variability is buffered by nitric oxide. *J Auton Nerv Syst* 1996; 57: 181-3.

Neugebauer G, Akpan W, Kaufmann B, Reiff K: Stereoselective disposition of carvedilol in man after intravenous and oral administration of the racemic compound. *Eur J Clin Pharmacol* 1990; 38(Suppl. 2): S108–S111.

Norman RA Jr, Dzielak DJ. Spontaneous hypertension is primarily the result of sympathetic overactivity and immunologic dysfunction. *Proc Soc Exp Biol Med* 1986; 182: 448-53.

O'Brien E. Stabilizing blood pressure variability: a new therapeutic target in hypertension. *Medicographia* 2012; 34: 25–31.

O'Leary DD, Shoemaker JK, Edwards MR, Hughson RL. Spontaneous beat-by-beat fluctuations of total peripheral and cerebrovascular resistance in response to tilt. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 287: R670-9.

Orellana MB, Guajardo T. Actividad del citocromo P450 y su alteración en diversas patologías. *Rev Med Chile* 2004; 132: 85-94.

Parati G. Blood pressure variability: its measurement and significance in hypertension. *J Hypertens* 2005; 23(Suppl. 1): S19–S25.

Pérez-Urizar J, Granados-Soto V, Flores-Murrieta FJ, Castañeda-Hernández G. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling: why? *Arch Med Res* 2000; 31: 539-45.

Phuong NT, Lee BJ, Choi JK, Kang JS, Kwon KI: Enantioselective pharmacokinetics of carvedilol in human volunteers. *Arch Pharm Res* 2004; 27: 973–7.

Pires de Abreu LR, de Castro SA, Pedrazzoli J Jr. Atenolol quantification in human plasma by high-performance liquid chromatography: application to bioequivalence study. *AAPS PharmSci* 2003; 5: E21.

Pladys P, Lahaie I, Cambonie G, Thibault G, Lê NL, Abran D, Nuyt AM. Role of brain and peripheral angiotensin II in hypertension and altered arterial baroreflex programmed during fetal life in rat. *Pediatr Res* 2004; 55: 1042–9.

Polónia J, Barbosa L, Silva JA, Bertoquini S. Different patterns of peripheral versus central blood pressure in hypertensive patients treated with β -blockers either with or without vasodilator properties or with angiotensin receptor blockers. *Blood Press Monit* 2010; 15: 235-9.

Pomeranz B, Macaulay RJ, Caudill MA, Kutz I, Adam D, Gordon D, Kilborn KM, Barger AC, Shannon DC, Cohen RJ, et al. Assessment of autonomic function in humans by heart rate spectral analysis. *Am J Physiol* 1985; 248: H151-3.

Ponchon P, Elghozi JL. Contribution of humoral systems to the short-term variability of blood pressure after severe hemorrhage. *Am J Physiol* 1997; 273: R58-69.

Ponchon P, Elghozi JL. Contribution of the renin-angiotensin and kallikrein-kinin systems to short-term variability of blood pressure in two-kidney, one-clip hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 1996; 297: 61-70.

Reaven GM, Ho H, Hoffmann BB. Somatostatin inhibition of fructose-induced hypertension. *Hypertension* 1989; 14: 117-20.

Rigby JW, Scott AK, Hawksworth GM, Petrie JC. A comparison of the pharmacokinetics of atenolol, metoprolol, oxprenolol and propranolol in elderly hypertensive and young healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol* 1985; 20: 327-31.

Ripley TL, Saseen JJ. β -blockers: a review of their pharmacological and physiological diversity in hypertension. *Ann Pharmacother* 2014; 48: 723-33.

Roberts CK, Vaziri ND, Wang XQ, Barnard RJ. Enhanced NO inactivation in hypertension induced by a high-fat, refined-carbohydrate diet. *Hypertension* 2000; 36: 423-9.

Roman MJ, Devereux RB, Kizer JR. Central pressure more strongly relates to vascular disease and outcome than does brachial pressure: the Strong Heart Study. *Hypertension* 2007; 50: 197-203.

Rothwell PM, Howard SC, Dolan E, O'Brien E, Dobson JE, Dahlöf B, Poulter NR, Sever PS. ASCOT-BPLA and MRC Trial Investigators. Effects of beta-blockers and calcium channel blockers on within-individual variability in blood pressure and risk of stroke. *Lancet Neurol* 2010; 9: 469–80.

Rothwell PM. Does blood pressure variability modulate cardiovascular risk? *Curr Hypertens Rep* 2011; 13: 177-86.

Ruffolo RR Jr, Gellai M, Hieble JP, Willette RN, Nichols AJ. The pharmacology of carvedilol. *Eur J Clin Pharmacol* 1990; 38 (Suppl 2): S82-8.

Sacco G, Evangelista S, Criscuoli M, Goso C, Bigioni M, Binaschi M, Manzini S, Maggi CA. Involvement of nitric oxide in both central and peripheral haemodynamic effect of D/L-nebivolol and its enantiomers in rats. *Eur J Pharmacol* 2005; 511:167-74.

Sasaki K, Maruyama R. Consciously controlled breathing decreases the high-frequency component of heart rate variability by inhibiting cardiac parasympathetic nerve activity. *Tohoku J Exp Med* 2014; 233: 155-63.

Schillaci G, Pucci G, Parati G. Blood pressure variability: an additional target for antihypertensive treatment? *Hypertension* 2011; 58: 133-5.

Schutte AE, Schutte R, Huisman HW, van Rooyen JM, Fourie CM, Malan NT, Malan L. Blood pressure variability is significantly associated with ECG left ventricular mass in normotensive Africans: the SABPA Study. *Hypertens Res* 2011; 34: 1127-34.

Shaw AA, Liu S, Zachwieja LF. Effect of chronic administration of fluoxetine on the pharmacokinetics of nebivolol. *Clin Pharmacol Ther* 2005; 77: P38.

Shimbo D, Shea S, McClelland RL et al. Associations of aortic distensibility and arterial elasticity with long-term visit-to-visit blood pressure variability: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Am J Hypertens* 2013; 26: 896-902.

Souza HC, Martins-Pinge MC, Dias da Silva VJ, Borghi-Silva A, Gastaldi AC, Blanco JH, Tezini GC. Heart rate and arterial pressure variability in the experimental renovascular hypertension model in rats. *Auton Neurosci* 2008; 139: 38–45.

Stahl E, Mutschler E, Baumgartner U, Spahn-Langguth H. Carvedilol stereopharmacokinetics in rats: affinities to blood constituents and tissues. *Arch Pharm (Weinheim)* 1993; 326: 529-33.

Stauss HM. Identification of blood pressure control mechanisms by power spectral analysis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007; 34: 362–88.

Steg PG, Ferrari R, Ford I, Greenlaw N, Tardif JC, Tendera M, Abergel H, Fox KM. Heart rate and use of beta-blockers in stable outpatients with coronary artery disease. *PLoS One* 2012; 7: e36284.

Stergiou GS, Argyraki KK, Moyssakis I, Mastorantonakis SE, Achimastos AD, Karamanos VG, Roussias LG. Home blood pressure is as reliable as ambulatory blood pressure in predicting target-organ damage in hypertension. *Am J Hypertens* 2007; 20: 616-21.

Su DF, Miao CY. Blood pressure variability and organ damage. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2001; 28: 709-15.

Tenero DM, Henderson LS, Campanile AM, Baidoo CA, Boyle D Development of a pharmacokinetic/pharmacodynamic model for carvedilol to predict beta1-blockade in patients with congestive heart failure. *Am J Cardiol* 2006; 98: 27L-31L.

Toutain PL. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic integration in drug development and dosage-regimen optimization for veterinary medicine. *AAPS PharmSci* 2002; 4: 1-29.

Tran LT, MacLeod KM, McNeill JH. Selective alpha(1)-adrenoceptor blockade prevents fructose-induced hypertension. *Mol Cell Biochem* 2014; 392: 205-11.

Trudeau L. Central blood pressure as an index of antihypertensive control: determinants and potential value. *Can J Cardiol* 2014; 30(5 Suppl): S23-8.

Tsoporis JI, Leenen FH. Effects of arterial vasodilators on cardiac hypertrophy and sympathetic activity in rats. *Hypertension* 1988; 11: 376-86.

Van Bortel LM, Fici F, Mascagni F. Efficacy and tolerability of nebivolol compared with other antihypertensive drugs: a meta-analysis. *Am J Cardiovasc Drugs* 2008; 8: 35-44.

Van de Water A, Janssens W, Van Neuten J, Xhonneux R, De Cree J, Verhaegen H, Reneman RS, Janssen PA .Pharmacological and hemodynamic profile of nebivolol, a chemically novel, potent, and selective beta 1-adrenergic antagonist. *J Cardiovasc Pharmacol*1998; 11: 552-63.

Vanhoutte PM, Gao Y. Beta blockers, nitric oxide, and cardiovascular disease. *Curr Opin Pharmacol* 2013; 13: 265-73.

Verbeeck RK. Pharmacokinetics and dosage adjustment in patients with hepatic dysfunction. *Eur J Clin Pharmacol* 2008; 64: 1147-61.

Wang XM, Yu XY, Lin SG. Pharmacokinetics of atenolol enantiomers in 12 Chinese healthy men. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 1999; 20: 367-70.

Wardener HE. The Hypothalamus and Hypertension. *Physiol Rev* 2001; 81: 1599-658.

Wilkinson GR. Farmacocinética: dinámicas de absorción, distribución y eliminación de fármacos. En: Hardman JG, Limbird LE, Gilman A (eds) Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 2001; Mc Graw Hill, New York, pp 5-34.

Yuan N, Zhang F, Zhang LL, Gao J, Zhou YB, Han Y, Zhu GQ. SOD1 gene transfer into paraventricular nucleus attenuates hypertension and sympathetic activity in spontaneously hypertensive rats. *Pflugers Arch* 2013; 465: 261-70.

Zhou HH, Wood AJ: Stereoselective disposition of carvedilol is determined by CYP2D6. *Clin Pharmacol Ther* 1995; 57: 518–24.