

Propiedades farmacodinámicas *in vitro* de los bloqueantes β -adrenérgicos propranolol y atenolol en ratas con coartación aórtica

CARLA DI VERNIERO¹, CHRISTIAN HÖCHT, JAVIER A. W. OPEZZO, CARLOS A. TAIRA¹

Recibido: 03/2003

Aceptado: 06/2003

Dirección para separatas:
Christian Höcht, Cátedra de
Farmacología, Facultad de
Farmacia y Bioquímica,
Universidad de Buenos Aires,
Batalla de Junín 956, C1113AAD
Buenos Aires, Argentina
Tel. + (54-11)-4964-8265
Fax. + (54-11)-4508-3645
E-mail: chocht@ffyba.uba.ar

RESUMEN

Con el propósito de determinar *in vitro* si la coartación aórtica en un estadio temprano de hipertensión arterial modifica las propiedades farmacodinámicas de los bloqueantes β -adrenérgicos atenolol y propranolol, se estudiaron la constante de disociación y la actividad de agonismo inverso de los bloqueantes en aurícula aislada de ratas con coartación aórtica (CoA) y de ratas con operación simulada (OS).

Para la determinación de la constante de disociación se midió el desplazamiento de la curva concentración-efecto cronotrópico de noradrenalina por agregado de distintas concentraciones de atenolol o de propranolol. El estudio del agonismo inverso de los bloqueantes se realizó mediante la construcción de la curva concentración-respuesta cronotrópica del atenolol y del propranolol.

Entre ambos grupos experimentales no se observaron diferencias en la constante de disociación de atenolol (pK_b ratas OS: $7,36 \pm 0,23$; ratas CoA: $7,17 \pm 0,22$) y de propranolol (pK_b ratas OS: $8,06 \pm 0,18$; ratas CoA: $8,15 \pm 0,19$). Tampoco se hallaron diferencias en la actividad de agonismo inverso de atenolol (ratas OS: pCE_{50} : $6,44 \pm 0,17$, $n = 5$; ratas CoA: pCE_{50} : $6,13 \pm 0,28$, $n = 5$) y propranolol (ratas OS: pCE_{50} : $5,35 \pm 0,11$, $n = 5$; ratas CoA: pCE_{50} : $5,70 \pm 0,19$, $n = 5$) entre controles y ratas coartadas.

En conclusión, la afinidad y la actividad de agonismo inverso de atenolol y propranolol no estarían alteradas en las ratas con coartación aórtica en un estadio hipertensivo temprano. REV ARGENT CARDIOL 2003; 71: 339-343.

Palabras clave

> Atenolol - Propranolol - Aurícula - Coartación aórtica - Constante de disociación - Agonismo inverso - Cronotropismo

INTRODUCCIÓN

En modelos de hipertensión experimental como las ratas SH, (1) DOCA-salt y ratas con hipertensión renal (2) se ha demostrado una reducción del número de adrenoceptores β cardíacos debida a la sobreactivación simpática. Además, se observaron eventos posreceptor, por ejemplo, desensibilización de adenilciclase. (3)

En el modelo de hipertensión por coartación de la aorta (CoA) entre las dos arterias renales existiría un compromiso de los mecanismos reguladores (barorreflejo, sistema renina-angiotensina y vasopresina) y cambios estructurales de vasos y corazón. (4-7)

En este modelo, los adrenoceptores β no se han estudiado profundamente y los datos existentes son controversiales. Cervoni y colaboradores (8) no encontraron diferencias en la reactividad cardíaca y en el número y afinidad de adrenoceptores β en ratas con CoA en un estadio temprano (6 días) y crónico (28 días) de hipertensión arterial. En nuestro laborato-

rio, las ratas con CoA presentaron una reactividad cronotrópica menor a la noradrenalina, que indica una posible desensibilización del adrenoceptor β . (9) Por otro lado, no existiría evidencia de sobreactivación simpática en estadios tempranos de la hipertensión arterial en este modelo experimental. Goldstein y colaboradores (10) observaron, en cambio, una disponibilidad menor de noradrenalina en el miocardio de ratas coartadas con hipertensión temprana (6 días) y crónica (42 días).

Recientemente se demostró que los bloqueantes β -adrenérgicos como el atenolol, selectivo β_1 , y el propranolol, no selectivo, presentan actividad de agonismo inverso en el corazón. (11) Además, Maack y colaboradores (12) demostraron que la desensibilización de adrenoceptores β en la falla cardíaca alteraría la actividad de agonismo inverso de los β -bloqueantes. En el caso de la CoA habría una desensibilización de adrenoceptores β cardíacos como se observó en este laboratorio (9) y esta alteración podría modificar la farmacodinamia de drogas adrenérgicas.

Teniendo en cuenta esta desensibilización de adrenoreceptores β cardíacos, (9) el presente trabajo se propuso estudiar *in vitro* si existe una alteración de las propiedades farmacodinámicas de los β -bloqueantes propranolol y atenolol en ratas con CoA en un estadio hipertensivo temprano (7 días).

MATERIAL Y MÉTODOS

Inducción de la hipertensión

Se utilizaron ratas Wistar macho (250-350 g). La coartación aórtica se realizó según el método de Rojo-Ortega y Genest (13) en ratas anestesiadas con éter. La técnica consiste en la ligadura de la arteria aorta en la porción comprendida entre las dos arterias renales, que comprometiera sólo un riñón. A las ratas controles se les practicó una operación simulada (OS). Los experimentos se realizaron a los siete días de la operación correspondiente.

Efectos cronotrópicos del atenolol y el propranolol en aurícula aislada

Se extrajeron los corazones de los animales sacrificados por dislocación cervical y se colocaron en placas de Petri con solución salina compuesta de (g.l⁻¹): NaCl 6,93; KCl 0,36; KH₂PO₄ 0,16; CaCl₂·2H₂O 0,25; MgSO₄·7H₂O 0,33 y dextrosa 2,0. Las aurículas se aislaron de tejido conectivo y de los ventrículos. Las aurículas se montaron en un baño de órgano y un extremo se conectó a un transductor de fuerza Grass FT.03 y los registros se efectuaron en un polígrafo Grass 79E. La temperatura del baño fue de 37°C y se burbujeó con O₂ (95%) y CO₂ (5%). Se aplicó una tensión de 1 g a las aurículas.

Las aurículas se dejaron equilibrar por 45 min, lavándolas cada 15 min. Las drogas se agregaron cuando la velocidad de despolarización espontánea del preparado no variaba en más del 5% durante un período de 10 min de observación.

En el estudio de potencia del propranolol y el atenolol se realizó una curva concentración-respuesta de noradrenalina acumulativa de 10⁻⁹ a 10⁻⁴ M de noradrenalina. Luego se lavó el preparado hasta obtener la frecuencia de despolarización inicial. Se agregó propranolol o atenolol en una concentración de 0,01; 0,1 ó 1 μ M. Se dejó equilibrar durante 20 min y se repitió la curva de noradrenalina.

En el estudio de la actividad de agonismo inverso de propranolol y atenolol se realizó una curva concentración-respuesta acumulativa del bloqueante β correspondiente en las siguientes concentraciones: 10⁻⁸, 10⁻⁷, 10^{-6.5}, 10⁻⁶, 10^{-5.5}, 10⁻⁵, 10^{-4.5} M.

Análisis de datos y estadística

En el estudio de la constante de disociación (K_b) del propranolol y el atenolol en aurícula aislada se calculó la CE₅₀ y E_{máx} de noradrenalina de las curvas control y previo agregado de 0,01; 0,1 y 1 μ M de atenolol o propranolol mediante regresión no lineal.

Los datos de pCE₅₀ obtenidos se ajustaron por regresión no lineal a la siguiente ecuación: (14)

$$Y = -1 * \log[(X * 1e^{-6}) + (10^{\log K_b})] - P,$$

donde Y es el -logaritmo de la CE₅₀, X es el logaritmo de la concentración molar de atenolol o propranolol, K_b es la constante de disociación de atenolol o propranolol y P es una constante.

Para comprobar la validez de la determinación de K_b, se comparó la regresión no lineal de los datos de pCE₅₀ en fun-

ABREVIATURAS

CoA	Coartación de la aorta
OS	Operación simulada
PAM	Presión arterial media

ción de la concentración molar de atenolol o propranolol de las siguientes ecuaciones:

$$a) Y = -1 * \log[(x * 1e^{-6}) + (10^{\log K_b})] - P$$

$$b) Y = -1 * \log[(x * 1e^{-6 * \text{slope}}) + (10^{\log K_b})] - P$$

mediante la prueba de F. Si la ecuación más simple es la mejor ecuación, la estimación de K_b es válida. (14)

En el estudio de la actividad de agonismo inverso del propranolol y el atenolol se calculó la CE₅₀ y el E_{máx} de la curva concentración-respuesta de la droga mediante el uso de una regresión no lineal.

Los datos se expresaron como media \pm error estándar de la media (EEM). La distribución normal de las variables se verificó por la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Las comparaciones entre medias se realizó mediante la prueba de t de Student. (15)

En todos los cálculos se utilizó el programa de estadística GraphPad Prism versión 3.00 (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

Drogas

Se emplearon: noradrenalina (Sigma Chemical Co., USA), atenolol (Droguería Saporiti SACIFI., Argentina) y propranolol (Sigma Chemical Co., USA).

RESULTADOS

Valores de presión arterial y de frecuencia cardíaca

A los siete días de la operación correspondiente, los valores de presión arterial media (PAM) y de frecuencia cardíaca obtenidos a partir del registro intraarterial de presión sanguínea fueron en las ratas conscientes con operación simulada (OS, n = 20) de 101,6 \pm 3,3 mm Hg y de 357 \pm 6 lpm y en los animales con coartación aórtica (CoA, n = 20) de 161,5 \pm 5,3 mm Hg (p < 0,05 *versus* ratas OS) y de 384 \pm 23 lpm.

Estudio de la constante de disociación del propranolol y el atenolol en aurícula aislada

No se observó hipertrofia de los corazones extraídos de las ratas coartadas para este estudio. Los valores basales de despolarización espontánea de las aurículas fueron similares en las ratas OS (252 \pm 10 lpm, n = 20) y en las CoA (254 \pm 10 lpm, n = 20).

En la Tabla 1 se muestran los parámetros farmacodinámicos pCE₅₀ y E_{máx} de respuesta cronotrópica de la aurícula aislada a la estimulación de noradrenalina previo agregado de atenolol en ratas OS y CoA. Estos parámetros se determinaron de la curva concentración-respuesta de noradrenalina en las ratas control y en coartadas.

La Figura 1 muestra el gráfico de pCE₅₀ en función del logaritmo de la concentración molar de atenolol

Tabla 1
Valores de pCE_{50} y $E_{m\acute{a}x}$ obtenidos del análisis de la curva concentración-respuesta de noradrenalina en presencia de distintas concentraciones de atenolol en ratas con operación simulada (OS) y ratas con coartación aórtica (CoA)

Curva concentración-respuesta de noradrenalina	Ratas OS		Ratas CoA	
	pCE_{50}	$E_{m\acute{a}x}$ (lpm)	pCE_{50}	$E_{m\acute{a}x}$ (lpm)
Control (n = 15)	6,67 ± 0,13	144 ± 10	6,62 ± 0,13	105 ± 10
+ 0,01 μ M atenolol (n = 5)	6,26 ± 0,31	134 ± 22	6,56 ± 0,15	113 ± 20
+ 0,1 μ M atenolol (n = 5)	5,87 ± 0,11	139 ± 8	6,02 ± 0,15	108 ± 30
+ 1 μ M atenolol (n = 5)	5,68 ± 0,10	99 ± 19	5,63 ± 0,14	137 ± 25

Los resultados están expresados como la media ± EEM.

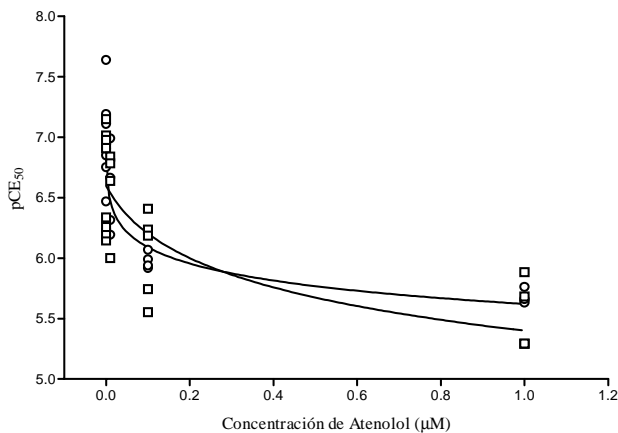


Fig. 1: Efecto del atenolol sobre pCE_{50} de noradrenalina en ratas con operación simulada (círculos) y en animales con coartación aórtica (cuadrados).

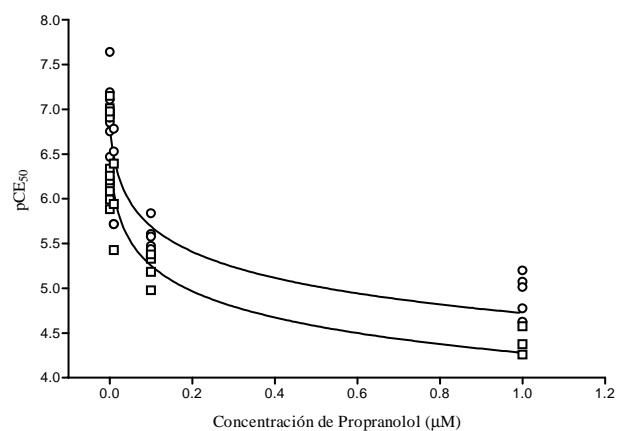


Fig. 2: Efecto del propranolol sobre pCE_{50} de noradrenalina en ratas con operación simulada (círculos) y en animales con coartación aórtica (cuadrados).

en ratas OS y en ratas CoA. Los datos de ambos grupos ajustaron mejor a la ecuación más simple y son consistentes con un modelo de competición simple. Por lo tanto, la determinación del pK_b por este método es válida. Estos datos mostraron un buen ajuste a la ecuación tanto en ratas OS ($r^2 = 0,544$) CoA ($r^2 = 0,566$). Se determinaron los parámetros pK_b mediante una regresión no lineal en ambos grupos y no se observaron diferencias (ratas OS: $7,36 \pm 0,23$; ratas CoA: $7,17 \pm 0,22$).

El agregado de concentraciones crecientes de propranolol produjo un desplazamiento de la curva concentración-respuesta de noradrenalina en aurícula aislada de ratas OS y CoA (Tabla 2).

La Figura 2 muestra el gráfico de pCE_{50} en función del logaritmo de la concentración molar de propranolol en ratas CoA y en ratas OS. Los datos de pCE_{50} en función del logaritmo de la concentración molar de propranolol de ratas OS y de CoA se ajustaron mejor a la ecuación más simple y son consistentes con un modelo de competición simple. Los datos mostraron un buen ajuste a la ecuación tanto en ratas OS ($r^2 = 0,782$) como en ratas CoA ($r^2 = 0,803$). Las constantes de disociación de propranolol no fueron diferentes entre ambos grupos experimentales (pK_b ratas OS: $8,06 \pm 0,18$; ratas CoA: $8,15 \pm 0,19$).

Estudio de la actividad de agonismo inverso de propranolol y atenolol en aurícula aislada

La Figura 3A muestra la curva concentración-respuesta del atenolol en ambos grupos experimentales. Se determinaron los parámetros $E_{m\acute{a}x}$ como porcentaje del basal y pCE_{50} mediante regresión no lineal, sin que se observaran diferencias entre grupos (ratas OS: pCE_{50} $6,44 \pm 0,17$ M, $E_{m\acute{a}x}$ $-26,7 \pm 1,7\%$, $n = 5$; ratas CoA: pCE_{50} $6,13 \pm 0,28$ M, $E_{m\acute{a}x}$ $-37,8 \pm 8,8\%$, $n = 5$).

El propranolol demostró que tiene actividad de agonismo inverso en las ratas OS y CoA (Figura 3B). Los parámetros $E_{m\acute{a}x}$ y pCE_{50} fueron similares en ambos grupos (ratas OS: pCE_{50} $5,35 \pm 0,11$ M, $E_{m\acute{a}x}$ $-40,3 \pm 3,9\%$, $n = 5$; ratas CoA: pCE_{50} $5,70 \pm 0,19$ M, $E_{m\acute{a}x}$ $-46,4 \pm 5,9\%$, $n = 5$).

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se realizó un estudio *in vitro* de las propiedades farmacodinámicas del atenolol y el propranolol en aurícula aislada de ratas con operación simulada o con coartación aórtica. Se observó que las propiedades farmacodinámicas de los dos β -bloqueantes, constante de disociación y actividad de agonismo inverso no se encuentran modificadas en el estadio temprano de hipertensión arterial por coartación aórtica.

Tabla 2
Valores de pCE_{50} y $E_{m\acute{a}x}$ obtenidos del análisis de la curva concentración-respuesta de noradrenalina en presencia de distintas concentraciones de propranolol en ratas con operación simulada (OS) y ratas con coartación aórtica (CoA)

Curva concentración-respuesta de noradrenalina	Ratas OS		Ratas CoA	
	pCE_{50}	$E_{m\acute{a}x}$ (lpm)	pCE_{50}	$E_{m\acute{a}x}$ (lpm)
Control (n = 15)	6,67 ± 0,13	144 ± 10	6,41 ± 0,13	105 ± 10
+ 0,01 µM propranolol (n = 5)	6,19 ± 0,23	128 ± 15	5,92 ± 0,20	112 ± 11
+ 0,1 µM propranolol (n = 5)	5,59 ± 0,06	130 ± 11	5,22 ± 0,07	125 ± 10
+ 1 µM propranolol (n = 5)	4,94 ± 0,10	129 ± 11	4,40 ± 0,07	135 ± 11

Los resultados están expresados como la media ± EEM.

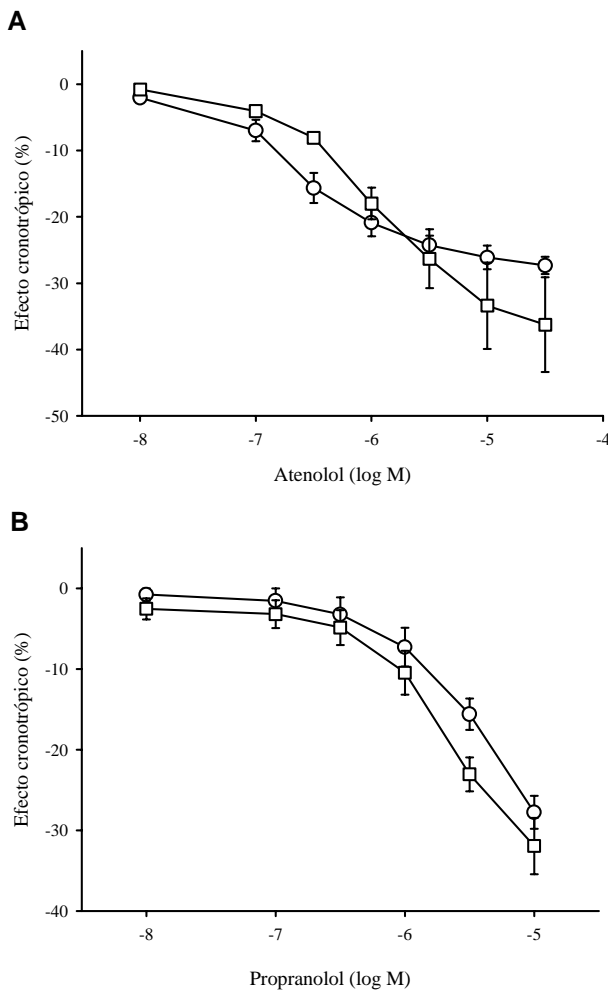


Fig. 3: Curva concentración-respuesta cronotrópica del atenolol (A) y del propranolol (B) en aurícula aislada de animales con operación simulada (círculos) y ratas con coartación aórtica (cuadrados). Cada punto representa la media ± EEM de cinco animales.

En este trabajo se estudió la afinidad del atenolol y el propranolol en la aurícula aislada mediante el desplazamiento de la curva concentración-respuesta del efecto cronotrópico de noradrenalina. Hemos estudiado la afinidad de los β -bloqueantes en cuestión mediante un método alternativo al de Schild ideado

por Lew y colaboradores. (14) Este análisis consta de una regresión no lineal de la curva de pCE_{50} de noradrenalina en función del logaritmo de la concentración molar del β -bloqueante. En el método de Schild, la curva control se utiliza para el cálculo de la relación de dosis. Cualquier error en la determinación de la curva control afectará la relación de dosis calculada. Además, en la estimación del pK_b se utilizan todas las curvas concentración-respuesta en forma simultánea, lo cual significa que todas las curvas tendrán igual peso y no sería necesario realizar un control para descartar cambios temporales en la sensibilidad del tejido. Los valores de pK_b de atenolol y de propranolol obtenidos en el presente trabajo son similares a los valores de pA_2 determinados por otros autores, (16, 17) lo cual valida el método diseñado por Lew y colaboradores para el cálculo de constante de disociación.

Además, no se han encontrado diferencias de afinidad del atenolol y del propranolol entre las ratas coartadas y el control. En un estudio previo demostramos que la CoA no modificaba la constante de disociación del metoprolol en la aurícula aislada. (9) Por lo tanto, los datos obtenidos sugerirían que la desensibilización de adrenoceptores β observada en las ratas CoA en un trabajo previo (9) no modifica la afinidad de los β -bloqueantes por el adrenoceptor β .

También se estudió el efecto cronotrópico del atenolol y del propranolol en aurícula aislada. Los resultados demuestran que el propranolol y el atenolol presentan un efecto cronotrópico negativo y que éste no está alterado en ratas CoA. Otros autores (11, 18) demostraron la actividad de agonismo inverso del atenolol y el propranolol sobre el efecto inotrópico en miocardio de ratas y de seres humanos. Además, Varma y colaboradores (11) demostraron que la actividad de los β -bloqueantes no era uniforme en todo el corazón, observándose mayor actividad en la aurícula derecha. En el estudio del agonismo inverso de β -bloqueantes es importante descartar que el efecto cronotrópico negativo no esté relacionado con catecolaminas contaminantes o con un efecto estabilizante de membrana. Varma y colaboradores (11) y Maack y colaboradores (12) demostraron que la respuesta inotrópica negativa provocada por los β -bloqueantes en la aurícula derecha debido al bloqueo de catecolaminas contami-

nantes es mínima. También se conoce (11) que el efecto inotrópico negativo del propranolol no se debería a la estabilización de membrana. Por otro lado, la CE_{50} del atenolol de ratas OS determinada en nuestro trabajo es similar a la de otros autores. (11)

Podríamos entonces considerar que el atenolol y el propranolol presentan actividad de agonismo inverso sobre el cronotropismo y ésta no estaría alterada en ratas CoA en un estadio temprano de hipertensión arterial, ya que hay similitud de las CE_{50} y los $E_{m\acute{a}x}$ en ambos grupos experimentales. Sin embargo, el atenolol muestra un incremento no significativo del $E_{m\acute{a}x}$. Cabe destacar que Maack y colaboradores (12) demostraron que la desensibilización de adrenoceptores β en la falla cardíaca puede alterar la actividad de agonistas inversos de los β -bloqueantes. Las ratas con coartación aórtica en un estadio hipertensivo temprano no presentarían una desensibilización del adrenoceptor capaz de alterar la actividad agonismo inverso del atenolol y el propranolol.

CONCLUSIÓN

Los bloqueantes β -adrenérgicos propranolol y atenolol presentan actividad de agonistas inversos con efecto cronotrópico negativo en la aurícula aislada de ratas con operación simulada o con coartación aórtica.

La afinidad y la actividad de agonismo inverso del atenolol y el propranolol no estarían alteradas en las ratas con coartación aórtica en un estadio hipertensivo temprano. La desensibilización del adrenoceptor β no afectaría las propiedades farmacodinámicas de los β -bloqueantes estudiados *in vitro*.

SUMMARY

In Vitro Pharmacodynamic Properties of Beta Adrenergic Antagonists Atenolol and Propranolol in Rats with Aortic Coarctation

Study objective

The aim of this *in vitro* study was to determine if aortic coarctation modifies the pharmacodynamic properties of β -adrenergic blockers such as atenolol and propranolol.

Research design and methods

The dissociation constant and the inverse agonistic activity of the β -blockers were studied in sham operated (SO) and aortic coarctated (ACo) rats. Dissociation constant of atenolol and propranolol were determined by means of the shift of noradrenaline concentration vs. chronotropic response curve. Inverse agonistic activity of propranolol and atenolol were studied in isolated atria by the determination of the concentration vs. chronotropic effect curve of the two β -blockers.

Results

No difference was found in the dissociation constant of atenolol (pKb SO rats: 7.36 ± 0.23 ; ACo rats: 7.17 ± 0.22) and propranolol (pKb SO rats: 8.06 ± 0.18 ; ACo rats: 8.15 ± 0.19) between both experimental groups. No difference in inverse agonistic activity of atenolol (SO rats: pEC_{50} : 6.44 ± 0.17 , $n = 5$; ACo rats: pEC_{50} : 6.13 ± 0.28 , $n = 5$) and propranolol

(SO rats: pEC_{50} : 5.35 ± 0.11 , $n = 5$; ACo rats: pEC_{50} : 5.70 ± 0.19 , $n = 5$) was found between both experimental groups.

Conclusion

The affinity of atenolol and propranolol and their inverse agonism do not appear to be altered in aortic coarctated rats at an early hypertensive stage.

Key words: Atenolol - Propranolol - Aortic coarctation - Dissociation Constant - Inverse agonism - Chronotropism.

BIBLIOGRAFÍA

1. Limas C, Limas CJ. Reduced number of β -adrenergic receptors in the myocardium of spontaneously hypertensive rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1978;83:710-14.
2. Woodcock EA, Funder JW, Johnston CI. Decreased cardiac β -adrenoceptors in hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1978;5:545-50.
3. Michel C, Brodde OE, Insel PA. Are cardiac G-proteins altered in rat models of hypertension? *J Hypertens* 1993;11:355-63.
4. Lai FM, Tanikella T, Thibault L, Chan PS, Cervoni P. Effects of different stages of aortic coarctation hypertension on aortic contraction and relaxation in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1980;214:388-94.
5. Michelini LC, Oliveira M, Sacred M. Baroreceptor reflex control of heart rate during development of coarctation hypertension. *Hypertension* 1992;2:159-63.
6. Salgado HC, Fazan R Jr, Machado BH, Salgado MC. Mechanical and neuro-humoral factors in acute aortic coarctation hypertension. *Agents Actions Suppl* 1992;36:152-63.
7. Salgado HC, Skelton MM, Salgado MC, Cowley AW Jr. Pathogenesis of acute aortic coarctation hypertension in conscious rats. *Hypertension* 1994;1:78-81.
8. Cervoni P, Herzlinger H, Lai FM, Tanikella T. A comparison of cardiac reactivity and β -adrenoceptors number and affinity between aorta-coarcted hypertensive and normotensive rats. *Br J Pharmacol* 1981;74:517-23.
9. Höcht C, Di Verniero C, Opezzo JAW, Taira CA. In vivo and in vitro pharmacodynamic properties of metoprolol in aortic coarctated rats. *Pharmacol Res* 2003; 47:181-8.
10. Goldstein BM, Lai FM, Herzlinger H, Cervoni P. Disposition of catecholamines in cardiovascular tissues of aorta coarcted hypertensive rats. *Life Sci* 1982;31:1633-8.
11. Varma DR, Shen H, Deng XF, Peri KG, Chemtob S, Mulay S. Inverse agonist activities of β -adrenoceptor antagonists in rat myocardium. *Br J Pharmacol* 1999;127:895-902.
12. Maack C, Cremers B, Flesch M, Höper A, Südkamp M, Böhm M. Different intrinsic activities of bucindolol, carvedilol and metoprolol in human failing myocardium. *Br J Pharmacol* 2000;130:1131-9.
13. Rojo-Ortega JM, Genest J. A method for production of experimental hypertension in rats. *Can J Physiol Pharmacol* 1968;46:883-5.
14. Lew MJ, Angus JA. Analysis of competitive agonist-antagonist interactions by nonlinear regression. *Trends Pharmacol Sci* 1995;16:328-37.
15. Brunning JL, Kintz BL. *Computational Handbook of Statistics*. 2nd ed., Glenview, Illinois: Scott, Foresman and Company; 1977.
16. Johansson B. Effects of atenolol, metoprolol, and pamtolol on cardiac and vascular beta-adrenoceptors in the rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 1979;1:287-98.
17. Juberg EN, Minneman KP, Abel PW. Beta 1- and beta 2-adrenoceptor binding and functional response in right and left atria of rat heart. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1985;330:193-202.
18. Maack C, Tyroller S, Schnabel P, Cremers B, Dabew E, Südkamp M, et al. Characterization of beta(1)-selectivity, adrenoceptor-G(s)-protein interaction and inverse agonism of nebivolol in human myocardium. *Br J Pharmacol* 2001;132:1817-26.