

**Hipertensão causada por um
antagonista dos receptores da
adenosina.
Papel da angiotensina II.**

Manuela Sofia Rodrigues Morato



Porto, 2004

Hipertensão causada por um
antagonista dos receptores da
adenosina.
Papel da angiotensina II.

Manuela Sofia Rodrigues Morato



Porto, 2004

Dissertação de candidatura ao grau de Doutor apresentada à
Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Orientador: Prof. Doutor António Albino Coelho Marques Abrantes
Teixeira (Professor Associado com Agregação da Faculdade de
Medicina da Universidade do Porto).

A candidata realizou o trabalho experimental com o apoio de uma bolsa de Doutoramento atribuída pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (PRAXIS XXI/BD/18238/98), que participou igualmente a execução gráfica desta dissertação. O trabalho experimental foi parcialmente subsidiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (Projecto POCTI/NSE/45409/2002).

Aos meus Pais

Ao Rui

À Mafalda

Muitas são as dúvidas e as incertezas que se colocam a um recém-licenciado, em relação ao seu percurso futuro e à escolha de uma carreira que satisfaça simultaneamente os conhecimentos adquiridos e os gostos pessoais no que toca às várias vertentes oferecidas pela sua licenciatura. Se desde sempre me senti curiosa pelo como e o porquê do organismo humano, pelos fármacos e pelas patologias, e pelo trabalho de laboratório, a licenciatura em Ciências Farmacêuticas permitiu-me, por um lado, aprofundar o saber e estimular o espírito crítico, e por outro, desenvolver a técnica e o à vontade necessários para, laboratorialmente, testar conhecimentos e esclarecer problemas. Por tudo isto, aqui fica um agradecimento ao corpo docente da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto por me ter proporcionado as bases que alicerçam os meus conhecimentos de hoje, num ambiente de rigor e trabalho saudável. A possibilidade de estagiar ao abrigo do programa Erasmus foi talvez o ponto decisivo para que tivesse decidido, sem hesitar, enveredar pela investigação científica. O interesse pela docência adveio, por certo, do gosto de partilhar e transmitir conhecimentos e também de alguma "carga genética".

Ao chegar ao fim deste trabalho, não posso deixar de lembrar aqueles que para ele contribuíram.

Quero em primeiro lugar prestar o meu reconhecimento ao Professor António Albino Teixeira, principal responsável pelo iniciar, desenvolver e culminar deste trabalho. O meu reconhecimento pela forma peculiar como me orientou ao longo deste percurso, com abertura e sabedoria, estando sempre presente sem nunca se impor. A minha sincera admiração pelas suas qualidades humanas e científicas. O meu obrigada pela disponibilidade total, interesse, entusiasmo e confiança incondicionais, bom senso e capacidade de crítica constructiva, bem como pelas longas horas e quilómetros de conversas e discussões. A minha gratidão pela sólida amizade, pela total dedicação e pelo “alargar de horizontes”.

Ao Professor Serafim Guimarães agradeço o ter permitido a minha entrada no Instituto de Farmacologia e Terapêutica da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, dando-me a oportunidade de viver a experiência de um Centro de Investigação de Excelência. Agradeço também o incentivo ao desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professor Daniel Moura, o meu reconhecimento pelos seus dons científico-pedagógicos e o meu obrigada pela disponibilidade constante para análise e discussão de resultados, não esquecendo o entusiasmo fervoroso com que transforma um mau resultado experimental num ensinamento valioso.

À Doutora Maria Quitéria Paiva gostava de dirigir um cumprimento especial pelo privilégio que foi o ter-me transmitido o seu saber sobre experiências com órgãos isolados. Obrigada também pelo constante espírito de crítica e auto-crítica e pelo rigor e exactidão científica que me incutiu .

À Professora Isaura Tavares, pela colaboração na orientação deste trabalho, nomeadamente no estudo da percepção dolorosa. O meu sincero obrigada pela disponibilidade, entusiasmo e boa disposição constantes e pelos “neuroensinamentos”. Aqui estendo o meu agradecimento a todos os elementos do Instituto de Histologia e Embriologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, na pessoa da Professora Deolinda Lima, pela maneira descontraída e amável com que sempre me receberam. Uma palavra de agradecimento particular às colegas Marta Pinto e Rita Castro pela paciência, boa disposição e ajuda técnica nas cirurgias estereotáxicas e nas reacções de imunohistoquímica.

À colega e amiga Teresa Sousa, agradeço a ajuda e disponibilidade incomensuráveis, a paciência, os conselhos, as dúvidas, as discussões, a companhia...

À colega Dora Pinho, pela dedicação, disponibilidade e espírito crítico.

A todos os colegas investigadores do Instituto de Farmacologia e Terapêutica da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, obrigada pela convivência proporcionada ao longo destes anos.

À D. Luíza Vasques, D. Manuela Moura e D. Mabilde Gomes, agradeço a ajuda técnica, eficiente e imprescindível à execução deste trabalho.

À D. Conceição Martins, obrigada pelo empenho no trabalho de manutenção dos animais.

Aos amigos Helena Mota e Luís Belo, pela ajuda na edição e no tratamento das imagens apresentadas nesta dissertação.

O meu reconhecimento especial ao Professor Jorge Gonçalves pela compreensão e espírito de abertura manifestados, que constituíram um estímulo imprescindível à conclusão deste trabalho. A todos os elementos do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, o meu obrigada pela forma carinhosa como me receberam no Departamento. A sua paciência e compreensão em muito contribuíram para que a finalização deste trabalho decorresse de forma tranquila.

Aos Serviços de Documentação da Grünenthal Euro-Labor, o meu agradecimento pela preciosa ajuda com a recolha de muitos dos artigos incluídos na bibliografia deste trabalho.

À minha família e aos meus amigos pelo incentivo e pela compreensão.

Aos meus pais, ao Rui e à Mafalda, obrigada por tudo, demais para exprimir em palavras... A vocês dedico esta dissertação.

Alguns dos resultados apresentados e discutidos nesta dissertação deram origem aos seguintes trabalhos:

Morato, M., Sousa, T., Guimarães, S., Moura, D., Albino-Teixeira, A. (2002). The role of angiotensin II in hypertension due to adenosine receptors blockade. *Eur. J. Pharmacol.* **455**: 135-141.

Guimarães, S., Morato, M., Sousa, T., Albino-Teixeira, A. (2003). Hypertension due to blockade of adenosine receptors. *Pharmacol. Toxicol.* **92**: 160-162.

Morato, M., Sousa, T., Guimarães, S., Moura, D., Albino-Teixeira, A. (2003). Losartan and atenolol on hypertension induced by adenosine receptor blockade. *Auton. Autacoid Pharmacol.* **23**: 133-140.

Índice

Resumo	13
Abstract	17
Résumé	21
Introdução	25
Um modelo experimental de hipertensão induzida por um antagonista dos receptores da adenosina	27
Fisiopatologia da hipertensão induzida por infusão de DPSPX: possível activação do sistema renina-angiotensina?	29
Estudo morfológico	32
Estudo da contractilidade vascular	36
Estudo da modulação da neurotransmissão simpática pela angiotensina II	41
Estudo da sensibilidade ao estímulo doloroso e papel do bolbo raquidiano ventrolateral	45
Métodos	53
1. Introdução	53
1.1. Determinação da pressão arterial	53

1.2. Infusão de DPSPX / Indução da hipertensão no Rato ...	54
2. Doseamento dos níveis plasmáticos de angiotensina II	56
3. Estudo morfológico	58
4. Estudo da contractilidade vascular	61
5. Estudo da modulação da neurotransmissão simpática pela angiotensina II	63
6. Estudo da sensibilidade ao estímulo doloroso e papel do bolbo raquidiano ventrolateral	66
6.1. Histologia do bolbo raquidiano	69
6.2. Detecção da proteína Fos por imunohistoquímica	69
Resultados	73
1. Introdução	73
2. Doseamento dos níveis plasmáticos de angiotensina II	73
3. Estudo morfológico	75
3.1. Perfil da pressão arterial	75
3.2. Estudo morfológico	75
4. Estudo da contractilidade vascular	80
4.1. Artéria mesentérica	81

4.2. Veia mesentérica	85
5. Estudo da modulação da neurotransmissão simpática pela angiotensina II	87
5.1. Artéria mesentérica	88
5.2. Veia mesentérica	90
6. Estudo da sensibilidade ao estímulo doloroso e papel do bolbo raquidiano ventrolateral	91
6.1. Histologia do bolbo raquidiano	91
6.2. Expressão da proteína Fos	92
Discussão	95
Doseamento dos níveis plasmáticos de angiotensina II	96
Estudo morfológico	97
Estudo da contractilidade vascular	109
Estudo da modulação da neurotransmissão simpática pela angiotensina II	122
Estudo da sensibilidade ao estímulo doloroso e papel do bolbo raquidiano ventrolateral	134
Conclusões	144
Bibliografia	147

Resumo

A hipertensão e as marcadas alterações morfológicas hipertróficas e hiperplásicas que se observam nos vasos de ratos tratados continuamente, durante 7 dias, com o antagonista não selectivo dos receptores da adenosina, o composto 1,3-dipropil-8-sulfopenilxantina (DPSPX), poderiam explicar-se pelo antagonismo das acções vasodilatadora e hipotensora da adenosina e do papel da adenosina nos efeitos tróficos da inervação simpática. Contudo, o forte contraste entre a moderada e progressiva elevação tensional e a exuberância e precocidade das alterações morfológicas vasculares associadas sugere o envolvimento de outro(s) factor(es), paralelamente ao bloqueio das acções fisiológicas da adenosina, na fisiopatologia deste modelo experimental de hipertensão.

O objectivo geral deste trabalho foi caracterizar o papel da angiotensina II neste modelo, uma vez que a adenosina inibe a libertação de renina a nível renal e que o antagonismo dos seus receptores pelo DPSPX poderá bloquear este mecanismo frenador, activando o sistema renina-angiotensina. Nos ratos hipertensos por infusão de DPSPX observa-se um aumento da actividade da renina plasmática. Além disso, as alterações morfológicas são semelhantes às

induzidas por infusão de angiotensina II, são potenciadas por activação do sistema renina-angiotensina e prevenidas por inibição da enzima de conversão da angiotensina pelo captopril.

Os níveis elevados de angiotensina II encontrados confirmam a activação do sistema renina-angiotensina na hipertensão induzida por infusão de DPSPX. A relação causa-efeito entre hipertensão e alterações morfológicas é uma questão que permanece em aberto. O losartan, um antagonista dos receptores AT₁ da angiotensina II, previne a hipertensão induzida pelo DPSPX e as alterações morfológicas vasculares associadas, à semelhança do já observado com o captopril, um inibidor da enzima de conversão da angiotensina. O atenolol, um bloqueador dos adrenoceptores β , apenas previne a elevação tensional. A angiotensina II é um poderoso agente pressor e modulador do fenótipo celular. Os resultados do estudo morfológico sugerem que a angiotensina II é determinante para as alterações morfológicas vasculares associadas à hipertensão induzida por infusão de DPSPX. Por outro lado, favorecem a interpretação de hipertensão e alterações morfológicas vasculares serem processos independentes, ainda que com mediadores e mecanismos comuns.

A angiotensina II é um vasoconstritor potente, por acção mediada pelo receptor AT₁. No estudo da contractilidade vascular, a marcada redução da resposta à angiotensina II (e não a outros contracturantes como a noradrenalina e o cloreto de potássio) observada na artéria e na veia mesentérica dos ratos hipertensos é compatível com a dessensibilização do receptor AT₁, por estimulação continuada do mesmo pelos níveis plasmáticos elevados de angiotensina II. Além disso, este estudo confirmou que a angiotensina

II é sobretudo um agente venoconstritor, ao contrário da noradrenalina, que é sobretudo um constritor arterial.

O sistema renina-angiotensina interactua com o sistema nervoso simpático, nomeadamente pela acção facilitatória da angiotensina II sobre a libertação de noradrenalina. Estudos farmacológicos sugerem que o receptor prejunctional da angiotensina II é diferente do receptor posjunctional. No presente trabalho, foram encontradas duas diferenças entre a reactividade pré- e posjunctional da angiotensina II: (1) a marcada diferença entre a artéria e a veia verificada para o efeito contráctil da angiotensina II não se observou para o efeito facilitatório e (2) a hipertensão induzida pelo DPSPX não esteve associada a redução da resposta facilitatória da angiotensina II. Assim sendo, os resultados do estudo de modulação da neurotransmissão simpática pela angiotensina II são compatíveis com a hipótese de o receptor vascular da angiotensina II ser do subtipo AT_{1A}, que rapidamente dessensibiliza perante os níveis elevados de angiotensina II plasmática, e de o receptor neuronal da angiotensina II ser diferente, eventualmente do subtipo AT_{1B}, dado que não sofre dessensibilização pela exposição a níveis elevados de angiotensina II endógena.

Tem sido verificada uma associação entre hipertensão e hipoalgesia em estudos clínicos e experimentais. No entanto, os mecanismos responsáveis por tal associação não estão ainda estabelecidos. A angiotensina II pode regular a pressão arterial por acção central. Por outro lado, a angiotensina II central pode ter efeito antinociceptivo. Estes factos sugerem que a angiotensina II possa ser um factor comum entre hipertensão e hipoalgesia. Nos ratos hipertensos por infusão de DPSPX verificou-se menor activação dos

neurónios nociceptivos espinhais, induzida por estimulação nóxica da pele. Por outro lado, a lesão do bolbo raquidiano ventrolateral preveniu esta inibição espinhal. É conhecida a co-localização neuroanatômica de centros reguladores das funções cardiovascular e nociceptiva e a participação do bolbo raquidiano ventrolateral na hipoalgesia associada à hipertensão. Os resultados deste estudo são compatíveis com a hipótese de a hipertensão por infusão de DPSPX e a hipoalgesia associada serem mediadas a nível central, à semelhança do que se observa noutros modelos.

Abstract

The continuous infusion, for 7 days, of the non-selective antagonist of adenosine receptors 1,3-dipropyl-8-sulfophenylxanthine (DPSPX) induces hypertension and marked hypertrophic and hyperplastic alterations in the rat vasculature. The antagonism of the vasodilator and hypotensive actions of adenosine and its role on the trophic effects of sympathetic denervation could be responsible for both the hypertension and the vascular structural alterations induced by DPSPX. However, the contrast between the moderate and progressive increase in blood pressure and the exuberant and precocious structural alterations suggests the involvement of other factor(s) besides the antagonism of the physiological actions of adenosine, in the development of DPSPX-induced hypertension.

This work aimed at characterising the role of angiotensina II in DPSPX-induced hypertension. Adenosine restrains renin release. The antagonism of adenosine receptors with DPSPX may block this inhibitory mechanism, activating the renin-angiotensin system. In fact, DPSPX-hypertensive rats have increased plasma renin activity. Moreover, the vascular structural alterations are similar to those induced by angiotensin II infusion, are potentiated by activation of the

renin-angiotensin system and prevented by angiotensin-converting enzyme inhibition with captopril.

We found increased plasma angiotensin II levels, confirming the activation of the renin-angiotensin system in DPSPX-induced hypertension. The cause and effect relationship between hypertension and vascular structural alterations is still an open question. Losartan, an antagonist of angiotensin II AT₁ receptors, prevents DPSPX-induced hypertension and vascular structural alterations, as previously observed with captopril, an angiotensin-converting enzyme inhibitor. Atenolol, an antagonist of β -adrenoceptors, only prevents the rise in blood pressure. Angiotensin II is a potent pressor agent and modulator of the cellular phenotype. The results of the morphological study suggest that angiotensin II is critical for the vascular structural alterations associated with DPSPX-induced hypertension. Also, they support the hypothesis that hypertension and vascular structural alterations are independent processes, in spite of sharing mediators and mechanisms.

Angiotensin II is an effective vasoconstrictor, through activation of AT₁ receptors. In the present study of vascular reactivity, the marked reduction in the contractile response to angiotensin II (and not to noradrenaline or potassium chloride) in the mesenteric artery and vein of DPSPX-hypertensive rats is compatible with the desensitization of AT₁ receptors, due to continuous stimulation by the increased plasma angiotensin II levels. Furthermore, this study confirmed that angiotensin II is mainly a venoconstrictor, in opposition to noradrenaline, which mainly constricts the arteries.

The renin-angiotensin system interacts with the sympathetic nervous system, namely through the facilitatory effect of angiotensin II on noradrenaline release. Pharmacological studies suggest that the prejunctional angiotensin II receptor is different from the postjunctional receptor. In the present work, two evidences were found which support this hypothesis: (1) the marked postjunctional difference between the mesenteric artery and vein was not observed for the prejunctional effect; (2) DPSPX-induced hypertension was not associated with a reduction of the prejunctional angiotensin II-facilitation of noradrenaline release. So, the results agree with the hypothesis that vascular angiotensin II receptor belongs to the AT_{1A} subtype, which desensitizes before the increased angiotensin II levels, and differs from the neuronal angiotensin II receptor, eventually from the AT_{1B} subtype, which does not desensitize with exposure to the increased angiotensin II levels.

Clinical and experimental studies have shown an interaction between hypertension and hypoalgesia. However, the mechanisms responsible for this interaction are not established. Angiotensin II may regulate blood pressure by a central mechanism. Also, central angiotensin II may have an antinociceptive effect. This raises the possibility that angiotensin II is a common factor between hypertension and hypoalgesia. In DPSPX-hypertensive rats there is a decreased activation of spinal nociceptive neurones, induced by noxious stimulation of the skin, suggesting spinal inhibition. The chemical lesion of the ventrolateral medulla prevents this spinal inhibition. It is known the co-localization of central nuclei responsible for the control of cardiovascular and nociceptive functions. The results of the present

study are compatible with the hypothesis that DPSPX-induced hypertension and hypoalgesia are mediated at the central level, as observed in other experimental models of hypertension.

Résumé

L'hypertension et les altérations structurelles hypertrophiques marquées qu'on observe dans les vases des souris traités continuellement, pendant 7 jours, avec l'antagoniste non-selective des récepteurs d'adenosine, le composé 1,3-dipropril-8-sulfofenilxantine (DPSPX), pourraient s'expliquer par l'antagonisme de les actions vasodilatateur et hypotenseur de l'adenosine ainsi que le rôle de l'adenosine sur les effets trophiques de l'innervation sympathique. Toutefois, le fort contraste entre l'élévation tensionale modérée et progressive ainsi que l'exubérance et précocité des alterations suggère l'enveloppement d'autres facteurs parallèlement au blocus des actions physiologiques de l'adenosine, dans la physiopathologie de ce modèle experimental de hypertension.

L'objectif général de ce travail était celui de caractériser le rôle de l'angiotensine II dans ce modèle, vu que l'adenosine inhibe la libération de renine au niveau rénal et que l'antagonisme de ses récepteurs par le DPSPX pourra bloquer ce mécanisme frénateur, en activant le système renine-angiotensine. Dans les souris hypertenses par infusion de DPSPX on peut observer l'agrandissement de l'activité de la renine plasmatique. De plus, les alterations morphologiques sont

semblables à celles qui sont induites par l'infusion de angiotensine II, sont potenciées par activation du système renine-angiotensine et prévenus par inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine par le captopril.

Les niveaux élevés de angiotensine II trouvés confirment l'activation du système renine-angiotensine dans la hypertension induite par l'infusion de DPSPX. La relation cause-effet entre hypertension et altérations structurelles vasculaires est une question qui reste ouverte. Le losartan, un antagoniste des récepteurs AT_1 de l'angiotensine II, prévient l'hypertension induite par le DPSPX et les altérations structurelles vasculaires associées, à l'imitation de ce qui était observé avec le captopril, un inhibiteur de la enzyme de conversion de l'angiotensine. L'atenolol, un bloquer des adrenocepteurs β , seulement prévient l'élévation tensionale. L'angiotensine II est un puissant agent presseur et modulateur du phénotype cellulaire. Les résultats de l'étude morphologique suggèrent que l'angiotensine II est déterminante pour les altérations structurelles vasculaires associées à l'hypertension induite par l'infusion de DPSPX. De plus, ils supportent l'hypothèse de l'hypertension et les altérations vasculaires être des procédées indépendantes, quoique avec des médiateurs et des mécanismes communs.

L'angotensine II est un vaseconstricteur pouissant, par l'action entremise par le récepteur AT_1 . Dans l'étude fonctional de la contractibilité réalisée, la réduction accentuée de la réponse à l'angiotensine II (et non à d'autres contracturants comme la noradrenaline et le chlorure de potasse) observée dans l'artère ainsi que dans la veine mésentérique des souris hypertenses est compatible

avec la dissensibilization du récepteur AT₁ par stimulation continuée du même par les niveaux plasmatiques élevés de angiotensine II. De plus, cet étude a confirmé que l'angiotensine II est surtout un agent venoconstricteur, au contraire de la noradrenaline qui est un constricteur artériel.

Le système renine-angiotensine interage avec le système nerveux sympathique, principalement par la action facilitatoire de l'angiotensine II sur la libération de noradrenaline. Des études pharmacologiques suggèrent que le récepteur prejunctional de l'angiotensine II est différent du récepteur posjunctional. Dans ce travail, on a trouvé deux différences entre la reactivité pre et posjunctional de l'angiotensine II : (1) la différence marquée entre les artères et les veines vérifiée pour l'effet contractile de l'angotensine II n'a pas été observé par l'effet facilitatoire et (2) la hypertension induite par le DPSPX n'a pas été associée à la réduction de la réponse facilitatoire de l'angiotensine II. De cette façon les résultats de l'étude de la modulation de la neurotransmission sympathique par l'angiotensine II sont compatibles avec l'hypothèse du récepteur vasculaire de l'angiotensine II être du subtype AT_{1A}, qui rapidement dissensibilize en face des niveaux élevés de angiotensine II plasmatique, et du récepteur neuronal de l'angiotensine II être différent, éventuellement du subtype AT_{1B}, bien qu'il ne souffre pas dissensibilization à cause de l'exposition à niveaux élevés de angiotensine II.

Il a été vérifié une association entre hypertension et hypoalgesia dans des études cliniques et experimentales. Cependant, les mécanismes responsables par telle association ne sont pas encore établis. L'angiotensine II peut régler la préssion artérielle par action centrale. De plus, l'angiotensine II centrale peut avoir effet antinoceptive.

Ces faits suggèrent que l'angiotensine II peut être un facteur commun entre hypertension et hypoalgesia. Dans les souris hypertenses par infusion de DPSPX ont a vérifié moindre activation des neurones nociceptives spinales induite par stimulation nocif de la peau. D'autre part la lésion de la médule ventrolateral a prévenue cette inhibition spinal. On connaît la co-localisation neuroanatomique entre centres régulateurs des fonctions cardiovasculaire et noceptive ainsi que la participation de la médule ventrolateral dans la hypoalgesia associée à la hypertension. Les résultats de cet étude sont compatibles avec la hypothèse de la hypertension par infusion de DPSPX et la hypoalgesia être partagées à niveaux central, à l'imitation de ce qu'on peut observer dans d'autres modèles.

Introdução

A hipertensão arterial é um problema de saúde pública grave. A incidência na população mundial e os índices de morbidade e mortalidade associados à hipertensão são bastante elevados. Cerca de 1 bilião de pessoas em todo o Mundo (20% da população) sofre de hipertensão arterial (Jones, Hall, 2004). Em Portugal, a hipertensão arterial é a principal causa de morte e incapacidade por doença.

Actualmente, os critérios de classificação da pressão arterial para o Homem adulto estabelecem os valores de 120 e 80 mmHg como os limites superiores de pressão arterial sistólica e diastólica, respectivamente. Tem sido demonstrado em inúmeros estudos epidemiológicos e alguns ensaios clínicos que a relação entre a pressão arterial e o risco de complicações cardiovasculares é directa e independente de outros factores de risco. Quanto mais elevada a pressão arterial, maior a probabilidade de ataque cardíaco, insuficiência cardíaca, acidente vascular cerebral e insuficiência renal. Neste sentido,

qualquer medida, farmacológica ou não, que contribua para a normalização da pressão arterial sistólica e diastólica, contribui igualmente para a redução da morbilidade e mortalidade associadas à hipertensão.

A investigação científica na área das ciências da saúde recorre frequentemente a modelos experimentais de patologias. O interesse de tal abordagem vai desde o aprofundar do conhecimento sobre a fisiopatologia ao desenvolvimento de tratamentos farmacológicos alternativos, passando pela procura de marcadores que permitam um diagnóstico cada vez mais precoce. A hipertensão arterial não é exceção. Conhecem-se dezenas de modelos experimentais de hipertensão, com muitas semelhanças entre eles, mas também com características próprias, o que possibilita a investigação de aspectos particulares dos mecanismos fisiopatológicos. A limitação do uso destes modelos experimentais é óbvia, pela dificuldade de extrapolação dos resultados para o Homem. No entanto, limitações éticas e a impossibilidade de realizar certos estudos no Homem fazem dos modelos experimentais uma excelente alternativa.

Um modelo experimental de hipertensão induzida por um antagonista dos receptores da adenosina

O trabalho realizado no âmbito desta dissertação tem por base um modelo experimental de hipertensão induzida por um antagonista dos receptores da adenosina.

Este modelo surgiu quando se procurava caracterizar o papel da adenosina nos efeitos tróficos da inervação simpática. Observou-se que as alterações morfológicas induzidas pela desnervação simpática eram prevenidas pela adenosina exógena e pela 5'-N-etil-carboxamidoadenosina, seu análogo estável, mas não pela inosina, metabolito inactivo da adenosina (Albino-Teixeira *et al.*, 1990a), nem pela noradrenalina (Branco *et al.*, 1984; Albino-Teixeira *et al.*, 1990a). A adenosina formada por degradação do ATP co-libertado com a noradrenalina a partir dos terminais nervosos simpáticos surgiu, portanto, como um potencial mediador dos efeitos tróficos da inervação simpática (Albino-Teixeira *et al.*, 1990a, 1990b). Esta hipótese ficou provada (Albino-Teixeira *et al.*, 1991) quando foi possível reproduzir os resultados obtidos até então, com um antagonista não selectivo dos receptores da adenosina com características de solubilidade e potência adequadas (Daly *et al.*, 1985). O conhecimento das acções vasodilatadora e hipotensora da adenosina (Drury, Szent-Gyorgyi, 1929) e a disponibilidade técnica

para realizar determinações da pressão arterial no Rato, suscitou o interesse pela avaliação da pressão arterial no Rato tratado com o antagonista dos receptores da adenosina, facto que deu origem ao modelo experimental de hipertensão que serve de base a esta dissertação (Albino-Teixeira *et al.*, 1991) e cujas características fundamentais se descrevem em seguida.

O antagonismo não selectivo dos receptores da adenosina pelo fármaco 1,3-dipropil-8-sulfofenilxantina (DPSPX; Daly *et al.*, 1985) induz hipertensão arterial e alterações morfológicas marcadas no sistema cardiovascular do Rato (Albino-Teixeira *et al.*, 1991; Matias *et al.*, 1991). A pressão arterial sobe gradualmente desde o segundo/terceiro dia de infusão até ao sétimo dia, e mantém-se elevada até, pelo menos, sete semanas após o término da infusão do fármaco (Albino-Teixeira *et al.*, 1991). A magnitude da elevação tensional é, em média, de 28 e 24 mmHg para as pressões arteriais sistólica e diastólica, respectivamente (Albino-Teixeira *et al.*, 1991). Os ratos hipertensos por infusão de DPSPX apresentam, em comparação com ratos controlo, alterações marcadas da estrutura cardiovascular (Albino-Teixeira *et al.*, 1991; Matias *et al.*, 1991), nomeadamente, (1) maior diâmetro do núcleo dos cardiomiócitos ventriculares, (2) maior espessura da camada média e hipertrofia das células musculares lisas das artérias renal e da cauda, (3) estreitamento do lúmen das artérias

mesentérica, renal e da cauda, por proliferação de células musculares lisas subintimais que formam botões em direcção ao lúmen, (4) bifurcações da lâmina elástica interna com inclusão de células musculares lisas no espaço interlaminal. É também evidente fibrose peritoneal (Albino-Teixeira *et al.*, 1991; Matias *et al.*, 1991).

Fisiopatologia da hipertensão induzida por infusão de DPSPX: possível activação do sistema renina-angiotensina?

A fisiopatologia da hipertensão induzida pelo DPSPX não é totalmente conhecida. O contraste marcado entre a moderada elevação da pressão arterial e as exuberantes alterações morfológicas cardiovasculares constitui um aspecto importante e característico deste modelo experimental. A pressão arterial é influenciada pelo débito cardíaco e pela resistência vascular periférica. O antagonismo da vasodilatação (Drury, Szent-Gyorgyi, 1929) e da inibição da libertação do neurotransmissor simpático (Su, 1978) induzidos pela adenosina pode contribuir para o aumento da resistência vascular periférica bem como para o aumento da pressão arterial. A manutenção da morfologia vascular depende do equilíbrio entre factores vasoconstrictores e/ou promotores do crescimento, como a endotelina (Komuro *et al.*, 1988), as catecolaminas (Yu *et al.*,

1996), a angiotensina II (Wang, Prewitt, 1990), as espécies reactivas de oxigénio (Taniyama, Griendling, 2003), a insulina (Banskota *et al.*, 1989) ou a prostaglandina E₂ (Yau, Zahradka, 2003), e factores vasodilatadores e/ou inibidores do crescimento, como a angiotensina (1-7) (Tallant, Clark, 2003), a adenosina (Branco *et al.*, 1984), o peptídeo natriurético (Hutchinson *et al.*, 1997), o factor de crescimento transformante- β (Owens *et al.*, 1988) ou a proteína relacionada com a hormona paratiroideia (Stuart *et al.*, 2000). As alterações morfológicas induzidas pelo DPSPX podem ser consequência directa do antagonismo da acção trófica da adenosina (Branco *et al.*, 1984; Albino-Teixeira *et al.*, 1990a), ou resultar, indirectamente, da maior pressão arterial a que está sujeita a parede vascular, ou da intervenção de outros factores tróficos. O facto de aparecerem precocemente (poucos dias após o início da infusão de DPSPX), serem exuberantes, o que contrasta com a moderada elevação tensional, e não se limitarem ao território vascular, sugere o envolvimento de outro(s) factor(es), paralelamente ao bloqueio das acções fisiológicas da adenosina.

A adenosina inibe a libertação de renina a nível das células justaglomerulares renais (Tagawa, Vander, 1970; Osswald, Schmitz, Kemper, 1978), funcionando como freio fisiológico do sistema renina-angiotensina (revisto por Jackson, 1991), principalmente em situações de activação do referido sistema (Kuan, Wells, Jackson, 1990). O antagonismo dos receptores da

adenosina pelo DPSPX poderá bloquear este mecanismo frenador, activando o sistema renina-angiotensina. Esta hipótese é suportada por alguma evidência: (1) os ratos hipertensos por infusão de DPSPX apresentam níveis elevados de actividade da renina plasmática (Sousa, Morato, Albino-Teixeira, 2002); (2) as alterações morfológicas associadas à infusão de DPSPX são semelhantes às observadas quando se infunde angiotensina II em doses subpressoras (McCubbin *et al.*, 1965); (3) a estenose da artéria renal, um procedimento que activa o sistema renina-angiotensina (Cangiano, Rodriguez-Sargent, Martinez-Maldonado, 1979), potencia a elevação tensional e as alterações morfológicas induzidas pelo DPSPX (Albino-Teixeira, Osswald, 1994); (4) o captopril, um inibidor da enzima de conversão da angiotensina, previne não só a elevação tensional mas também as alterações hipertróficas e hiperplásicas induzidas pelo DPSPX (Sousa, Morato, Albino-Teixeira, 2002).

O trabalho descrito e discutido nesta dissertação pretende caracterizar a acção do sistema renina-angiotensina na hipertensão induzida pelo DPSPX, através de diferentes abordagens que irão sendo apresentadas e justificadas.

A angiotensina II exerce funções fisiológicas importantes no contexto do modelo experimental de hipertensão em estudo, uma vez que é um vasoconstritor potente e induz alterações da morfologia vascular, por mecanismos independentes da pressão

(Griffin *et al.*, 1991). Dado que se observa elevação da actividade da renina plasmática na hipertensão induzida pelo DPSPX (Sousa, Morato, Albino-Teixeira, 2002), pareceu-nos importante dosear os níveis de angiotensina II em ratos hipertensos por infusão de DPSPX.

Estudo morfológico

Há cerca de meio século, a maior resposta pressora a um agonista e a maior resistência ao fluxo em condições de relaxamento máximo (Folkow, 1956) fizeram pensar na existência de alterações morfológicas nos vasos de resistência de doentes com hipertensão essencial.

As alterações morfológicas vasculares observam-se na hipertensão arterial humana (Aalkjaer *et al.*, 1987) e em modelos experimentais de hipertensão genética (SHR; Mulvany, Hansen, Aalkjaer, 1978; Warshaw, Mulvany, Halpern, 1979) ou induzida por infusão de angiotensina II (Griffin *et al.*, 1991) ou por estenose da artéria renal (Deng, Schiffrin, 1991). Estas alterações morfológicas vasculares têm sido atribuídas a alterações das células musculares lisas. Em ratos SHR (Owens, Rabinovitch, Schwartz, 1981) e em ratos hipertensos por infusão de angiotensina II (Griffin *et al.*, 1991) ou por estenose da artéria

renal (Owens, Schwartz, 1983) está descrita hipertrofia das células musculares lisas. Outros estudos descrevem hiperplasia das células musculares lisas, nomeadamente em ratos SHR (Warshaw, Mulvany, Halpern, 1979). Em alguns modelos, como os ratos SHR, e na hipertensão induzida por administração de desoxicorticosterona ou de desoxicorticosterona e sal é possível observar, simultaneamente, hipertrofia e hiperplasia das células musculares lisas (Lee, 1987).

As alterações da morfologia cardiovascular são consideradas uma das primeiras manifestações de lesão dos órgãos-alvo e um importante factor de risco de morbilidade e mortalidade associado à hipertensão (Bataineh, Raji, 1998; Park, Schiffrin, 2000). Deste modo, os fármacos antihipertensores devem controlar a pressão arterial mas também as alterações morfológicas vasculares, no sentido de melhorarem o prognóstico dos doentes com hipertensão.

É difícil concluir acerca da relação causal entre hipertensão e alterações morfológicas vasculares. Estas começaram por ser vistas como uma adaptação à maior pressão arterial a que a parede vascular está sujeita (Mulvany, Hansen, Aalkjaer, 1978; Owens, 1985). No entanto, também têm sido descritas em fases pré-hipertensivas (Lee, 1985), em fases precoces da hipertensão (Deng, Schiffrin, 1991) e mesmo em fetos e recém-nascidos de ratos SHR (Eccleston-Joyner, Gray,

1988), o que levanta a possibilidade de poderem desempenhar um papel primário no desenvolvimento da hipertensão arterial.

A existência de hipertensão sem alterações morfológicas vasculares (medulectomia renal química: Bund *et al.*, 1989) e de patologias associadas a alterações morfológicas vasculares mas não a hipertensão (síndrome de Bartter: Fujita *et al.*, 1977) sugere que os dois factores possam representar processos autónomos, apesar de frequentemente associados. O facto de a terapêutica antihipertensora nem sempre actuar de forma semelhante sobre a pressão arterial e sobre as alterações morfológicas vasculares (Warshaw, Root, Halpern, 1980; Owens, 1985) reforça esta hipótese.

Os fármacos antihipertensores que bloqueiam a acção do sistema renina-angiotensina, por inibição da enzima de conversão da angiotensina (Harrap *et al.*, 1990; Sihm *et al.*, 1994), ou por antagonismo dos receptores AT₁ da angiotensina II (Li, Sharifi, Schiffin, 1997; Schiffrin *et al.*, 2000), são eficazes no controlo das alterações morfológicas vasculares. Tal não acontece com o antagonista dos adrenoceptores β , atenolol (Schiffrin, Deng, 1995; Schiffrin *et al.*, 2000). Este facto sugere que a angiotensina II possa ser o mediador comum à hipertensão e às alterações morfológicas vasculares.

A angiotensina II modula o fenótipo das células musculares lisas *in vivo* (Wang, Prewitt, 1990; Simon, Illyes, Csiky, 1998) e

in vitro (Geisterfer, Peach, Owens, 1988). Além disso, a angiotensina II promove o aumento da síntese de proteínas da matriz extracelular (Scott-Burden *et al.*, 1990) e de colagênio (Benetos *et al.*, 1997), de células musculares lisas vasculares em cultura. *In vivo*, a hipertrofia vascular induzida pela angiotensina II é, pelo menos em parte, independente da pressão arterial (Griffin *et al.*, 1991), o que reforça a possibilidade de hipertensão arterial e alterações morfológicas vasculares poderem ser processos independentes, modulados de forma independente, ainda que com mediadores e mecanismos comuns.

No modelo experimental de hipertensão induzida pelo DPSPX as alterações morfológicas são marcadas e surgem precocemente, o que contrasta com a moderada e progressiva elevação tensional. Decidimos, portanto, estudar a possível dissociação entre elevação tensional e alterações morfológicas neste modelo, avaliando os efeitos do losartan, um antagonista dos receptores AT₁ da angiotensina II, e do atenolol, um antagonista dos adrenoceptores β₁, na hipertensão induzida pelo DPSPX e nas alterações morfológicas associadas.

Estudo da contractilidade vascular

Independentemente da existência ou não de relação causa-efeito entre hipertensão e alterações morfológicas vasculares, teoricamente, estas podem originar maiores aumentos da resistência vascular para o mesmo grau de encurtamento do músculo liso (Folkow, 1956; Folkow *et al.*, 1970a, b). Esta teoria encontra algum suporte em factos experimentais. Em artérias mesentéricas de ratos SHR há correlação directa entre força máxima contráctil e espessura da parede vascular (Mulvany, Halpern, 1976). A maior razão média/lúmen amplifica a resposta vasoconstritora (Folkow *et al.*, 1970a). A hiperreactividade vascular desaparece quando se normaliza em relação à massa muscular (Aalkjaer *et al.*, 1987). Deste modo, nos hipertensos, o músculo liso vascular hipertrofiado pode reagir excessivamente a níveis normais de substâncias vasoconstritoras, o que poderá contribuir para a fisiopatologia da hipertensão, uma vez que a contracção de um vaso com parede mais espessa e menor lúmen dará origem a maior resistência vascular.

A proposta de Folkow é contestada por alguns estudos que apontam a pressão arterial elevada como a principal responsável pelas alterações funcionais contrácteis observadas na hipertensão. De facto, a veia porta responde a aumentos da

pressão com hipertrofia e hipercontractilidade (Johansson, 1976) mas não se observam diferenças nas suas propriedades mecânicas e morfológicas, quando se comparam ratos SHR adultos com ratos WKY (Mulvany *et al.*, 1980).

Inúmeros estudos têm tentado esclarecer esta questão da hiperreactividade associada à hipertensão. No entanto, os resultados não são consistentes, variando com o agonista estudado, com o tipo e a duração da hipertensão e, também, com os territórios vasculares e com as metodologias utilizadas.

A noradrenalina é um dos vasoconstritores mais estudados. Em ratos SHR, está descrita maior (Sutter, Ljung, 1977) ou menor (Shibata, Kurahashi, Kuchii, 1973) reactividade à noradrenalina, em comparação com ratos controlo. Na hipertensão experimental renal por estenose unilateral da artéria renal (hipertensão renal 2K1C) há descrições de hiperreactividade vascular à noradrenalina (Collis, Alps, 1975; Sutter, Ljung, 1977). Em alguns estudos observa-se correlação positiva entre a pressão arterial e o grau de reactividade à noradrenalina (Collis, Alps, 1975). Nos vasos mesentéricos de resistência de ratos SHR adultos a resposta à noradrenalina é semelhante à dos controlo mas, como a secção da área transversal da média é maior, é possível que a tensão máxima activa por célula possa ser menor nos ratos SHR (Mulvany, Hansen, Aalkjaer, 1978). A hiperreactividade vascular pode,

portanto, não corresponder a maior reactividade das células musculares lisas.

Também no que se refere à sensibilidade do músculo liso vascular existe controvérsia. Nos ratos SHR adultos há autores que descrevem maior sensibilidade à noradrenalina (Sutter, Ljung, 1977) enquanto outros não observam alteração (Mulvany, Hansen, Aalkjaer, 1978). Na hipertensão renal 2K1C a maior sensibilidade à noradrenalina observada nas semanas iniciais (Collis, Alps, 1975) desaparece com o aumento do tempo de elevação da hipertensão (Sutter, Ljung, 1977).

O sistema renina-angiotensina é um importante regulador do tónus vascular, sendo a angiotensina II um dos vasoconstritores mais importantes implicados na hipertensão. Estão descritas alterações na reactividade à angiotensina II durante alterações no aporte de sódio (Thurston, Laragh, 1975): a diminuição do aporte de sódio, que activa o sistema renina-angiotensina, diminui a reactividade à angiotensina II, enquanto que o excesso do aporte de sódio tem o efeito contrário. Nestes estudos verifica-se também uma relação inversa entre actividade da renina plasmática e reactividade à angiotensina II. A activação do sistema renina-angiotensina parece modular (negativamente) a reactividade vascular ao seu efector principal. Mais uma vez, o padrão de resposta vascular não é uniforme nos vários estudos de reactividade a este agonista em modelos

experimentais de hipertensão. Apesar de na hipertensão estarem descritas respostas à angiotensina II iguais (Moreno *et al.*, 1996; Touyz *et al.*, 1999) ou menores (Shibata, Kurahashi, Kuchii, 1973; Ljung, Jandhyala, Kjellstedt, 1981) às dos ratos controlo, a maioria dos estudos refere hiperreactividade à angiotensina II, sobretudo em ratos SHR (Kost *et al.*, 1994; Touyz *et al.*, 1999). A hiperreactividade à angiotensina II observa-se sobretudo na fase de instalação da hipertensão dos ratos SHR (Endemann *et al.*, 1999), em que ainda não há elevação tensional mas já estão presentes alterações morfológicas vasculares. Para além de ser um vasoconstritor potente, a angiotensina II pode potenciar a actividade simpática, por estimular a actividade simpática a nível central (revisito por Reid, 1984), aumentar a libertação de noradrenalina a partir dos terminais simpáticos (Zimmerman, Gomer, Liao, 1972) ou a resposta dos receptores adrenérgicos a estímulos simpáticos (Malik, Nasjletti, 1976).

Também não está totalmente esclarecido se as alterações nas respostas contrácteis vasculares se devem à alteração da capacidade contráctil, uma vez que os estudos com vasoconstritores cuja acção é independente de receptores, como é o caso do cloreto de potássio, são igualmente inconclusivos (Shibata, Kurahashi, Kuchii, 1973; Collis, Alps, 1975; Moreno *et al.*, 1996).

Na hipertensão induzida pelo DPSPX observam-se alterações morfológicas vasculares exuberantes, que surgem precocemente no desenvolvimento da hipertensão, e que contrastam com a moderada elevação tensional (Albino-Teixeira *et al.*, 1991; Matias *et al.*, 1991). De acordo com a teoria de Folkow (Folkow, 1956) seria de esperar que os vasos sanguíneos de ratos hipertensos por infusão de DPSPX fossem hiperreactivos a vasoconstritores circulantes. Por outro lado, de acordo com autores que se opõem a esta teoria (Mulvany *et al.*, 1980), a hiperreactividade vascular poderia não se verificar, dada a moderada elevação tensional induzida pelo DPSPX. De facto, na artéria da cauda de ratos hipertensos por infusão de DPSPX não se verificam diferenças na resposta ao UK14.304, um agonista dos adrenoceptores α_2 (Guimarães *et al.*, 1994). Outro aspecto importante da hipertensão induzida pelo DPSPX é a evidência, já referida (McCubbin *et al.*, 1965; Albino-Teixeira, Osswald, 1994; Sousa, Morato, Albino-Teixeira, 2002), que aponta para a activação do sistema renina-angiotensina neste modelo. Uma vez que a hipertensão induzida pelo DPSPX é acompanhada por alterações morfológicas vasculares marcadas e, provavelmente, por activação do sistema renina-angiotensina, e que ambos os factores podem condicionar a reactividade vascular na hipertensão, pareceu-nos importante avaliar a reactividade vascular em ratos hipertensos por infusão de DPSPX, comparando-os com ratos controlo. A influência da

angiotensina II no tónus muscular varia entre os territórios vasculares, sendo o mesentérico dos mais sensíveis (revisto por Timmermans *et al.*, 1993); este território vascular é também importante no controlo da resistência vascular periférica. Assim sendo, o estudo incidiu sobre a artéria e a veia mesentéricas. Foram estudadas as respostas vasculares à angiotensina II, à noradrenalina e ao cloreto de potássio, de forma a avaliarmos contracturantes com acção em diferentes receptores e respostas independentes da acção de receptores.

Estudo da modulação da neurotransmissão simpática pela angiotensina II

O sistema nervoso simpático desempenha um papel importante no controlo do tónus vascular e, conseqüentemente, na regulação da pressão arterial. A activação do sistema nervoso simpático pode contribuir para a patogénese da hipertensão arterial, uma vez que a neurotransmissão simpática está aumentada em modelos experimentais de hipertensão e na hipertensão essencial humana (revisto por De Champlain, 1990).

Em estudos com modelos experimentais de hipertensão, a desnervação simpática é um procedimento frequentemente

utilizado para avaliar o papel desempenhado pelo sistema nervoso simpático. Na hipertensão experimental induzida pelo DPSPX, a desnervação simpática com 6-hidroxidopamina retarda a instalação e diminui a magnitude da elevação tensional (Sousa, Morato, Albino-Teixeira, 2002), implicando o sistema nervoso simpático no desenvolvimento e/ou manutenção deste modelo experimental de hipertensão. De modo semelhante, a desnervação simpática de ratos SHR à nascença (Lee *et al.*, 1987) ou às 7 semanas de idade (Grisk *et al.*, 2002), mas não às 18 semanas (Grisk *et al.*, 2002), atrasa a elevação tensional. A supressão do sistema nervoso simpático também atenua o desenvolvimento da hipertensão renal 2K1C (Nakada *et al.*, 1996). Assim, também na hipertensão experimental, o sistema nervoso simpático parece importante sobretudo para o desenvolvimento da patologia, mais do que para a sua manutenção.

A noradrenalina endógena é libertada por despolarização da membrana neuronal. A libertação do neurotransmissor simpático é essencialmente auto-controlada pelos adrenoceptores α_2 e β pré-juncionais que, quando activados pela noradrenalina endógena, limitam ou estimulam, respectivamente, a libertação posterior de mais neurotransmissor (revisto por Langer, 1997). Na artéria da cauda de ratos hipertensos por infusão de DPSPX, observa-se maior sensibilidade e eficácia dos adrenoceptores α_2

préjuncionais inibitórios (Guimarães *et al.*, 1994), assim como maior sensibilidade dos adrenoceptores β préjuncionais facilitatórios (Guimarães, Albino-Teixeira, Paiva, 1995). A neurotransmissão perivascular simpática está aumentada na artéria da cauda de ratos hipertensos por infusão de DPSPX (Karooon, Rubino, Burnstock, 1995). Na artéria da cauda observa-se co-transmissão entre a noradrenalina e o ATP (Sneddon, Burnstock, 1984). O aumento da neurotransmissão simpática em ratos hipertensos por infusão de DPSPX resulta do aumento de ambos os componentes noradrenérgico e purinérgico (Karooon, Rubino, Burnstock, 1995). No coração dos ratos hipertensos por infusão de DPSPX observa-se menor inotropismo mediado por adrenoceptores α e β (Rubino, Burnstock, 1995). A auto-inibição α_2 préjuncional está diminuída na artéria da cauda de ratos SHR com 28 semanas (Galloway, Westfall, 1982) mas não na artéria mesentérica de ratos SHR com 15-17 semanas (Su, Kubo, 1984). Na artéria da cauda de ratos transgênicos para o gene Ren-2 da renina (TGR Ren-2) não há alteração na modulação α_2 préjuncional (Arribas *et al.*, 1996).

O sistema renina-angiotensina e o sistema nervoso simpático interactuam, *in vivo* e *in vitro*. Estudos na artéria do antebraço de hipertensos demonstram modulação da actividade simpática pela angiotensina II local (Taddei *et al.*, 1991), endógena (Taddei, Salvetti, 1992; Taddei *et al.*, 1995) e exógena

(Taddei *et al.*, 1991). Tal acção também se verifica na hipertensão experimental (Cline, 1985). *In vitro*, a potenciação dos efeitos adrenérgicos pela angiotensina II parece ser devida ao aumento da síntese (Roth, 1972) e da libertação (Zimmerman, Gomer, Liao, 1972) e também à inibição da recaptação do neurotransmissor simpático (Khairallah, 1972). O efeito facilitatório da angiotensina II sobre a libertação de noradrenalina pode justificar porque é que níveis normais de actividade simpática podem aumentar a vasoconstrição (revisto por Mancina *et al.*, 1997). Têm sido descritas alterações na modulação exercida pela angiotensina II em modelos experimentais de hipertensão. Na maioria dos estudos com ratos SHR está descrito maior efeito facilitatório da angiotensina II (Kawasaki, Cline, Su, 1982; Cline, 1985) embora haja estudos em que esse efeito se revela menor (Urabe, Su, Lee, 1987) que nos controlos, à semelhança do que está descrito na fase tardia, mas não na fase inicial, da hipertensão renal 2K1C (Eikenburg, Ekas, Lokhandwala, 1982).

Como já foi referido, no modelo experimental de hipertensão induzida pelo DPSPX é importante a actividade do sistema nervoso simpático (Sousa, Morato, Albino-Teixeira, 2002) e observam-se alterações préjuncionais da neurotransmissão simpática (Guimarães *et al.*, 1994; Guimarães, Albino-Teixeira, Paiva, 1995; Karoon, Rubino, Burnstock, 1995; Rubino, Burnstock, 1995). Dadas as

interacções entre o sistema nervoso simpático e o sistema renina-angiotensina e a evidência de activação deste neste modelo, fomos estudar a modulação exercida pela angiotensina II sobre a libertação de noradrenalina. Uma vez que o controlo do tónus vascular pelo sistema nervoso simpático não se limita ao território arterial, sendo igualmente importante no território venoso (Kreulen, 1986), os estudos foram realizados paralelamente na artéria e na veia mesentéricas.

Estudo da sensibilidade ao estímulo doloroso agudo e papel do bolbo raquidiano ventrolateral

Tem sido verificada uma associação entre hipertensão e hipoalgesia. Em 1979, Zamir e Segal observaram que o aumento crónico da pressão arterial se acompanhava de diminuição da sensibilidade à dor em ratos hipertensos. Outros autores confirmaram esta observação usando vários estímulos nóxicos, como o calor (Zamir, Simantov, Segal, 1980; Sitsen, de Jong, 1983), a estimulação eléctrica (Sitsen, de Jong, 1983) ou a pressão mecânica (Zamir, Simantov, Segal, 1980). Em hipertensos sujeitos a estimulação eléctrica da polpa dentária (Zamir, Shuber, 1980; Ghione *et al.*, 1985) ou a estimulação nóxica da pele (Ditto *et al.*, 1993) verificou-se haver hipoalgesia associada à hipertensão. A correlação positiva entre pressão

arterial sistólica e tolerância à dor foi também observada em normotensos (Bruehl, Carlson, McCubbin, 1992; Page, France, 1997), havendo autores que propõem que a hipoalgesia possa funcionar como um marcador de hipertensão (Page, France, 1997) melhor do que a monitorização precoce da pressão arterial, a história parental de hipertensão ou o índice de massa corporal (Campbell *et al.*, 2002, 2003). Apesar de toda esta evidência, alguns estudos sugerem que a hipoalgesia possa não estar relacionada directamente com a elevada pressão arterial (Sitsen, de Jong, 1983, 1984). Em doentes hipertensos, o tratamento antihipertensor pode normalizar a percepção dolorosa sem normalização da pressão arterial (Guasti *et al.*, 1998). A hipoalgesia pode preceder o desenvolvimento da hipertensão (Bruehl, Carlson, McCubbin, 1992; Page, France, 1997). Além disso, o comportamento perante a dor nos ratos SHR não se limita a hipoalgesia, variando com o teste nociceptivo (Taylor *et al.*, 2001), e, nestes animais o efeito sobre a percepção dolorosa é variável, para o mesmo grau de controlo da pressão arterial (Irvine, White, Head, 1995).

Os mecanismos responsáveis pela hipoalgesia associada à hipertensão não estão ainda esclarecidos. No contexto deste trabalho é interessante verificar que ratinhos *knockout* para o receptor A_{2A} da adenosina são hipertensos e demonstram hipoalgesia em testes comportamentais de dor (Ledent *et al.*, 1997). A angiotensina II está envolvida na regulação central dos

sistemas cardiovascular e nociceptivo, podendo desempenhar um papel importante na hipoalgesia associada à hipertensão. A angiotensina II contribui para a regulação central da pressão arterial, tendo sido identificada a presença de receptores para a angiotensina II em vários núcleos envolvidos na regulação cardiovascular como o núcleo do tracto solitário (Lind, Swanson, Ganten, 1985) e as porções caudal (Lind, Swanson, Ganten, 1985) e rostral (Allen, Dampney, Mendelsohn, 1988) do bolbo raquidiano ventrolateral. Foram também identificados receptores para a angiotensina II nos órgãos circumventriculares (Mendelsohn *et al.*, 1984), não protegidos pela barreira hemato-encefálica. A administração periférica de angiotensina II desloca o reflexo baroreceptor para níveis mais elevados independentemente dos níveis de pressão arterial (Brooks, Ell, Wright, 1993). De forma semelhante, a administração central de doses subpressoras de angiotensina II diminui a sensibilidade do reflexo baroreceptor a elevações tensionais, nomeadamente no núcleo do tracto solitário (Casto, Phillips, 1986) e no bolbo raquidiano ventrolateral rostral (Saigusa, Iriki, Arita, 1996). A actividade dos baroreceptores e a percepção dolorosa também se encontram relacionadas. No Homem, a actividade do reflexo baroreceptor está inversamente relacionada com a sensibilidade dolorosa (Droste *et al.*, 1994). No Rato, é possível normalizar a hipoalgesia induzida por elevação aguda da pressão arterial através da desnervação dos baroreceptores (Dworkin *et al.*, 1979).

Há alguma controvérsia em relação ao envolvimento da angiotensina II no controlo da transmissão dolorosa. A administração periférica (Irvine, White, 1997) ou intracerebroventricular (Haulica *et al.*, 1983, 1986) de angiotensina II induz analgesia. Por outro lado, outros estudos contrariam o potencial efeito antinociceptivo da angiotensina II central, havendo autores que descrevem a angiotensina II como um peptídeo anti-opiídeo (Kaneko *et al.*, 1985; Takai *et al.*, 1996). Uma outra questão relacionada com a eventual acção antinociceptiva da angiotensina II diz respeito à dependência da acção pressora. Se há estudos em que a normalização da sensibilidade à dor em hipertensos parece estar relacionada, pelo menos em parte, com o efeito antihipertensor dos fármacos (Guasti *et al.*, 1998), outros estudos contrariam esta hipótese. No Rato, a estenose da artéria renal induz hipertensão e menor sensibilidade à estimulação nóxica térmica da pata (Zamir, Segal, 1979). A remoção do rim cuja artéria renal foi sujeita a estenose normaliza a pressão arterial ao fim de 5 dias, enquanto que a sensibilidade ao estímulo nóxico só é normalizada ao fim de 20 dias (Zamir, Segal, 1979). Estes factos sugerem que apesar da correlação entre pressão arterial e sensibilidade à dor, os dois processos podem ser dissociáveis. Nos ratos SHR, a hipoalgesia é normalizada com anti-hipertensores bloqueadores do sistema renina-angiotensina mas não com vasodilatadores (Irvine, White, Head, 1995), apesar de igual redução da pressão

arterial. O factor comum entre hipertensão e hipoalgesia parece, assim, ser a angiotensina II e não a pressão arterial elevada.

Os sistemas reguladores da pressão arterial e os sistemas nociceptivos partilham centros neuroanatômicos, sendo razoável admitir que esta co-localização anatômica possa favorecer uma relação funcional. De facto, certos fármacos importantes na regulação da pressão arterial, como os agonistas adrenérgicos, modificam a percepção dolorosa (Reddy, Maderdrut, Yaksh, 1980), enquanto que fármacos analgésicos podem afectar a pressão arterial (Laubie, Schmitt, 1980). Em estudos de electrofisiologia (Randich, Robertson, 1994) e de detecção imunohistoquímica da expressão de *c-fos* (Tavares, Albino-Teixeira, Lima, 1995; Tavares *et al.*, 1997) em modelos experimentais de hipertensão observa-se uma menor activação, induzida por estimulação nóxica, dos neurónios nociceptivos espinhais, indicando inibição espinhal. O bloqueio pelo frio da medula espinhal torácica (Thurston, Randich, 1990) previne o desenvolvimento da hipoalgesia associada à hipertensão experimental, apontando para o envolvimento de áreas supra-espinhais.

O bolbo raquidiano ventrolateral caudal parece estar no centro dos circuitos do tronco cerebral-medula espinhal que envolvem influências recíprocas entre as funções nociceptiva e cardiovascular (Tavares, Albino-Teixeira, Lima, 1995), pelo que

poderá ter um papel importante como factor de integração da hipoalgesia e da hipertensão. O bolbo raquidiano ventrolateral caudal é um núcleo fundamental do sistema antinociceptivo. A sua estimulação por agentes eléctricos ou químicos resulta em hipoalgesia (Gebhart, Ossipov, 1986). O limiar de estimulação requerido para produzir hipoalgesia (Gebhart, Ossipov, 1986) é inferior ao das áreas antinociceptivas clássicas. O bolbo raquidiano ventrolateral é responsável pela inibição tónica descendente de neurónios nociceptivos espinhais (Hall *et al.*, 1982) e desempenha igualmente um papel fulcral na activação do reflexo baroreceptor. O aumento da pressão arterial activa neurónios do bolbo raquidiano ventrolateral através de aferentes do núcleo do tracto solitário que recebem terminações de aferentes baroreceptores (Agarwal, Gelsema, Calaresu, 1990; Murphy *et al.*, 1994). A activação da região caudal do bolbo raquidiano ventrolateral inibe a região vasopressora, localizada no quadrante ventrolateral do bolbo raquidiano rostral (Agarwal, Gelsema, Calaresu, 1990). Estes neurónios do bolbo raquidiano ventrolateral caudal, activados por elevação da pressão arterial, estão predominantemente localizados na sua porção mais lateral (Murphy *et al.*, 1994), uma região de formação reticular localizada entre o núcleo reticular lateral e o núcleo espinhal do trigémio, *pars caudalis*. Por outro lado, a estimulação do bolbo raquidiano ventrolateral provoca descida da pressão arterial (Willeite *et al.*, 1983), enquanto que a sua inactivação (Cravo,

Morrison, Reis, 1991) provoca subida da pressão arterial. A lesão do bolbo raquidiano ventrolateral lateral com ácido quinolínico previne a inibição da expressão de *c-fos* induzida pela hipertensão experimental de curta duração (Tavares *et al.*, 1997).

Uma vez que no modelo experimental de hipertensão induzida pelo DPSPX há activação do sistema renina-angiotensina, pareceu-nos importante avaliar a percepção dolorosa neste modelo. A angiotensina II pode ligar-se a receptores localizados em áreas não protegidas pela barreira hemato-encefálica e contribuir, directa ou indirectamente, para a regulação central da função cardiovascular (revisto por Phillips, 1987). Mesmo para áreas protegidas pela barreira hemato-encefálica como o bolbo raquidiano ventrolateral rostral, está descrita activação neuronal pela angiotensina II (Katahira *et al.*, 1994). Por outro lado, é possível que níveis elevados de angiotensina II circulante activem receptores normalmente activados apenas pela angiotensina II cerebral (revisto por Phillips, 1987).

Conhecido o papel do bolbo raquidiano ventrolateral na hipoalgesia associada a modelos experimentais de hipertensão, fomos também caracterizar o seu envolvimento na eventual hipoalgesia associada à hipertensão induzida pelo DPSPX.

Métodos

1. *Introdução*

Neste trabalho foram utilizados ratos Wistar (Biotério do Instituto Gulbenkian de Ciência e Instituto de Biologia Molecular e Celular, Portugal), machos, com peso corporal compreendido entre 250 e 300 g. Os animais foram mantidos em condições constantes de temperatura (21°C) e alternância de exposição à luz (fotoperíodos de 12 horas noite/12 horas dia) com acesso livre a água e a comida.

1.1. *Determinação da pressão arterial*

A pressão arterial foi determinada pelo método não invasivo de medição na cauda (LE 5000, Letica, Barcelona, Espanha), em ratos conscientes, pré-aquecidos a 38°C durante 15 minutos. Para cada rato e em cada situação, foram realizadas

cinco determinações consecutivas e a respectiva média aritmética foi usada para cálculos posteriores. Durante os sete dias que precederam os estudos, os animais foram treinados para se acostumarem ao procedimento. Animais com valores de pressão arterial sistólica superiores a 120 mmHg ou com flutuações acentuadas dos valores basais de pressão arterial foram excluídos dos estudos.

1.2. Infusão de DPSPX / Indução da hipertensão no Rato

O DPSPX foi administrado na dose de 90 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$. Esta dosagem foi escolhida por se saber que induz hipertensão e alterações morfológicas no sistema cardiovascular do Rato, que persistem pelo menos durante sete semanas após o término da administração de DPSPX (Albino-Teixeira *et al.*, 1991). Após o início da infusão de DPSPX (dia 0), a pressão arterial sistólica sobe gradualmente, sendo a diferença significativa a partir do dia 3 e estabilizando por volta do dia 7 (Albino-Teixeira *et al.*, 1991).

O DPSPX foi administrado intraperitonealmente utilizando mini-bombas osmóticas (Alzet modelo 2ML1; Alza, Palo Alto, CA, USA), que permitiram uma infusão constante e contínua durante 7 dias. O reservatório das mini-bombas era preenchido com solução de DPSPX, e as mini-bombas colocadas em soro

fisiológico durante quatro horas, a 37°C, para estabilização do ritmo de infusão (10 µl/h). Os animais eram anestesiados com pentobarbital sódico (60 mg/kg; i.p.), e as mini-bombas implantadas na cavidade peritoneal, através de uma incisão feita na pele e na massa muscular subjacente, na zona média da parede abdominal. A incisão era suturada por planos. Depois do recobro anestésico, os animais voltavam a ter acesso livre a água e a comida.

Nos estudos realizados, salvo indicação em contrário, foram comparados três grupos de animais. Dois grupos foram tratados com DPSPX; um foi morto no dia 3 (grupo DPSPX 3d) e outro no dia 14 (grupo DPSPX 14d). A um grupo foi administrado soro fisiológico, de forma igual à descrita para o DPSPX (grupo controlo). Comparando estes três grupos foi possível estudar a fase de instalação da hipertensão (dia 3), na qual o DPSPX está presente na circulação sanguínea e a pressão arterial começa a subir, e a fase de hipertensão sustentada (dia 14), em que apesar de já não existir DPSPX em circulação, os valores de pressão arterial permanecem elevados (Albino-Teixeira *et al.*, 1991).

2. Doseamento dos níveis plasmáticos de angiotensina II

Os ratos foram submetidos a cirurgia para implante de mini-bombas osmóticas da forma descrita. A pressão arterial sistólica dos ratos de cada grupo foi determinada antes do dia 0, no dia 0 e no fim do estudo.

Os ratos dos grupos controlo, DPSPX 3d e DPSPX 14d foram anestesiados com pentobarbital sódico (60 mg/kg; i.p.) e foi colhido sangue, directamente a partir do ventrículo esquerdo, para tubos contendo uma solução inibidora (0,03 M o-fenantrolina / 2,2 mM sulfato de neomicina / 0,1 M EDTA), colocados em gelo. Após centrifugação imediata (3.000 r.p.m., 20 minutos, 4°C), o plasma sobrenadante foi separado e armazenado a -80°C até posterior doseamento de angiotensina II.

A angiotensina II foi extraída do plasma por extracção em fase sólida, utilizando colunas C18 (Sep-Pak, Waters, Milford, MA, USA) e um sistema de vácuo. As colunas foram activadas com 5 ml de metanol e 5 ml de água destilada. As amostras foram passadas pelas mesmas colunas e lavadas com 5 ml de água destilada. A angiotensina II foi eluída com 2 ml de metanol 80% (v/v) e a solução obtida evaporada até à secura em corrente de azoto. O teor em angiotensina II em cada amostra foi determinado por radioimunoensaio, utilizando um kit específico

(Peninsula Laboratories, Inc., Belmont, CA, USA). A extracção foi realizada 2 dias após a colheita das amostras e o doseamento no dia seguinte à extracção.

Incubaram-se alíquotas das diferentes amostras (100 μ l), durante a noite (16-24h), com 100 μ l de um anticorpo primário anti-angiotensina II criado em Coelho, a 4° C. Seguiu-se um igual período de incubação, desta vez com 125 I-angiotensina II (100 μ l). A separação entre a angiotensina II ligada e a não ligada ao anticorpo primário foi feita por incubação com um anticorpo secundário (100 μ l), criado em Cabra e dirigido contra epítomos de Coelho, durante 90 minutos, à temperatura ambiente, e posterior centrifugação a 3.000 r.p.m., durante 20 minutos, a 4° C. Os níveis de radioactividade presentes no precipitado de cada amostra foram determinados num contador de cintilações gama.

Os resultados do doseamento da angiotensina II foram calculados com base numa curva de calibração realizada simultaneamente e expressos como média \pm erro padrão da média, em que n corresponde ao número de ratos. Os níveis de angiotensina II foram correlacionados com os valores de pressão arterial sistólica de cada rato. Na análise estatística dos resultados fizeram-se comparações múltiplas entre os grupos controlo, DPSPX 3d e DPSPX 14d usando o teste de Newman-Keuls; valores de p inferiores a 0,05 foram considerados significativos.

3. Estudo morfológico

Este estudo foi dividido em duas séries, cada uma com seis grupos de ratos. No dia 0, os ratos foram aleatoriamente distribuídos pelos seguintes grupos:

- soro fisiológico i.p.;
- DPSPX (90 µg/kg/h) i.p.;
- losartan (15 mg/kg/dia) p.o.;
- atenolol (25 mg/kg/dia) p.o.;
- DPSPX (90 µg/kg/h) i.p. e losartan (15 mg/kg/dia) p.o.;
- DPSPX (90 µg/kg/h) i.p. e atenolol (25 mg/kg/dia) p.o..

O DPSPX e o soro fisiológico foram administrados como descrito anteriormente. O losartan e o atenolol foram administrados por via oral, dissolvidos na água. As soluções de losartan e de atenolol foram preparadas diariamente, com base na ingestão de água e no peso do animal respectivo, para controlo eficaz da dose de antihipertensor administrada. As soluções de atenolol foram mantidas em biberões escuros, de modo a prevenir a foto-oxidação do fármaco. As doses de antihipertensor testadas foram escolhidas por serem equipotentes no controlo da pressão arterial (Draper *et al.*, 1992; Rodrigo *et al.*, 1997).

A primeira série de experiências teve a duração de 7 dias; a segunda série, 28 dias. A pressão arterial sistólica dos ratos

de cada grupo foi determinada, da forma usual, antes do dia 0 e no dia 0; a determinação da pressão arterial sistólica foi feita diariamente, ao longo do tratamento da primeira série, e semanalmente, durante o decorrer da segunda série.

No final do estudo (dia 7 para a primeira série, dia 28 para a segunda), os ratos foram pesados e mortos por decapitação. A artéria da cauda foi imediatamente colhida e colocada em solução de Krebs-Henseleit modificada (Guimarães, Osswald, 1969). Depois de limpos de tecido conjuntivo e adiposo e de dissecados, os vasos foram processados para posterior estudo morfológico (Sarmiento *et al.*, 1987; Albino-Teixeira *et al.*, 1990a). Fragmentos arteriais foram fixados com glutaraldeído a 2,5% em tampão de cacodilato 0,1 M, pH 7,4, a 4°C, durante a noite (16-24h). Depois de lavados durante 30 minutos em tampão de cacodilato 0,1 M, pH 7,4, com sacarose 0,6 M, a 4°C, os tecidos foram pós-fixados com tetraóxido de ósmio a 1% em tampão de cacodilato 0,1 M, pH 7,4, a 4°C, durante 2 horas. Em seguida, os tecidos foram desidratados com etanol: a 4°C, 7 minutos em etanol a 30%, 7 minutos em etanol a 50% e 7 minutos em etanol a 75%; depois à temperatura ambiente, 15 minutos em etanol a 90% e 20 minutos em etanol absoluto, 3 vezes. Finalmente, os tecidos foram imersos por 2 vezes, durante 15 minutos, em óxido de propileno, ao qual se adicionou, depois, Epon 812, de modo a permitir o seccionamento transversal. Foram efectuados cortes

semi-finos (1 μm) num ultramicrotomo LKB, a partir de 6-8 blocos representativos de cada situação experimental; os cortes foram posteriormente corados com azul de toluidina a 1% e bórax a 1%, e observados em microscópio óptico.

As lâminas foram codificadas e as determinações realizadas com ocultação. As células musculares lisas vasculares observadas em cada preparação foram desenhadas com o auxílio de uma câmara clara, numa ampliação final de 860 vezes. O diâmetro real das células musculares lisas foi considerado igual ao maior diâmetro perpendicular ao maior eixo (Weibel, 1972). A espessura da camada média da artéria da cauda foi determinada com um micrómetro ocular, calibrado com um micrómetro colocado na objectiva. O menor valor obtido em cada secção transversal foi considerado representativo da espessura real da camada média.

Os resultados foram apresentados sob a forma de média \pm erro padrão da média. Nos resultados da pressão arterial, n corresponde ao número de ratos. No estudo morfológico, mediu-se o diâmetro de todas as células musculares lisas desenhadas para cada rato de cada grupo e utilizou-se a média de cada animal para a análise estatística; n corresponde ao número de células. Na análise estatística dos resultados fizeram-se comparações múltiplas entre os grupos de cada série usando o teste de Newman-Keuls; valores de p inferiores a 0,05 foram considerados significativos.

4. *Estudo da contractilidade vascular*

Os ratos foram submetidos a cirurgia para implante de mini-bombas osmóticas como anteriormente descrito. A pressão arterial sistólica dos ratos de cada grupo foi determinada antes do dia 0, no dia 0 e no fim do estudo.

No final do estudo, dias 3 ou 14, os ratos dos grupos controlo, DPSPX 3d e DPSPX 14d foram mortos por decapitação. O tronco principal da artéria e da veia mesentérica superior foi imediatamente colhido e colocado em solução de Krebs-Henseleit modificada (Guimarães, Osswald, 1969). Os vasos foram limpos de tecido conjuntivo e adiposo, dissecados, cortados em anéis com cerca de 5 mm de comprimento e montados em banhos de órgãos isolados contendo solução de Krebs-Henseleit modificada, arejada com carbogénio e mantida a 37°C. Dois fios de aço inoxidável de 0,05 mm de diâmetro foram introduzidos no lúmen de cada vaso e usados para submeter os vasos a uma tensão inicial de cerca de 4,9 mN. Um dos fios foi fixado no fundo do banho de órgãos isolados; o outro foi ligado a um transdutor isométrico (Letica Tri110 R360Ω), por sua vez acoplado a um polígrafo (Letica Unigraph 2000-5.6) onde se registaram as respostas mecânicas.

Os banhos foram lavados cada 20 min, durante um período de estabilização de 2 h, e os anéis dos vasos foram

estimulados duas vezes com noradrenalina (1 μ M) para confirmar a viabilidade e a estabilidade das preparações. Após este período, foram realizadas curvas concentração-resposta à angiotensina II (1-81 nM), à noradrenalina (30 nM-19 μ M) e ao cloreto de potássio (25-200 mM). As curvas concentração-resposta à angiotensina II foram obtidas de forma não-cumulativa, com 40 minutos de intervalo entre cada adição de concentração crescente do fármaco, para evitar taquifilaxia. As curvas concentração-resposta à noradrenalina e ao cloreto de potássio foram realizadas de forma cumulativa.

As curvas concentração-resposta foram analisadas por regressão não-linear e a melhor curva foi traçada usando o software GraphPad Prism 3.00 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Os resultados foram expressos em efeito contráctil máximo (mN de tensão/mg de tecido) e pD_2 , que representa o logaritmo negativo da concentração molar de agonista que causa 50% da respectiva resposta contráctil máxima. Estes parâmetros foram apresentados sob a forma de média \pm erro padrão da média, em que n corresponde ao número de ratos. Na análise estatística dos resultados fizeram-se comparações múltiplas entre os grupos controlo, DPSPX 3d e DPSPX 14d usando o teste de Newman-Keuls e comparações entre artéria e veia do grupo controlo usando o teste t de Student para valores não emparelhados; valores de p inferiores a 0,05 foram considerados significativos.

5. *Estudo da modulação da neurotransmissão simpática pela angiotensina II*

Os ratos foram submetidos a cirurgia para implante de mini-bombas osmóticas como já foi descrito. A pressão arterial sistólica dos ratos de cada grupo foi determinada antes do dia 0, no dia 0 e no fim do estudo.

Os ratos dos grupos controlo, DPSPX 3d e DPSPX 14d foram mortos, nos dias 3 ou 14, por decapitação. O tronco principal da artéria e da veia mesentérica superior foi imediatamente colhido e colocado em solução de Krebs-Henseleit modificada (Guimarães, Osswald, 1969). Os vasos foram limpos de tecido conjuntivo e adiposo, dissecados e incubados com noradrenalina tritiada ($^3\text{H-NA}$; $0,2 \mu\text{M}$), durante 45 minutos, a 37°C , com agitação e arejamento com carbogénio. Em seguida, cada vaso foi cortado em 2 fragmentos e estes foram montados aleatoriamente num sistema de perfusão de tecidos, mantido a 37°C . A partir deste momento ($t=0$), os tecidos foram perfundidos ($0,8 \text{ ml/min}$) com solução de Krebs-Henseleit modificada, arejada com carbogénio, contendo cocaína ($12 \mu\text{M}$) para bloqueio da recaptação neuronal de noradrenalina.

Os tecidos foram lavados durante 120 minutos; aos 60 minutos, os tecidos foram estimulados electricamente (2 Hz,

2 mseg, 240 pulsos; Stimulator II X, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Germany), durante 2 minutos. A partir dos 120 minutos de perfusão, foram colhidas amostras de perfusado (5 minutos, 4 ml). Os dois segmentos de cada artéria mesentérica e os dois segmentos de cada veia mesentérica, de ratos controlo ou tratados com DPSPX, foram submetidos a dois períodos de estimulação eléctrica (2 Hz, 2 mseg, 5 min, 600 pulsos) aos 140 (S₁) e 190 (S₂) minutos de perfusão. A angiotensina II (1, 3 ou 10 nM) foi adicionada ao líquido de perfusão de um dos segmentos de artéria mesentérica e de um dos segmentos de veia mesentérica a partir do minuto 165; o outro segmento de cada vaso foi usado como controlo, tendo sido perfundido com solução de Krebs-Henseleit modificada durante todo o protocolo. A perfusão foi terminada, aos 220 minutos, os tecidos foram secos em papel de filtro, pesados e colocados em 2 ml de ácido perclórico 0,2 M. Adicionou-se às amostras de perfusado e aos tecidos 4 ml ou 8 ml de mistura de cintilação (Wallac OptiPhase "Hisafe" 3, Fischer Chemicals, Loughborough, UK), respectivamente. A quantidade de ³H-NA presente em cada amostra (perfusado e tecidos) foi determinada por cintilografia líquida (1209 Rackbeta, LKB Wallac, Turku, Finland).

O efeito da exposição aguda ao DPSPX sobre a neurotransmissão simpática foi avaliado em ratos controlo utilizando um protocolo semelhante ao descrito, em que o

DPSPX 10 μM (e não angiotensina II) foi adicionado ao líquido de perfusão a partir do minuto 165. Além disso, o efeito agudo do DPSPX sobre o efeito facilitatório da angiotensina II foi avaliado em ratos controlo utilizando o protocolo descrito mas adicionando DPSPX 10 μM à solução de Krebs-Henseleit modificada desde o minuto 120. A dose de DPSPX foi escolhida por antagonizar as acções da adenosina (Persson *et al.*, 1991).

O efluxo de trítio foi calculado relativamente à quantidade presente no tecido no momento. Considerou-se que o efluxo da amostra anterior à estimulação representava o efluxo basal das amostras seguintes. O efluxo induzido por estimulação eléctrica foi determinado nas amostras cujo efluxo excedeu o da amostra anterior à respectiva estimulação, dividindo o efluxo de trítio induzido por estimulação eléctrica pelo trítio presente no tecido no início da colheita da amostra e pelo número de pulsos (efluxo fraccional).

A modulação exercida pela angiotensina II sobre a libertação de noradrenalina foi avaliada pela razão entre o efluxo de $^3\text{H-NA}$ induzida por estimulação eléctrica na presença e na ausência de angiotensina II, ou seja, pela razão S_2/S_1 . A razão S_2/S_1 do vaso perifundido com angiotensina II foi corrigida pela razão S_2/S_1 obtida no vaso controlo respectivo. As curvas concentração-resposta foram analisadas por regressão não-linear e a melhor curva foi traçada usando o software GraphPad

Prism 3.00 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Os resultados foram expressos em efeito facilitatório máximo (S_2/S_1) e pD_2 , que representa o logaritmo negativo da concentração molar de angiotensina II que causa 50% da resposta máxima. Os parâmetros analisados foram o efluxo fraccional, a razão S_2/S_1 e o pD_2 . Os resultados foram apresentados sob a forma de média \pm erro padrão da média, em que n corresponde ao número de ratos. Na análise estatística dos resultados fizeram-se comparações múltiplas entre os grupos controlo, DPSPX 3d e DPSPX 14d usando o teste de Newman-Keuls e comparações entre artéria e veia usando o teste t de Student para valores não emparelhados; valores de p inferiores a 0,05 foram considerados significativos.

6. *Estudo da sensibilidade ao estímulo doloroso agudo e papel do bolbo raquidiano ventrolateral*

Neste estudo usaram-se ratos com pesos corporais iniciais compreendidos entre 220-230g. A escolha dos pesos foi determinada pela necessidade de realizar posteriormente uma cirurgia estereotáxica para intervir no bolbo raquidiano e esta abordagem requerer animais com peso corporal compreendido entre 285-315 g. Os ratos foram submetidos a cirurgia para implante de mini-bombas osmóticas. A pressão arterial sistólica

dos ratos de cada grupo foi determinada antes do dia 0, no dia 0 e no fim do estudo.

Cada série de experiências envolveu um rato controlo e dois ratos tratados com DPSPX durante sete dias. No dia 10, os ratos foram anestesiados com uma solução volátil de halotano (4% para a indução, 1,5-2% para a manutenção da anestesia). O rato controlo e um dos ratos tratados com DPSPX foram injectados estereotaxicamente no bolbo raquidiano ventrolateral esquerdo com água destilada; o outro rato tratado com DPSPX foi injectado com ácido quinolínico (180 nmol/ μ l; 54 nmol), um agente excitotóxico que leva à morte neuronal por activação de receptores do N-metil-D-aspartato (Stone, Perkins, 1981), poupando fibras de passagem (Schwarcz, Whetsell, Mangano, 1983). As injeções estereotáxicas foram realizadas de acordo com as coordenadas de Paxinos e Watson, 1998. Utilizou-se uma seringa Hamilton de 1 μ l para injectar um volume total de 0,3 μ l, ao longo de 5 minutos; a seringa permaneceu 10 minutos *in situ* antes de ser removida lentamente. Os ratos foram colocados em gaiolas individuais, e voltaram a ter acesso livre a água e a comida.

Vinte e quatro horas após a cirurgia estereotáxica, os ratos foram anestesiados por administração intraperitoneal de hidrato de cloral (0,35 g/kg para a indução, 0,1 g/kg 45 e 90 minutos depois para a manutenção da anestesia) e sujeitos a um estímulo

nóxico mecânico, numa zona restrita da pele da coxa esquerda (Lima, Avelino, Coimbra, 1993; Tavares, Lima, Coimbra, 1993; Tavares, Albino-Teixeira, Lima, 1995): a parte proximal interna da coxa esquerda foi apertada com uma pinça “dentes de Rato” 8 vezes durante 8 segundos, cada 2 minutos, ao longo de 2 horas. Imediatamente após a estimulação nóxica, os ratos foram perfundidos através da aorta ascendente com 200 ml de tampão de fosfatos 0,1M (PBS) e fixados com paraformaldeído a 4% em PBS. O bolbo raquidiano e o segmento espinhal L₂ foram dissecados, pós-fixados em paraformaldeído a 4% em PBS durante 3 horas e mantidos em sacarose 30% pelo tempo necessário.

Num micrótomo de congelação, foram obtidos cortes de bolbo raquidiano e de segmento espinhal L₂, com 80 e 40 µm de espessura, respectivamente. Um em cada dois cortes de bolbo raquidiano foi corado pela técnica da formol-tionina (Donovick, 1974) para identificação dos locais da lesão estereotáxica. Um em cada três cortes do segmento espinhal L₂, área de terminação da maioria das fibras provenientes da zona cutânea sujeita à estimulação nóxica, foi usado para detecção do proto-oncogene *c-fos*, mediante reacção imunocitoquímica dirigida contra a proteína Fos, produto de expressão do gene.

6.1. *Histologia do bolbo raquidiano*

As lâminas histológicas contendo os cortes de bolbo raquidiano foram mergulhadas em acetona ácida durante 5 minutos, rapidamente lavadas com água destilada e coradas com tionina, à temperatura ambiente, durante aproximadamente 5 minutos. Em seguida, foram mergulhadas em água destilada e depois em álcool ácido, para diferenciação, a que se seguiu uma lavagem em água destilada e secagem na estufa a 37°C. Posteriormente, foram passadas por xilol, montadas e codificadas para posterior análise com ocultação.

6.2. *Deteção da proteína Fos por imunohistoquímica*

Os cortes de segmento espinhal L₂ foram sujeitos a duas lavagens de 15 minutos com PBS e tratados 15 minutos com peróxido de hidrogénio a 3%, para inibição da actividade da peroxidase endógena. Os cortes foram, então, lavados durante 15 minutos com PBS e depois com Triton a 1,2% em PBS (PBST) e incubados durante 1 hora com glicina a 1,2% em soro normal de Porco (NSS) a 10% em PBST, à temperatura ambiente, para impedir ligações inespecíficas dos anticorpos. Os cortes foram depois incubados, durante a noite (16-24h), à

temperatura ambiente e com agitação constante, com um anticorpo primário anti-Fos criado em Coelho, na diluição de 1:10.000 em PBST contendo NSS a 2% (PBST/NSS).

Depois da incubação com o anticorpo primário, os cortes foram lavados duas vezes, durante 15 minutos cada, com PBST/NSS, e incubados, durante 1 hora, com um anticorpo secundário biotilado criado em Porco e dirigido contra epítomos de Coelho, na diluição de 1:200 em PBST/NSS. Após lavagens de 15 minutos com PBST/NSS duas vezes, e com PBST uma vez, os cortes foram incubados durante 1 hora com o reagente ABC (complexo avidina-biotina, preparado com uma antecedência de pelo menos 45 minutos), na diluição de 1:100. Esta etapa permitiu amplificar a reacção anticorpo secundário-anticorpo primário.

Os cortes foram depois sujeitos a nova sequência de lavagens de 15 minutos: duas vezes com PBST, uma vez com PBS e uma vez com o tampão Tris pH 7,6, 0,05M. Em seguida, a reacção anticorpo secundário-anticorpo primário foi revelada com 3,3'-diaminobenzidina (DAB) em Tris pH 7,6, 0,05M, na presença de 0,025% de peróxido de hidrogénio. A reacção, visível pelo aparecimento de coloração castanha, foi monitorizada por observação ao microscópio óptico e terminada por lavagem durante 15 minutos com Tris pH 7,6, 0,05M e depois com PBS. Finalmente, os cortes foram montados em lâminas revestidas com gelatina.

As lâminas foram codificadas e as determinações realizadas com ocultação. Os núcleos imunorreactivos para a proteína Fos foram identificados pela sua coloração castanha. Com o auxílio de uma câmara clara, numa ampliação final de 260 vezes, foram desenhados e contados todos os núcleos imunorreactivos para a proteína Fos presentes em 10 cortes de cada rato, seleccionados aleatoriamente.

Os resultados foram apresentados sob a forma de média \pm erro padrão da média, em que n corresponde ao número de ratos. A análise estatística dos resultados foi feita por comparações múltiplas emparelhadas entre os três grupos de cada série, usando o teste de Tukey-Kramer; valores de p inferiores a 0,05 foram considerados significativos.

Resultados

1. *Introdução*

O tratamento dos ratos com DPSPX (90 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$) induziu um aumento dos valores de pressão arterial sistólica em relação aos ratos tratados com soro fisiológico. Os valores de pressão arterial sistólica correspondentes a cada grupo de animais serão apresentados para cada estudo realizado. Em todos os ratos tratados com DPSPX observou-se fibrose peritoneal marcada.

2. *Doseamento dos níveis plasmáticos de angiotensina II*

O tratamento dos ratos com DPSPX induziu um aumento dos valores de pressão arterial sistólica; os ratos dos grupos DPSPX 3d e DPSPX 14d apresentaram valores de pressão arterial sistólica superiores aos observados no grupo controlo

(Tabela 1). A elevação tensional foi acompanhada de um aumento dos níveis plasmáticos de angiotensina II (Tabela 1).

Tabela 1. Pressão arterial sistólica (PAS; mmHg) e níveis plasmáticos de angiotensina II (pg/ml) dos ratos controlo e tratados com DPSPX.

Grupo	PAS (mmHg)	Angiotensina II (pg/ml)
Controlo	115±0,3	100,8±4,5
DPSPX 3d	135±0,5*	137,8±13,0*
DPSPX 14d	144±0,7#	240,6±17,3#

Resultados expressos como média ± erro padrão da média. * vs controlo respectivo ($p < 0,05$); # vs controlo e DPSPX 3d respectivos ($p < 0,05$); $n = 7-10$ ratos.

Verificou-se uma correlação positiva entre os níveis plasmáticos de angiotensina II e os valores de pressão arterial sistólica ($r^2 = 0,786$).

A eficácia da extracção de angiotensina II das amostras de plasma foi calculada a partir da adição de ^{125}I -angiotensina II a amostras de plasma antes da extracção; a percentagem de recuperação foi de $95.7 \pm 4.3\%$ ($n = 10$). O limite de detecção do ensaio é inferior a $1 \text{ pg}/100 \mu\text{l}$.

3. Estudo morfológico

3.1. Perfil da pressão arterial

A infusão contínua de DPSPX durante sete dias induziu uma subida gradual da pressão arterial sistólica dos ratos tratados, em ambas as séries do estudo (Figura 1A e B); na segunda série, os valores mantiveram-se elevados até ao fim do estudo (dia 28; Figura 1B).

A elevação tensional induzida pelo DPSPX foi prevenida quer pelo losartan (15 mg/kg/d) quer pelo atenolol (25 mg/kg/d), em ambas as séries do estudo (Figura 1A e B).

O losartan e o atenolol não alteraram a pressão arterial dos ratos tratados com soro fisiológico (Figura 2A e B).

3.2. Estudo morfológico

As artérias da cauda dos ratos tratados com DPSPX durante sete dias apresentaram, aos dias 7 e 28, alterações morfológicas marcadas. Em microscopia óptica foi possível observar uma redução acentuada do lúmen e hiperplasia subintimal com desenvolvimento de botões de músculo liso na

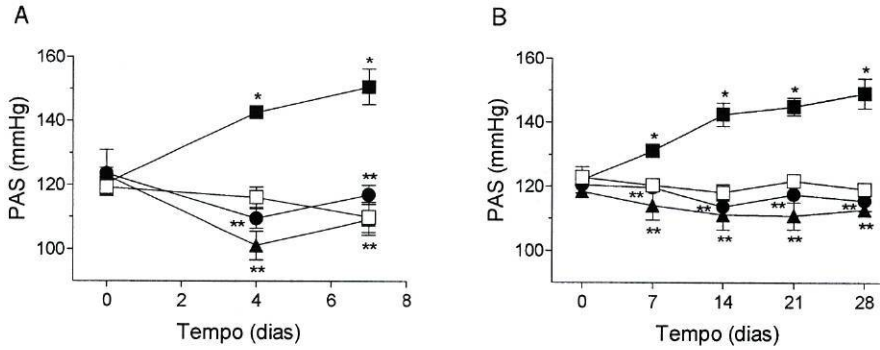


Figura 1. Perfil da pressão arterial sistólica (PAS; mmHg) ao longo da primeira (A) e da segunda (B) séries do estudo para os grupos controlo (□), DPSPX (■), DPSPX+losartan (▲) e DPSPX+atenolol (●). Resultados expressos como média \pm erro padrão da média. * vs controlo correspondente ($p < 0,05$), ** vs DPSPX correspondente ($p < 0,05$); $n = 4-6$ ratos em cada grupo.

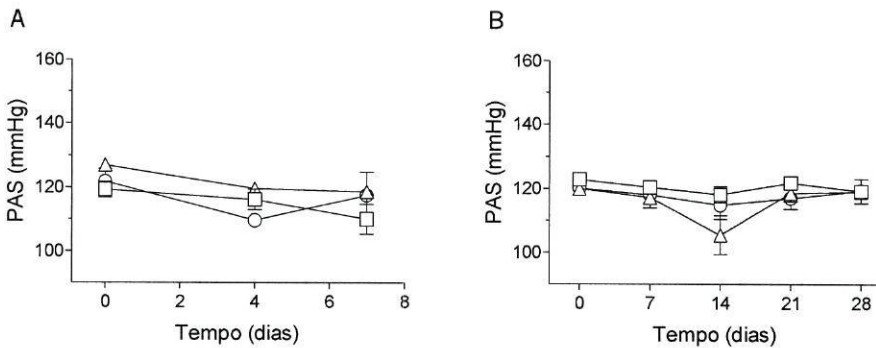


Figura 2. Perfil da pressão arterial sistólica (PAS; mmHg) ao longo da primeira (A) e da segunda (B) séries do estudo para os grupos controlo (□), losartan (Δ) e atenolol (○). Os grupos do estudo foram separados entre as Figuras 1 e 2 para maior clareza dos gráficos. Resultados expressos como média \pm erro padrão da média.

camada íntima dos mesmos vasos (Imagem 1). O losartan preveniu a hiperplasia das células musculares lisas induzida pelo DPSPX (Imagem 1). No grupo tratado simultaneamente com DPSPX e atenolol continuou a observar-se hiperplasia subintimal (Imagem 1).

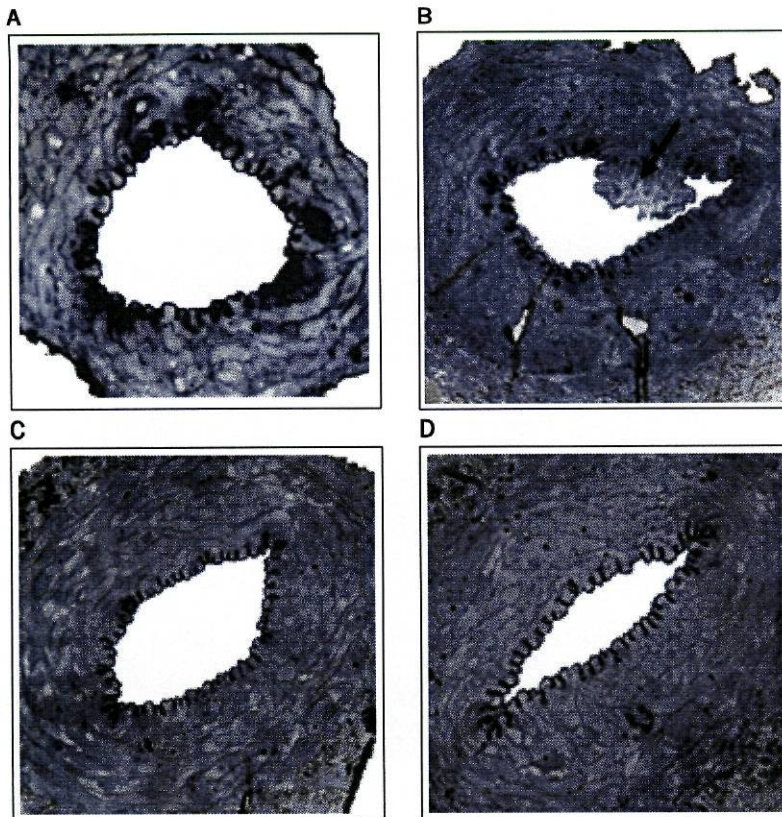


Imagem 1. Fotografias representativas de cortes de artéria da cauda de ratos dos grupos controlo (A), DPSPX (B), DPSPX+losartan (C) e DPSPX+atenolol (D). A seta preta (B) evidencia um botão de células musculares lisas formando uma protuberância em direcção ao lúmen vascular, característico da hipertensão por infusão de DPSPX.

O DPSPX induziu hipertrofia das células musculares lisas da artéria da cauda (Tabela 2), em relação aos respectivos grupos controle.

No dia 7, o diâmetro das células musculares lisas da artéria da cauda do grupo hipertenso por infusão de DPSPX era superior ao do respectivo grupo controle (Tabela 2). O losartan preveniu a hipertrofia das células musculares lisas induzida pelo DPSPX (Tabela 2). O atenolol atenuou mas não preveniu a hipertrofia das células musculares lisas induzida pelo DPSPX (Tabela 2). O losartan e o atenolol não alteraram a morfologia do grupo controle (Tabela 2).

No dia 28, o diâmetro das células musculares lisas do grupo hipertenso pelo DPSPX era superior ao do respectivo grupo controle (Tabela 2), sendo este aumento superior ao observado ao dia 7 (51% vs 43%; Tabela 2). No grupo tratado simultaneamente com DPSPX e losartan, não só se observou prevenção da hipertrofia das células musculares lisas induzida pelo DPSPX como ainda se registou uma diminuição do diâmetro das células musculares lisas quando comparado com o grupo controle (Tabela 2). Apesar disso, o losartan só por si não alterou a morfologia do grupo controle (Tabela 2). Mais uma vez, o atenolol atenuou mas não preveniu a hipertrofia induzida pelo DPSPX (Tabela 2). Surpreendentemente, nos ratos tratados apenas com atenolol durante 28 dias observou-se um aumento

Tabela 2. Diâmetro (μm) das células musculares lisas da artéria da cauda de cada grupo da primeira (dia 7) e da segunda (dia 28) séries do estudo.

Grupo	Dia 7	Dia 28
Controlo	6.72 \pm 0.21	6.87 \pm 0.19
Losartan	7.10 \pm 0.31	6.75 \pm 0.03
Atenolol	7.04 \pm 0.37	8.73 \pm 0.06 ^x
DPSPX	9.61 \pm 0.31 ^x	10.38 \pm 0.05 ^x
DPSPX+Losartan	7.10 \pm 0.42	6.43 \pm 0.04 ^x
DPSPX+Atenolol	8.53 \pm 0.44 ^x	7.43 \pm 0.03 ^x

Resultados expressos como média \pm erro padrão da média. ^x vs todos os grupos da mesma série ($p < 0,05$); $n = 600-800$ células (dia 7); $n = 800-2500$ células (dia 28).

Tabela 3. Espessura (μm) da artéria da cauda de cada grupo da segunda série do estudo (dia 28).

Grupo	Dia 28
Controlo	46.0 \pm 2.7
Losartan	47.2 \pm 3.1
Atenolol	48.2 \pm 3.3
DPSPX	68.7 \pm 3.4 [*]
DPSPX+Losartan	48.9 \pm 3.5 ^{**}
DPSPX+Atenolol	57.1 \pm 2.9 ^{**}

Resultados expressos como média \pm erro padrão da média. ^{*} vs controlo ($p < 0,05$); ^{**} vs DPSPX ($p < 0,05$); $n = 6$ vasos.

do diâmetro das células musculares lisas da artéria da cauda em relação ao grupo controlo (Tabela 2).

O DPSPX induziu um aumento da espessura da artéria da cauda (Tabela 3). Este aumento foi prevenido pelo losartan e pelo atenolol (Tabela 3). O losartan e o atenolol não alteraram a espessura da artéria da cauda dos ratos controlo (Tabela 3).

4. *Estudo da contractilidade vascular*

Os ratos tratados com DPSPX durante 7 dias apresentaram valores de pressão arterial sistólica superiores aos do grupo controlo, quer ao dia 3 quer ao dia 14 (Tabela 4).

Tabela 4. Pressão arterial sistólica (PAS; mmHg) dos ratos controlo e tratados com DPSPX.

Grupo	PAS (mmHg)
Controlo	114±0.3
DPSPX 3d	138±0.4*
DPSPX 14d	147±0.5#

Resultados expressos como média ± erro padrão da média. * vs controlo ($p < 0,05$); # vs controlo e DPSPX 3d ($p < 0,05$); $n = 7 \cdot 10$ ratos.

A angiotensina II, a noradrenalina e o cloreto de potássio causaram contracções da artéria e da veia mesentéricas de forma dependente da concentração (Figura 3). No grupo controlo, as respostas contrácteis dos contracturantes testados foram diferentes na artéria e na veia mesentérica. A tensão máxima desenvolvida pela angiotensina II na veia mesentérica de ratos controlo foi cerca de oito vezes superior à tensão máxima desenvolvida na artéria mesentérica (Figura 3A e B e Tabelas 5A e 6A). O cloreto de potássio também causou uma tensão máxima superior na veia mesentérica de ratos controlo, sendo cerca de duas vezes a tensão máxima desenvolvida na artéria mesentérica (Figura 3E e F e Tabelas 5A e 6A). Inversamente, a tensão máxima desenvolvida pela noradrenalina foi cerca de 2,5 vezes maior na artéria mesentérica (Figura 3C e D e Tabelas 5A e 6A).

A hipertensão causada pelo DPSPX não influenciou da mesma forma as respostas contrácteis dos contracturantes testados.

4.1. *Artéria mesentérica*

Na artéria mesentérica de ratos controlo, a ordem de eficácia dos contracturantes testados foi noradrenalina > cloreto

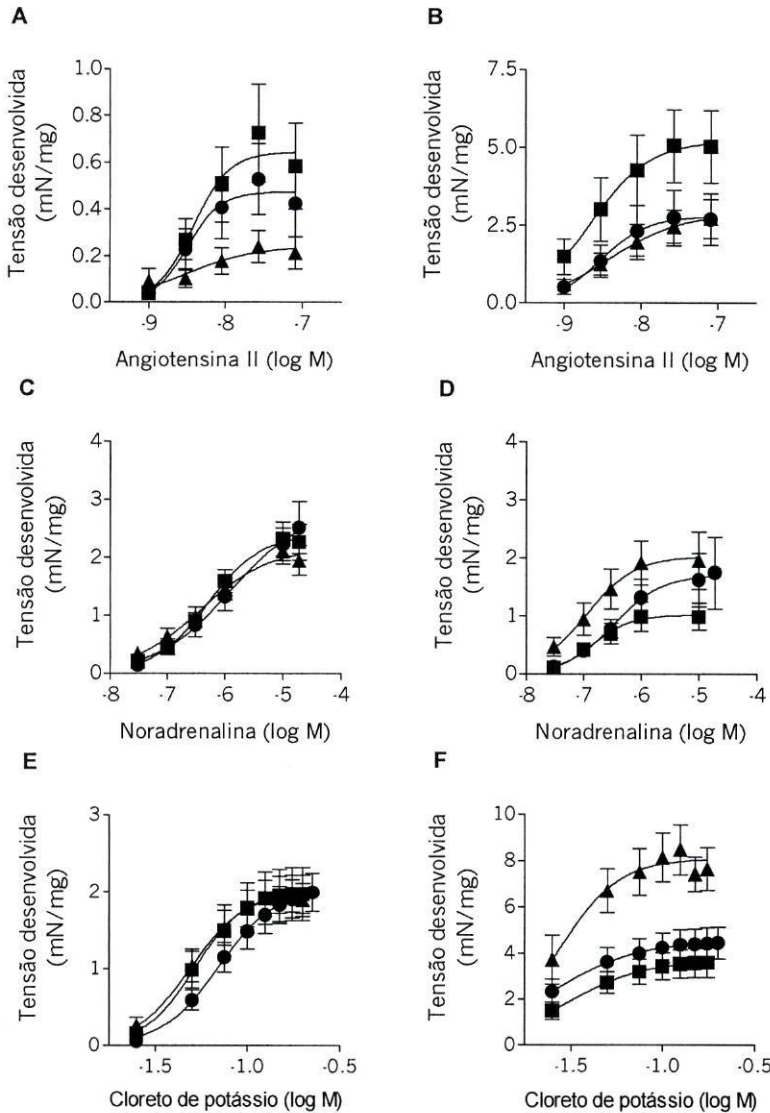


Figura 3. Curvas concentração-resposta à angiotensina II (A, B), noradrenalina (C, D) e cloreto de potássio (E, F) obtidas em anéis de artéria (esquerda) e veia (direita) mesentérica de ratos dos grupos controlo (■), DPSPX 3d (▲) e DPSPX 14d (●). Resultados expressos como média \pm erro padrão da média; $n=6-12$ ratos em cada grupo.

Tabela 5A. Tensão máxima desenvolvida (mN/mg) pela angiotensina II (AngII), noradrenalina (NA) e cloreto de potássio (KCl) em anéis de artéria mesentérica de ratos controlo e hipertensos por infusão de DPSPX.

Grupo	Tensão máxima desenvolvida (mN/mg)		
	AngII	NA	KCl
Controlo	0.66±0.07	2.40±0.06	2.01±0.02
DPSPX 3d	0.24±0.05*	2.17±0.13	2.00±0.03
DPSPX 14d	0.47±0.04#	2.86±0.21#	2.06±0.03

Resultados expressos como média ± erro padrão da média. * vs controlo para o mesmo agonista ($p < 0,05$); # vs controlo e DPSPX 3d para o mesmo agonista ($p < 0,05$); $n = 6-12$ ratos.

Tabela 5B. Valores de pD_2 para a angiotensina II (AngII), noradrenalina (NA) e cloreto de potássio (KCl) em anéis de artéria mesentérica de ratos controlo e hipertensos por infusão de DPSPX.

Grupo	pD_2		
	AngII	NA	KCl
Controlo	8.42±0.13	6.30±0.05	1.29±0.01
DPSPX 3d	8.51±0.26	6.43±0.12	1.31±0.01
DPSPX 14d	8.50±0.11	5.90±0.14#	1.15±0.01#

Resultados expressos como média ± erro padrão da média. # vs controlo e DPSPX 3d para o mesmo agonista ($p < 0,05$); $n = 6-12$ ratos.

de potássio > angiotensina II, e a ordem de potência foi angiotensina II > noradrenalina > cloreto de potássio (Figura 3), como se pode verificar pela análise dos respectivos valores de tensão máxima desenvolvida (Tabela 5A) e pD_2 (Tabela 5B), respectivamente.

No grupo DPSPX 3d observou-se uma redução marcada da tensão máxima desenvolvida pela angiotensina II (cerca de 65% de redução; Figura 3A e Tabela 5A), sem haver alteração da tensão máxima desenvolvida pela noradrenalina (Figura 3C e Tabela 5A) ou pelo cloreto de potássio (Figura 3E e Tabela 5A). Não houve alteração na potência dos três contracturantes, no grupo DPSPX 3d (Figura 3 e Tabela 5B). No dia 14, isto é, sete dias após o término da infusão de DPSPX, a tensão máxima desenvolvida pela angiotensina II ainda se encontrava abaixo do valor controlo, embora não tanto como o verificado no dia 3 (Figura 3A e Tabela 5A). A tensão máxima desenvolvida pela noradrenalina foi ligeiramente maior do que a do grupo controlo (Figura 3C e Tabela 5A) enquanto que a tensão máxima desenvolvida pelo cloreto de potássio não sofreu qualquer alteração (Figura 3E e Tabela 5A). A potência da angiotensina II não foi alterada (Figura 3A e Tabela 5B), enquanto que a da noradrenalina (Figura 3C e Tabela 5B) e a do cloreto de potássio aumentou ligeiramente (Figura 3E e Tabela 5B), em relação à situação controlo.

4.2. Veia mesentérica

Na veia mesentérica de ratos controlo, a ordem de eficácia foi angiotensina II > cloreto de potássio > noradrenalina, e a ordem de potência foi angiotensina II > noradrenalina > cloreto de potássio (Figura 3 e Tabelas 6A e 6B).

No grupo DPSPX 3d observou-se uma redução da tensão máxima desenvolvida pela angiotensina II (Figura 3B e Tabela 6A) e um aumento da tensão máxima desenvolvida pela noradrenalina (Figura 3D e Tabela 6A) e pelo cloreto de potássio (Figura 3F e Tabela 6A). Observou-se uma ligeira diminuição da potência da angiotensina II (Figura 3B e Tabela 6B) mas não da potência da noradrenalina (Figura 3D e Tabela 6B) e do cloreto de potássio (Figura 3F e Tabela 6B). A menor tensão desenvolvida pela angiotensina II manteve-se no grupo DPSPX 14d (Figura 3B e Tabela 6A), enquanto que o aumento da tensão máxima desenvolvida pela noradrenalina (Figura 3D e Tabela 6A) e pelo cloreto de potássio (Figura 3F e Tabela 6A) não foi tão acentuado como grupo DPSPX 3d. A potência da angiotensina II (Figura 3B e Tabela 6B) e da noradrenalina (Figura 3D e Tabela 6B) diminuiu ligeiramente, enquanto que a do cloreto de potássio aumentou ligeiramente (Figura 3F e Tabela 6B).

Tabela 6A. Tensão máxima desenvolvida (mN/mg) pela angiotensina II (AngII), noradrenalina (NA) e cloreto de potássio (KCl) em anéis de veia mesentérica de ratos controlo e hipertensos por infusão de DPSPX.

Grupo	Tensão máxima desenvolvida (mN/mg)		
	AngII	NA	KCl
Controlo	5.20±0.13	1.01±0.05	3.72±0.02
DPSPX 3d	2.85±0.02*	2.03±0.09*	8.11±0.33*
DPSPX 14d	2.78±0.07*	1.71±0.04 [#]	4.54±0.02 [#]

Resultados expressos como média ± erro padrão da média. * vs controlo para o mesmo agonista ($p < 0,05$); [#] vs controlo e DPSPX 3d para o mesmo agonista ($p < 0,05$); $n = 6-12$ ratos.

Tabela 6B. Valores de pD_2 para a angiotensina II (AngII), noradrenalina (NA) e cloreto de potássio (KCl) em anéis de veia mesentérica de ratos controlo e hipertensos por infusão de DPSPX.

Grupo	pD_2		
	AngII	NA	KCl
Controlo	8.65±0.04	6.84±0.07	1.52±0.01
DPSPX 3d	8.40±0.01*	6.96±0.07	1.57±0.03
DPSPX 14d	8.52±0.04 [#]	6.47±0.04 [#]	1.61±0.01*

Resultados expressos como média ± erro padrão da média. * vs controlo para o mesmo agonista ($p < 0,05$); [#] vs controlo e DPSPX 3d para o mesmo agonista ($p < 0,05$); $n = 6-12$ ratos.

5. Estudo da modulação da neurotransmissão simpática pela angiotensina II

Os ratos tratados com DPSPX durante 7 dias apresentaram valores de pressão arterial sistólica superiores aos do grupo controlo, quer ao dia 3 quer ao dia 14 (Tabela 7).

Tabela 7. Pressão arterial sistólica (PAS; mmHg) dos ratos controlo e tratados com DPSPX.

Grupo	PAS (mmHg)
Controlo	112±0.2
DPSPX 3d	137±0.4*
DPSPX 14d	150±0.3#

Resultados expressos como média ± erro padrão da média. * vs controlo ($p < 0,05$); # vs controlo e DPSPX 3d ($p < 0,05$); $n = 7-10$ ratos.

A angiotensina II induziu um aumento da libertação de ^3H -NA na artéria e na veia mesentéricas, de forma dependente da concentração (Figura 4). No grupo controlo, o efeito facilitatório máximo da angiotensina II sobre a libertação de ^3H -NA foi semelhante entre a artéria ($42 \pm 10\%$) e a veia ($37 \pm 13\%$) mesentéricas (Figura 4 e Tabela 8A).

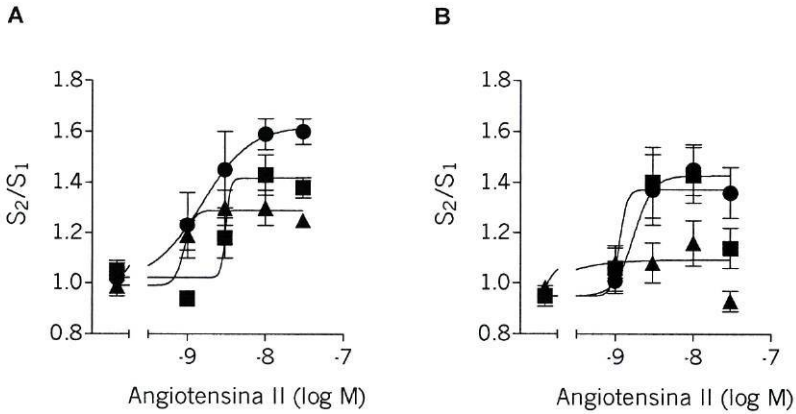


Figura 4. Curvas concentração-resposta para o efeito modulador da angiotensina II sobre a neurotransmissão simpática na artéria (A) e na veia (B) mesentéricas de ratos dos grupos controle (■), DPSPX 3d (▲) e DPSPX 14d (●). Resultados expressos como média \pm erro padrão da média; n=6-12 ratos em cada grupo.

5.1. Artéria mesentérica

O efluxo fraccional de $^3\text{H-NA}$ na artéria de ratos controle ($5,2 \pm 0,5 \times 10^{-5}$ pulso $^{-1}$) foi igual aos grupos DPSPX 3d ($5,4 \pm 0,4 \times 10^{-5}$ pulso $^{-1}$) e DPSPX 14d ($6,3 \pm 0,8 \times 10^{-5}$ pulso $^{-1}$). O efeito facilitatório da angiotensina II foi igual na artéria mesentérica de ratos DPSPX 3d (Figura 4A e Tabela 8A). No entanto, nos ratos DPSPX 14d o efeito facilitatório da angiotensina II foi superior ao dos grupos controle e DPSPX 3d (Figura 4A e Tabela 8A). Não se observaram diferenças na potência da angiotensina II na artéria mesentérica de ratos controle e hipertensos por infusão de DPSPX (Figura 4A e Tabela 8B).

Tabela 8A. Efeito facilitatório máximo (S_2/S_1) da angiotensina II para o efeito modulador da neurotransmissão simpática na artéria e na veia mesentérica de ratos controlo e hipertensos por infusão de DPSPX.

Grupo	Efeito facilitatório máximo (S_2/S_1)	
	Artéria	Veia
Controlo	1,42±0,10	1,37±0,13
DPSPX 3d	1,29±0,02	1,09±0,19
DPSPX 14d	1,62±0,02*	1,43±0,04

Resultados expressos como média ± erro padrão da média. * vs controlo respectivo ($p < 0,05$); $n = 6-9$ ratos.

Tabela 8B. Valores de pD_2 para a angiotensina II para o efeito modulador da neurotransmissão simpática na artéria e na veia mesentérica de ratos controlo e hipertensos por infusão de DPSPX.

Grupo	pD_2	
	Artéria	Veia
Controlo	8,51±4,99	8,95±12,46
DPSPX 3d	9,04±4,78	10,24±12,98
DPSPX 14d	8,82±0,03	8,76±0,09

Resultados expressos como média ± erro padrão da média. * vs controlo respectivo ($p < 0,05$); $n = 6-9$ ratos.

Na artéria mesentérica, o DPSPX (10 μ M) *in vitro*, facilitou (42%) a libertação de 3 H-NA induzida por estimulação eléctrica (Figura 5A). O efeito facilitatório do DPSPX foi semelhante ao da concentração mais elevada de angiotensina II testada (10 nM; Figura 5A). O DPSPX *in vitro* não alterou a resposta facilitatória da angiotensina II sobre a neurotransmissão simpática (Figura 5A).

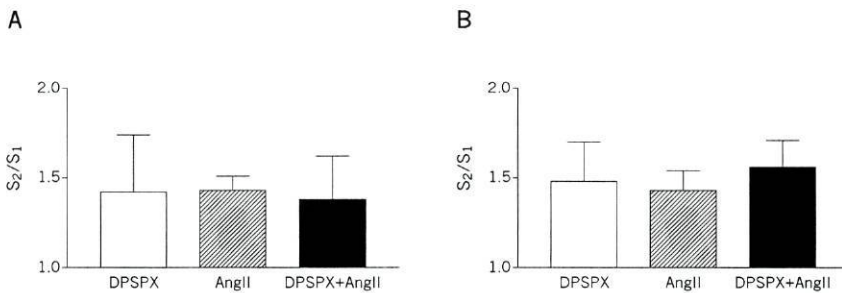


Figura 5. Efeito facilitatório (S_2/S_1) do DPSPX sobre a neurotransmissão simpática e modulação do efeito facilitatório da angiotensina II pelo DPSPX na artéria (A) e na veia (B) mesentéricas de ratos controlo. Resultados expressos como média \pm erro padrão da média; $n=4-6$ ratos em cada grupo.

5.2. Veia mesentérica

Na veia mesentérica, o efluxo fraccional de 3 H-NA ($3,7 \pm 0,9 \times 10^{-5}$ pulso $^{-1}$) do grupo controlo foi igual ao dos grupos DPSPX 3d ($3,5 \pm 0,3 \times 10^{-5}$ pulso $^{-1}$) e DPSPX 14d

($3,4 \pm 0,3 \times 10^{-5}$ pulso $^{-1}$). A hipertensão induzida pelo DPSPX não alterou o efeito facilitatório da angiotensina II na veia mesentérica (Figura 4B e Tabela 8A). Não se observaram diferenças na potência da angiotensina II na veia mesentérica de ratos controlo e hipertensos por infusão de DPSPX (Figura 4B e Tabela 8B).

Na veia mesentérica, o DPSPX (10 μ M) *in vitro*, facilitou (48%) a libertação de 3 H-NA induzida por estimulação eléctrica (Figura 5B) mas não alterou a resposta facilitatória da angiotensina II sobre a neurotransmissão simpática (Figura 5B).

6. *Estudo da sensibilidade ao estímulo doloroso agudo e papel do bolbo raquidiano ventrolateral*

6.1. *Histologia do bolbo raquidiano*

A injeção de ácido quinolínico ao nível do bolbo raquidiano ventrolateral causou destruição de neurónios, em contraste com as injeções de água destilada (Imagem 2). Observou-se igualmente uma ligeira proliferação de células da glia (Imagem 2). Os locais de injeção não diferiram muito de animal para animal.

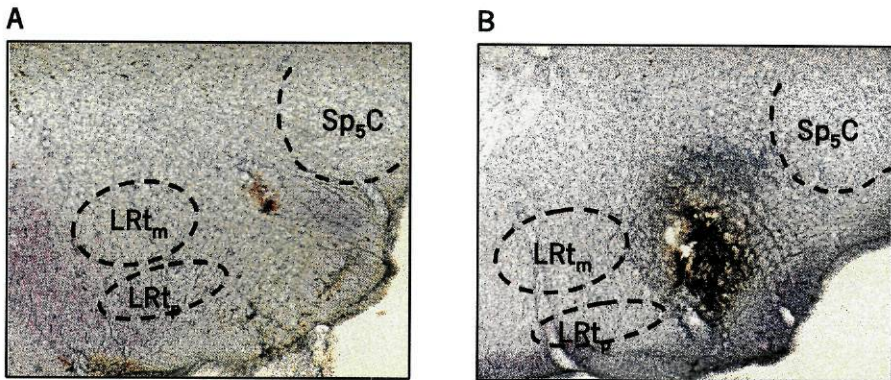


Imagem 2. Fotografias representativas de cortes de bolbo raquidiano ao nível ventrolateral. Injecção com água destilada (A) ou com ácido quinolínic (B). Sp₅C: núcleo trigémio espinhal, *pars caudalis*; LR_{t_m}: núcleo reticular lateral magnocelular; LR_{t_p}: núcleo reticular lateral parvocelular.

6.2. Expressão da proteína Fos

No grupo controlo, os núcleos imunorreactivos para a proteína Fos distribuíam-se por todo o corno dorsal ipsilateral ao membro sujeito a estimulação nóxica (Imagem 3 e Figura 6B). No grupo de ratos hipertensos por infusão de DPSPX observou-se uma redução marcada do número de núcleos imunorreactivos para a proteína Fos (Imagem 3 e Figura 6). Esta redução atingiu os 53% quando se considerava todo o corno dorsal (Figura 6A) e foi mais marcada nas camadas mais profundas (III-VII) do que nas superficiais (I-II; Figura 6B). Nos ratos hipertensos por infusão de DPSPX em que se procedeu à

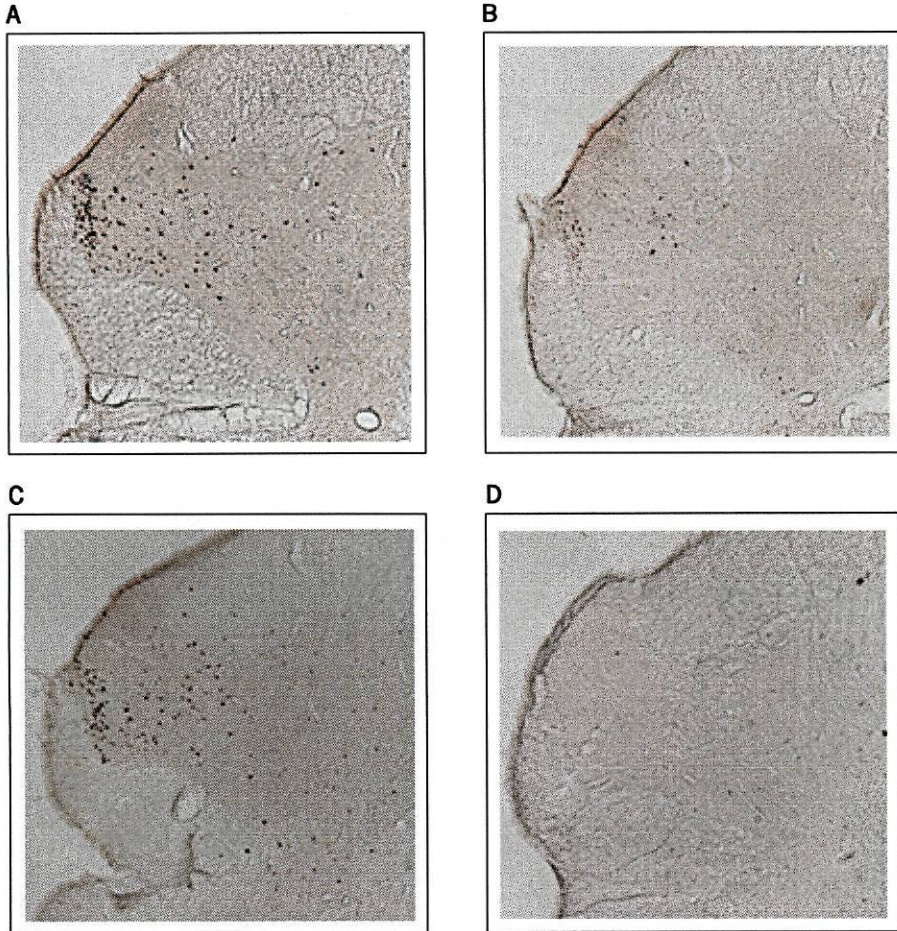


Imagem 3. Fotografias representativas de cortes de segmento espinhal L₂ ao nível do corno dorsal; a castanho observam-se os núcleos imunorreactivos para a proteína Fos. Ratos controlo (A), hipertensos pelo DPSPX e sem lesão do bulbo raquidiano ventrolateral (B) e hipertensos pelo DPSPX com lesão do bulbo raquidiano ventrolateral (C). Exemplo de um corte de segmento espinhal L₂ ao nível do corno dorsal de um rato não sujeito a qualquer procedimento experimental (D).

lesão do bolbo raquidiano ventrolateral com ácido quinolínico não se observaram diferenças no número de núcleos imunorreactivos para a proteína Fos em relação ao grupo controlo (Imagem 3 e Figura 6).

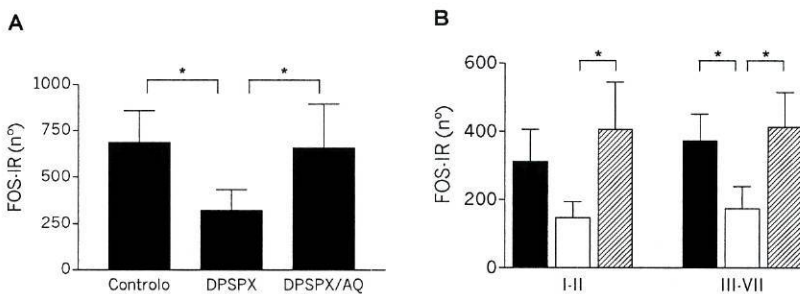


Figura 6. Número de núcleos imunorreactivos para a proteína Fos na substância cinzenta espinhal total (A) e nas camadas espinhais superficiais (I-II) e profundas (III-VII) (B) de ratos controlo (barras a cheio), hipertensos por infusão de DPSPX e sem lesão do bolbo raquidiano ventrolateral (barras brancas) e hipertensos por infusão de DPSPX com lesão do bolbo raquidiano ventrolateral (barras às riscas). Resultados expressos como média±erro padrão da média; * $p < 0,05$; $n = 4$ ratos em cada grupo.

Discussão

No início deste trabalho alguns factos apontavam para a existência de activação do sistema renina-angiotensina na hipertensão induzida pelo DPSPX: (1) os níveis elevados de actividade da renina plasmática (Albino-Teixeira, Osswald, 1994; Sousa, Morato, Albino-Teixeira, 2002), (2) a semelhança entre as alterações morfológicas observadas na hipertensão induzida pelo DPSPX e na hipertensão por infusão de angiotensina II (McCubbin *et al.*, 1965), (3) a potenciação da hipertensão e das alterações morfológicas induzidas pelo DPSPX pela estenose da artéria renal (Albino-Teixeira, Osswald, 1994) e (4) a prevenção de ambas por um inibidor da enzima de conversão da angiotensina II (Sousa, Morato, Albino-Teixeira, 2002). Os resultados obtidos no decorrer dos trabalhos descritos nesta dissertação vieram, directa e indirectamente, sustentar a veracidade dessa hipótese.

Doseamento dos níveis plasmáticos de angiotensina II

Os níveis elevados de angiotensina II plasmática e a sua correlação positiva com a pressão arterial evidenciam o papel da activação do sistema renina-angiotensina na hipertensão induzida pelo DPSPX (Morato *et al.*, 2002). De facto, 3 dias após o início da infusão de DPSPX o teor de angiotensina II plasmática é 38% superior ao dos ratos controlo, enquanto que no dia 14 (7 dias após 7 dias de infusão de DPSPX) o aumento da angiotensina II plasmática atinge os 140% (Morato *et al.*, 2002). Nos ratos hipertensos por infusão de DPSPX observa-se assim aumento da actividade da renina plasmática (Sousa, Morato, Albino-Teixeira, 2002) e do teor de angiotensina II plasmática (tabela 1; Morato *et al.*, 2002), dois componentes fundamentais do sistema renina-angiotensina. A adenosina funciona como um frenador fisiológico da libertação de renina (revisto por Jackson, 1991) nas células justaglomerulares renais (Tagawa, Vander, 1970; Osswald, Schmitz, Kemper, 1978) sobretudo durante situações de activação do referido sistema (Kuan, Wells, Jackson, 1990). A infusão de DPSPX causa um efeito desinibitório já que o antagonismo dos receptores da adenosina bloqueia a frenação da libertação de renina, activando o sistema renina-angiotensina.

O doseamento plasmático da angiotensina II foi realizado

apenas no dia 3 e no dia 14 da hipertensão induzida pelo DPSPX, pelo que não se sabe se o aumento constatado é progressivo e ao dia 14 ainda se encontra em fase de aumento, ou se aumenta apenas durante os 7 dias em que ocorre a administração de DPSPX e o teor de angiotensina II plasmática encontrado ao dia 14 corresponde a uma fase estacionária com início no dia 7. O DPSPX é rapidamente eliminado, intacto, pelo organismo (Tofovic *et al.*, 1991). Além disso, o tratamento de ratos durante 7 dias com DPSPX não parece alterar a farmacologia dos receptores vasculares (Ralevic, Rubino, Burnstock, 1996) e cardíacos (Rubino, Burnstock, 1995) da adenosina. Terminada a infusão de DPSPX (dia 7), a capacidade da adenosina inibir a libertação de renina deve permanecer inalterada.

Estudo morfológico

O estudo morfológico realizado acrescentou mais uma evidência, ainda que indirecta, do papel fundamental que o sistema renina-angiotensina tem na hipertensão induzida pelo DPSPX.

No presente estudo na artéria da cauda de ratos hipertensos por infusão de DPSPX (Morato *et al.*, 2003),

confirmaram-se as alterações morfológicas já descritas para o território vascular (Albino-Teixeira *et al.*, 1991; Matias *et al.*, 1991), nomeadamente (1) o estreitamento do lúmen vascular por proliferação de células musculares lisas subintimais que formam botões de músculo liso em direcção ao lúmen, (2) a maior espessura da camada média vascular, (3) a hipertrofia das células musculares lisas, avaliada pelo aumento do diâmetro médio celular e (4) a existência de bifurcações da lâmina elástica interna com inclusão de células musculares lisas no espaço interlaminal. Neste estudo foram testados dois antihipertensores com diferentes mecanismos de acção. O losartan, um antagonista dos receptores AT₁ da angiotensina II, preveniu a hipertensão e as alterações morfológicas induzidas pelo DPSPX (Morato *et al.*, 2003). O atenolol, um antagonista dos adrenoreceptores β_1 , preveniu a hipertensão induzida pelo DPSPX mas não as alterações morfológicas (Morato *et al.*, 2003). A prevenção da hipertensão e das alterações morfológicas induzidas pelo DPSPX tinha já sido observada com o captopril, um inibidor da enzima de conversão da angiotensina (Sousa, Morato, Albino-Teixeira, 2002).

A dissociação/independência da hipertensão e das alterações morfológicas vasculares é uma questão ainda em aberto no campo da hipertensão. A elevação prolongada da pressão arterial, qualquer que seja a sua origem, induz alterações morfológicas vasculares. No entanto, as alterações

morfológicas vasculares podem surgir independentemente de alterações na pressão arterial. É possível detectar alterações morfológicas vasculares em descendentes normotensos de indivíduos hipertensos (Takeshita *et al.*, 1982; Giannattasio *et al.*, 1995). Na hipertensão experimental, as alterações morfológicas vasculares têm sido descritas em leitos vasculares protegidos da elevação tensional (Plunkett, Overbeck, 1985; Liu, Bishop, Overbeck, 1988) e em fases pré-hipertensivas (Lee, 1985). A reversão das alterações morfológicas vasculares é bastante morosa quando comparada com o controlo tensional (revisto por Christensen, Mulvany, 2001) e, quando o tratamento da hipertensão não inclui fármacos que visam a reversão das alterações morfológicas vasculares associadas, estas podem progredir com o tempo apesar de controlo eficaz da elevação tensional (Lund-Johansen, Omvik, 1991). A hipertensão induzida pelo DPSPX caracteriza-se por uma elevação tensional progressiva e moderada, e por alterações morfológicas cardiovasculares precoces e exuberantes (Albino-Teixeira *et al.*, 1991; Matias *et al.*, 1991). Este contraste no perfil evolutivo e na magnitude da hipertensão e das alterações morfológicas vasculares, aliado ao facto de ser possível prevenir a hipertensão sem prevenir o aparecimento das alterações morfológicas induzidas pelo DPSPX (Morato *et al.*, 2003), reforça a independência dos dois processos.

Os fármacos antihipertensores que interferem directamente

com a acção do sistema renina-angiotensina, ao contrário do que acontece com o antagonista dos adrenoceptores β_1 , atenolol, são eficazes no controlo das alterações morfológicas vasculares associadas à hipertensão (Schiffrin, Deng, 1995; Schiffrin *et al.*, 2000). Este perfil é também observado na hipertensão induzida pelo DPSPX. O losartan ou o captopril previnem a hipertensão e as alterações morfológicas induzidas pelo DPSPX, enquanto que o atenolol previne a hipertensão induzida pelo DPSPX mas não as alterações morfológicas associadas (Sousa, Morato, Albino-Teixeira, 2002; Morato *et al.*, 2003). O sistema renina-angiotensina parece, assim, fortemente implicado no desenvolvimento das alterações morfológicas vasculares. A acção trófica da angiotensina II sobre as células musculares lisas vasculares pode ser observada *in vivo* (Simon, Illyes, Csiky, 1998; Wang, Prewitt, 1990) e *in vitro* (Geisterfer, Peach, Owens, 1988; Lyall *et al.*, 1988). Os mecanismos de transdução pelos quais a angiotensina II exerce o seu efeito trófico incluem o aumento do cálcio intracelular (Brock *et al.*, 1985), da actividade da fosfolipase C (Griendling *et al.*, 1986), da cínase C de proteínas e do proto-oncogene *c-fos* (Taubman *et al.*, 1989), do trocador Na^+/H^+ (Berk *et al.*, 1987) e do co-transportador $\text{Na}/\text{K}/2\text{Cl}$ (Tseng, Berk, 1992). A produção de radicais livres de oxigénio pode também estar envolvida na resposta hipertrófica à angiotensina II (Taniyama, Griendling, 2003). O efeito trófico da angiotensina II é particularmente

interessante no contexto da dissociação entre pressão arterial e alterações estruturais vasculares por ser independente do efeito pressor. A desnervação neonatal (Simon, Csiky, 1998) ou a administração de vasodilatadores como a hidralazina (Griffin *et al.*, 1991) previnem a elevação tensional mas não as alterações morfológicas vasculares induzidas pela angiotensina II. A angiotensina II em doses subpressoras aumenta a actividade da ATPase Na^+/K^+ arterial (um requisito para o crescimento celular; Simon, 1992) e aumenta a síntese de proteínas e glicosaminoglicanos do músculo liso arterial e venoso (Simon, Altman, 1992). Dado que a angiotensina II é também um potente agente pressor, pode ser o mediador comum à elevação tensional e às alterações morfológicas vasculares associadas à hipertensão. Os resultados obtidos neste trabalho (Morato *et al.*, 2003) reforçam esta hipótese e evidenciam o papel do sistema renina-angiotensina neste modelo experimental de hipertensão.

O tratamento com losartan durante 7 ou 28 dias preveniu a elevação tensional e as alterações morfológicas hipertróficas e hiperplásicas induzidas pelo DPSPX. A angiotensina II é um potente agente pressor e modulador do fenótipo das células musculares lisas vasculares, induzindo hiperplasia (Lyall *et al.*, 1988) e/ou hipertrofia (Geisterfer, Peach, Owens, 1988), promovendo o aumento da síntese de proteínas da matriz extracelular (Scott-Burden *et al.*, 1990) e de colagéneo (Benetos *et al.*, 1997). A acção do losartan sobre a pressão arterial e sobre

as alterações morfológicas induzidas pelo DPSPX é explicável pelo antagonismo das acções pressora e trófica da angiotensina II mediadas pelo receptor AT_1 . O antagonismo do receptor AT_1 com losartan pode favorecer a estimulação do receptor AT_2 não antagonizado. O efeito trófico da activação do receptor AT_2 é um assunto controverso. A angiotensina II endógena (Ozono *et al.*, 1997) e exógena (Cao *et al.*, 1999; Bonnet *et al.*, 2001) induz *upregulation* do receptor AT_2 através da activação do receptor AT_1 (Bonnet *et al.*, 2001), uma vez que esta *upregulation* não se observa quando a administração de angiotensina II é acompanhada do antagonismo do receptor AT_1 (Bonnet *et al.*, 2001). O bloqueio crónico quer do receptor AT_2 (Levy *et al.*, 1996; Otsuka *et al.*, 1998) quer dos receptores AT_1 e AT_2 (Cao *et al.*, 1999) reduz a hipertrofia vascular, sugerindo que o receptor AT_2 pode estar envolvido no efeito hipertrófico da angiotensina II *in vivo*. No entanto, o receptor AT_2 parece contrariar, ou pelo menos modular, o efeito trófico mediado pelo receptor AT_1 . Ratinhos *knockout* para o receptor AT_2 são hipertensos e apresentam hipertrofia das células musculares lisas (Brede *et al.*, 2001). A estimulação do receptor AT_2 inibe o crescimento do músculo liso vascular (Tea *et al.*, 2000) e activa o sistema bradicinina/óxido nítrico induzindo vasodilatação (Siragy, de Gasparo, Carey, 2000). A inibição do efeito trófico da angiotensina II e a vasodilatação têm sido apontadas como possíveis mecanismos pelos quais os inibidores da enzima de

conversão da angiotensina revertem as alterações morfológicas vasculares (revisto por Christensen, Mulvany, 2001). Estes mecanismos podem também explicar o efeito protector do losartan sobre as alterações morfológicas vasculares induzidas pelo DPSPX e o facto de se observar uma diminuição do diâmetro das células musculares lisas após 28 dias de tratamento com losartan.

Os resultados obtidos com o atenolol foram diferentes dos obtidos com o losartan. O tratamento com atenolol durante 7 ou 28 dias, apesar de prevenir a elevação tensional, não preveniu as alterações morfológicas induzidas pelo DPSPX; a hipertrofia das células musculares lisas foi atenuada mas não prevenida, e a hiperplasia continuou a observar-se. Surpreendentemente, 28 dias de tratamento com atenolol induziram um aumento do diâmetro das células musculares lisas da artéria da cauda de ratos controlo. O atenolol pode reduzir a actividade adrenérgica, o débito cardíaco e a libertação de renina das células justaglomerulares renais (revisto por Man in't Veld, Schalekamp, 1983a). A acção anti-hipertensora do atenolol está relacionada com o controlo do tónus muscular, causando vasodilatação em vasos de resistência (Man in't Veld, Schalekamp, 1983b), melhorando o relaxamento arterial e normalizando a função endotelial (Kahonen *et al.*, 1994). O atenolol previne a elevação tensional e, conseqüentemente, pode prevenir as alterações morfológicas associadas. No entanto, o atenolol pode também

induzir hipertrofia das células musculares lisas arteriais. A hipertrofia de cardiomiócitos é mediada por adrenoceptores β_2 (Zhou, Schluter, Piper, 1996). A estimulação dos adrenoceptores β_1 atenua a resposta hipertrófica mediada pelos adrenoceptores α_1 (Schafer *et al.*, 2001). O antagonismo dos adrenoceptores β_1 com atenolol durante 28 dias (mas não 7) poderá ser suficiente para causar *upregulation* de outros adrenoceptores resultando na hipertrofia observada nos ratos controlo. No entanto, dado que quer o DPSPX quer o atenolol induzem hipertrofia das células musculares lisas, o tratamento simultâneo com DPSPX e atenolol deveria resultar em hipertrofia, pelo menos de igual magnitude à observada isoladamente para cada um dos factores. Contudo, o efeito do atenolol sobre as alterações morfológicas induzidas pelo DPSPX resulta do balanço entre o efeito anti-hipertensor e a inibição da libertação de renina, que pode reduzir os níveis de angiotensina II, por um lado, e a tendência intrínseca do atenolol para causar hipertrofia das células musculares lisas, por outro. Apesar de o antagonismo β_1 com o atenolol inibir a libertação de renina (revisto por Man in't Veld, Schalekamp, 1983a) esta acção parece não ter relevância sistémica dado que durante o tratamento com atenolol não se verifica correlação entre diminuição da pressão arterial e redução da actividade da renina plasmática (Nilsson *et al.*, 1979). Além disso, o atenolol não antagoniza adrenoceptores β_2 cuja activação pode induzir a

libertação local de angiotensina II (Nakamaru, Jackson, Inagami, 1986). A acção trófica da angiotensina II não parece, portanto, ser influenciada pelo tratamento com atenolol.

Ao discutir as alterações morfológicas induzidas pelo DPSPX não é possível ignorar a acção da adenosina como modulador do fenótipo celular. A adenosina participa na acção trófica do sistema nervoso simpático (Albino-Teixeira *et al.*, 1990a, 1990b), nomeadamente por acção sobre as células musculares lisas (Albino-Teixeira *et al.*, 1990a), as células miocárdicas (Albino-Teixeira *et al.*, 1990a) e os fibroblastos (Albino-Teixeira *et al.*, 1990b). O conhecimento do efeito trófico da adenosina resultou da observação de que a adenosina exógena e a 5'-N-etil-carboxamidoadenosina, seu análogo estável, previnem as alterações morfológicas induzidas pela desnervação simpática (Albino-Teixeira *et al.*, 1990a), o que não acontece com a inosina, seu metabolito inactivo (Albino-Teixeira *et al.*, 1990a) nem com a noradrenalina (Branco *et al.*, 1984; Albino-Teixeira *et al.*, 1990a). Além disso, o antagonismo dos receptores da adenosina *in vivo*, com DPSPX, induz alterações morfológicas semelhantes às observadas para a desnervação simpática, em tecidos vasculares e não-vasculares (Albino-Teixeira *et al.*, 1991). Em 1985, Jonzon e colaboradores (Jonzon, Nilsson, Fredholm, 1985) tinham já sugerido um efeito antiproliferativo para a adenosina, por acção em receptores A₁ e A₂ de células musculares lisas. Estudos posteriores confirmaram

a inibição do crescimento de células musculares lisas vasculares (Dubey *et al.*, 1996a, b) e de fibroblastos cardíacos (Dubey *et al.*, 1997), assim como a inibição da síntese proteica e colagénica (Dubey, Gillespie, Jackson, 1999; Dubey, Gillespie, Jackson, 1998). Estas acções da adenosina foram já confirmadas em células musculares lisas humanas (Dubey *et al.*, 1998). Outras acções da adenosina que podem influenciar o seu efeito trófico incluem a inibição da agregação plaquetar (revisto por Haslam *et al.*, 1978) e a protecção contra lesão endotelial causada por neutrófilos (Cronstein *et al.*, 1986). A adenosina pode também inibir a produção de angiotensina II (Taddei *et al.*, 1992). As alterações morfológicas marcadas induzidas pelo bloqueio dos receptores da adenosina pelo DPSPX devem reflectir, paralelamente à potenciação da acção proliferativa e hipertrófica da angiotensina II, o antagonismo da acção antiproliferativa e antihipertrófica da adenosina.

Neste estudo foi testada apenas uma dose de cada anti-hipertensor, o que pode ter influenciado os resultados obtidos. A dose de atenolol pode ter sido insuficiente e a de losartan supramáxima. Não é possível saber, pelo estudo realizado, se uma dose superior de atenolol seria capaz de prevenir as alterações morfológicas induzidas pelo DPSPX ou se uma dose inferior de losartan não as preveniria. No entanto, o objectivo do presente estudo morfológico era avaliar se a hipertensão e as alterações morfológicas induzidas pelo DPSPX seriam processos

dissociáveis. Por essa razão, as doses dos antihipertensores foram escolhidas por serem equipotentes no controlo da pressão arterial. E, de facto, com essas doses, ambos os anti-hipertensores preveniram a hipertensão induzida pelo DPSPX. Contudo, tiveram diferentes efeitos nas alterações morfológicas hipertróficas e hiperplásicas: estas foram prevenidas pelo losartan mas não pelo atenolol. É possível que o losartan e o atenolol tenham diferentes curvas dose-resposta para o efeito antihipertensor e para o efeito sobre a morfologia vascular, o que reforça ainda mais a independência entre os dois factores.

De acordo com a teoria de Folkow (revisto por Folkow, 1990), a hipertensão é despoletada pela hiperreactividade simpática que, amplificada pela hipertrofia vascular, leva ao aumento progressivo da pressão arterial. A hipertensão pode ser iniciada por um estímulo subpressor, neuronal ou humoral, possivelmente não detectável experimentalmente, cujo efeito é amplificado por outro mecanismo pressor mais lento (Lever, 1986), como a alteração da relação pressão-natriurese renal (revisto por Hall, 1986) ou a hipertrofia vascular (revisto por Folkow, 1990). As alterações morfológicas nos vasos preglomerulares de resistência têm também sido propostas como iniciadoras do processo hipertensivo (revisto por Anderson *et al.*, 2000). É possível que as alterações morfológicas observadas na artéria renal de ratos tratados com DPSPX (Albino-Teixeira *et al.*, 1991; Matias *et al.*, 1991) contribuam

para a hipertensão.

A identidade do estímulo inicial responsável pelo processo hipertensivo permanece por esclarecer. No entanto, alguns factos sugerem que possa ser a angiotensina II. O efeito trófico da angiotensina II é independente da pressão arterial (Griffin *et al.*, 1991) mas dependente da dose e do tempo (Simon, Illyes, Csiky, 1998). A exposição a uma dose menor de angiotensina II pode originar o mesmo aumento da razão parede/lúmen que uma dose maior desde que o período de exposição a essa dose menor seja aumentado (Simon, Illyes, Csiky, 1998). Não está esclarecido se a dependência do tempo está relacionada com o efeito cumulativo sobre a pressão arterial ou sobre o efeito trófico. No entanto, a possibilidade de a exposição prolongada a doses subpressoras de angiotensina II poder causar alterações morfológicas vasculares e hipertensão favorece a teoria de Lever (Lever, 1986). Na hipertensão induzida pelo DPSPX verifica-se activação do sistema renina-angiotensina, constatada pelos níveis elevados de actividade plasmática da renina (Sousa, Morato, Albino-Teixeira, 2002) e das concentrações de angiotensina II (Morato *et al.*, 2002). A dissociação entre pressão arterial e alterações morfológicas é também evidente na hipertensão induzida pelo DPSPX, dado o contraste entre a moderada elevação tensional (Albino-Teixeira *et al.*, 1991) e as marcadas alterações morfológicas observadas a nível do sistema cardiovascular (Albino-Teixeira *et al.*, 1991; Matias *et al.*, 1991).

Os resultados obtidos neste trabalho corroboram a hipótese de pressão arterial e alterações morfológicas vasculares serem processos independentes e suportam ainda a hipótese de a angiotensina II ser o mediador comum aos dois processos.

Uma vez que o estímulo desencadeador da hipertensão (possivelmente a angiotensina II) pode ser indetectável experimentalmente, pelo menos numa fase inicial, as alterações morfológicas vasculares representam o primeiro sinal de lesão dos órgãos-alvo associado à hipertensão (revisto por Bataineh, Raij, 1998; Park, Schiffrin, 2000). Observa-se uma boa correlação entre a extensão com que a terapêutica anti-hipertensora reverte as alterações morfológicas vasculares e a rapidez com que a hipertensão se reinstala após o término da terapêutica, ao contrário do que se observa com a redução da pressão arterial (revisto por Christensen, Mulvany, 2001). Este aspecto é clinicamente importante, devendo as alterações morfológicas vasculares constituir um alvo da terapêutica anti-hipertensora tão importante como o controlo da própria pressão arterial, no intuito de minimizar um importante factor de risco de morbidade e mortalidade associado à hipertensão.

Estudo da contractilidade vascular

Ao analisar os resultados do estudo da contractilidade

vascular em ratos hipertensos por infusão de DPSPX, a activação do sistema renina-angiotensina volta a ser um ponto fundamental de discussão.

A magnitude da resposta contráctil à angiotensina II foi muito maior na veia do que na artéria mesentérica de ratos controlo (Morato *et al.*, 2003), contrariamente ao observado com a noradrenalina (Morato *et al.*, 2003), e confirmando resultados de outros autores, alguns dos quais descrevem mesmo a angiotensina II como um peptídeo venoconstrictor (Warner, 1990; Konishi *et al.*, 1997). A resposta contráctil ao cloreto de potássio foi também maior na veia do que na artéria mesentérica, embora a diferença não tenha sido tão marcada como para a angiotensina II (Morato *et al.*, 2003). A razão pela qual se verifica uma diferença tão marcada na reactividade da veia mesentérica à angiotensina II em relação à artéria não é conhecida. A maior parte dos componentes do sistema renina-angiotensina existe a nível tecidual, indicando a existência de um sistema renina-angiotensina local (revisito por Danser, 1996). A potência da angiotensina II é semelhante à da angiotensina I (Saris *et al.*, 2000). Além disso, quando se administra angiotensina I na presença de um inibidor da enzima de conversão da angiotensina, a produção de angiotensina II é semelhante à observada após administração isolada de uma dose de angiotensina I 50 vezes menor (Saris *et al.*, 2000). Estes factos realçam a importância da produção *in situ* de

angiotensina II. O teor de angiotensina II plasmático não difere entre o território arterial e o território venoso (Reams *et al.*, 1989). Assim sendo, a marcada diferença na reactividade pode estar relacionada com diferenças entre o território arterial e o venoso no que respeita a actividade do sistema renina-angiotensina local, o receptor da angiotensina II responsável pela resposta contráctil e/ou o respectivo mecanismo de transdução. As células endoteliais expressam receptores para a angiotensina II (Patel, Sekharam, Block, 1991) e a presença de endotélio compromete as contracções induzidas pela angiotensina II (Bullock, Taylor, Weston, 1986). Por outro lado, a angiotensina II aumenta os níveis de AMPc induzidos por vasodilatadores como a isoprenalina, a prostaglandina I₂ ou a adenosina (Kubalak, Webb, 1993) podendo potenciar a vasodilatação induzida por agentes que elevam o AMPc (Brizzolara-Gourdie, Webb, 1997). É possível que a modulação da contracção à angiotensina II pelo endotélio e/ou a vasodilatação induzida por agentes cuja acção é aumentada pela angiotensina II seja diferente entre o território arterial e venoso, condicionando a magnitude da resposta contráctil à angiotensina II.

A contracção máxima determinada pela angiotensina II na artéria e na veia mesentéricas dos ratos hipertensos por infusão de DPSPX é bastante menor do que nos ratos controlo, enquanto que a contracção máxima à noradrenalina é maior nos

ratos hipertensos por infusão de DPSPX do que nos ratos controlo (sobretudo na veia mesentérica) (Morato *et al.*, 2003). A diminuição da resposta contráctil à angiotensina II e o aumento da resposta contráctil à noradrenalina são explicáveis com os níveis elevados de angiotensina II plasmática que se encontram nos ratos hipertensos por infusão de DPSPX (Morato *et al.*, 2003). A exposição repetida ou prolongada a um agonista geralmente resulta em dessensibilização ou *downregulation* dos respectivos receptores, o que faz com que a resposta ao agonista seja menor. Sabe-se que a exposição repetida à angiotensina II causa uma dessensibilização rápida do seu receptor AT_{1A} (Peach, 1986). Na hipertensão renal 2K1C, o receptor AT_{1A} sofre *downregulation* bilateral renal (Haefliger *et al.*, 1995) e a expressão do receptor AT_{1A} está correlacionada inversamente com a actividade da renina plasmática (Haefliger *et al.*, 1995), o que leva a pensar que a angiotensina II circulante possa desempenhar um papel importante. Na hipertensão induzida pelo DPSPX, o aumento de mais de duas vezes do teor de angiotensina II plasmática pode ter dessensibilizado os receptores AT_1 da angiotensina II no território vascular mesentérico, dando origem a menores respostas contrácteis nos ratos hipertensos por infusão de DPSPX. Uma outra explicação poderia ser a de que o teor elevado de angiotensina II plasmática induziria *in vivo* um grau de contracção vascular mesentérico maior, de tal forma que a

exposição à angiotensina II exógena resultaria numa contracção menor por o tecido não ter capacidade de contrair mais. No entanto, os resultados com o cloreto de potássio, cuja contracção é independente da acção sobre receptores, mostram que a hipertensão pelo DPSPX não altera a capacidade contráctil dos vasos mesentéricos (até a aumenta, na veia). Por outro lado, e uma vez que ao dia 3 da hipertensão induzida pelo DPSPX a resposta contráctil à angiotensina II na artéria mesentérica de Rato é praticamente nula, poder-se-ia questionar a acção directa do DPSPX sobre a contracção induzida pela angiotensina II. Na artéria mesentérica perfundida *in situ*, o bloqueio agudo dos receptores da adenosina com DPSPX não alterou a capacidade contráctil do músculo liso vascular (Holycross, Jackson, 1989). Também no presente estudo, em experiências preliminares, o DPSPX *in vitro* não alterou a resposta contráctil à angiotensina II (resultados não apresentados). O DPSPX não parece, portanto, ter qualquer acção como antagonista da angiotensina II. Além da diferença na magnitude de resposta à angiotensina II, a artéria e a veia mesentérica diferem também na forma como a reactividade à angiotensina II é afectada pela hipertensão induzida pelo DPSPX. A resposta contráctil à angiotensina II é menor nos vasos mesentéricos de ratos hipertensos por infusão de DPSPX. No entanto, na artéria mesentérica, a redução da resposta contráctil à angiotensina II é muito marcada ao dia 3 da

hipertensão e não tanto ao dia 14 (Morato *et al.*, 2003), enquanto que na veia mesentérica, a resposta é semelhante entre o dia 3 e o dia 14 (Morato *et al.*, 2003). Na artéria mesentérica perfundida, a exposição à angiotensina II parece potenciar a resposta a uma exposição posterior, depois de superada a taquifilaxia (Collis, Alps, 1975). Neste estudo não foi realizado qualquer avaliação farmacológica e/ou molecular do receptor envolvido na resposta contráctil à angiotensina II e de eventuais alterações induzidas pelo tratamento com DPSPX. No entanto, diferenças no receptor envolvido, alterações na proporção dos receptores AT₁ e AT₂ e/ou no mecanismo de transdução poderão explicar esta diversidade de resposta (na artéria, mas não na veia, quase se verifica reversão da dessensibilização/*downregulation* do receptor da angiotensina II responsável pela resposta contráctil). A interacção entre a vasoconstrição induzida pela angiotensina II e a vasodilatação induzida pela adenosina poderia ter interesse no contexto dos presentes resultados, uma vez que a angiotensina II pode facilitar a vasodilatação induzida pela adenosina (Kubalak, Webb, 1993; Brizzolara-Gourdie, Webb, 1997). Ao dia 3 da hipertensão os receptores da adenosina estão bloqueados pelo DPSPX e, conseqüentemente, a adenosina não exerce o seu efeito vasodilatador. Se fosse esta a explicação, a resposta contráctil à angiotensina II estaria aumentada e não diminuída, como se observa. Ao dia 14 não existe antagonismo dos receptores

da adenosina pelo DPSPX. A angiotensina II plasmática (cujos níveis estão aumentados mais de duas vezes) poderia aumentar os níveis de AMPc, facilitando a vasodilatação induzida pela adenosina (Kubalak, Webb, 1993; Brizzolara-Gourdie, Webb, 1997), contrariando a resposta contráctil à angiotensina II, diminuindo-a. No entanto, o facto de o perfil de resposta à angiotensina II durante a hipertensão induzida pelo DPSPX não ser o mesmo entre artéria e veia mesentéricas não favorece esta interpretação dos resultados.

Os níveis elevados de angiotensina II plasmática associados à hipertensão induzida pelo DPSPX (Morato *et al.*, 2003) podem também explicar o aumento da resposta contráctil à noradrenalina. A angiotensina II em doses subconstritoras aumenta a resposta à noradrenalina *in vivo* e *in vitro*. *In vivo*, a angiotensina II aumenta o tónus induzido pela fenilefrina no leito mesentérico de Rato (Qiu, Henrion, Levy, 1994; Dowell *et al.*, 1996) e potencia a vasoconstrição das coronárias induzida pela estimulação eléctrica dos terminais nervosos simpáticos (Saino *et al.*, 1997). *In vitro*, a angiotensina II aumenta a resposta contráctil à noradrenalina (Day, Moore, 1976; Henrion *et al.*, 1992). Um aspecto importante da modulação das contracções à noradrenalina diz respeito a alterações na regulação endotelial, nomeadamente da exercida pelo monóxido de azoto que contraria a vasoconstrição induzida pela noradrenalina na hipertensão (Hayakawa, Raji, 1997; Nishida *et al.*, 1998). A

noradrenalina pode actuar nas células endoteliais e aumentar a libertação de monóxido de azoto, atenuando o seu próprio efeito contráctil no músculo liso (Arribas *et al.*, 1994; Bockman, Gonzalez-Cabrera, Abel, 1996). O sistema renina-angiotensina pode também estar envolvido nesta modulação, estando implicado na disfunção endotelial (Hoshino *et al.*, 1994). Nos ratos hipertensos por infusão de DPSPX, o relaxamento dependente do endotélio pelo carbacol encontra-se comprometido na artéria da cauda, o que não acontece com o relaxamento independente do endotélio (Paiva *et al.*, 1997). Os níveis elevados de angiotensina II podem comprometer a função endotelial e, conseqüentemente, a modulação (negativa) da contracção adrenérgica, levando a maiores respostas contrácteis à noradrenalina (Morato *et al.*, 2003). Curiosamente, na artéria da cauda de ratos hipertensos por infusão de DPSPX não se verificam diferenças na resposta ao UK14.304, um agonista dos adrenoceptores α_2 (Guimarães *et al.*, 1994). As alterações na modulação das contracções à noradrenalina podem envolver, além do monóxido de azoto endotelial (Hayakawa, Raji, 1997; Nishida *et al.*, 1998), outros factores endoteliais como o anião superóxido (Tschudi *et al.*, 1996), que inactiva o monóxido de azoto, e/ou vasoconstrictores como a endotelina e produtos da ciclooxigenase, nomeadamente o tromboxano A_2 (Hayakawa, Raji, 1997).

A resposta contráctil ao cloreto de potássio não está

alterada na artéria mesentérica de ratos hipertensos por infusão de DPSPX (Morato *et al.*, 2003). No entanto, na veia mesentérica verifica-se uma resposta muito maior ao dia 3 da hipertensão e um aumento mais moderado ao dia 14 (Morato *et al.*, 2003). Uma vez que a contracção induzida pelo cloreto de potássio é causada por despolarização da membrana celular, estes resultados favorecem a interpretação de que a eficácia dos mecanismos de excitação-contracção ou a maquinaria contráctil não são alteradas pela hipertensão induzida pelo DPSPX na artéria mesentérica mas que de alguma forma, difícil de explicar, se encontram aumentadas na veia mesentérica. Uma vez que na veia mesentérica o aumento da contracção ao cloreto de potássio é sobretudo marcado ao dia 3, a primeira explicação seria a de um efeito potenciador directo do DPSPX presente na circulação sanguínea. No entanto, experiências preliminares realizadas com o DPSPX *in vitro* negam esta hipótese. Por outro lado, revelam que o aumento observado parece ser regional uma vez que não se verifica na veia femoral (resultados não apresentados). A hipertrofia marcada das células musculares lisas vasculares observada nos ratos hipertensos por infusão de DPSPX (Albino-Teixeira *et al.*, 1991; Morato *et al.*, 2003) poderia também justificar a maior resposta contráctil ao cloreto de potássio. No entanto, as alterações morfológicas são marcadas ao dia 7 e progridem com o tempo de hipertensão, ao contrário do que se passa com a resposta contráctil ao potássio.

De acordo com a teoria de Folkow (Folkow, 1956), as alterações morfológicas vasculares podem contribuir para a hiperreactividade observada na hipertensão, uma vez que a contracção de um vaso com maior parede e menor lúmen dará origem a maior resistência vascular, ainda que para o mesmo grau de encurtamento do músculo liso. De facto, a maior razão média/lúmen amplifica a resposta vasoconstritora (Folkow *et al.*, 1970a) e a hiperreactividade vascular desaparece quando se normaliza em relação à massa muscular (Aalkjaer *et al.*, 1987). Na hipertensão induzida pelo DPSPX, as alterações morfológicas vasculares são exuberantes (Albino-Teixeira *et al.*, 1991; Morato *et al.*, 2003) e poderiam justificar a hiperreactividade observada. Os resultados do estudo da contractilidade vascular foram normalizados em relação à massa dos anéis vasculares (expressa em mN/mg) e, mesmo assim, continuou a verificar-se hiperreactividade à noradrenalina na artéria e na veia mesentéricas, e ao cloreto de potássio na veia mesentérica, sugerindo que as alterações morfológicas vasculares não sejam o único factor a contribuir para a hiperreactividade observada. Por outro lado, se as alterações morfológicas vasculares fossem o único factor determinante da alterada reactividade deveria observar-se também hiperreactividade para a angiotensina II. A pressão arterial pode também condicionar a reactividade dos vasos sanguíneos na hipertensão. A elevação tensional induzida pelo DPSPX é moderada (Albino-Teixeira *et al.*, 1991; Morato *et*

al., 2002, 2003), quando comparada com outros modelos experimentais de hipertensão e em relação às alterações morfológicas vasculares. Não se pode ignorar a possível contribuição da elevada pressão arterial para as alterações na reactividade vascular dos ratos hipertensos por infusão de DPSPX, sobretudo pela longa duração, mas, mais uma vez seria de esperar que a contribuição se reflectisse de igual forma nos três contracturantes testados.

O perfil de respostas contrácteis à angiotensina II nos ratos hipertensos por infusão de DPSPX contrasta com o perfil obtido com a noradrenalina ou com o cloreto de potássio; apenas à angiotensina II se observam menores respostas contrácteis. Os resultados deste estudo contrastam também com os da maioria dos estudos noutros modelos experimentais de hipertensão, em que, à semelhança do observado para outros contracturantes, se verifica hiperreactividade vascular (Kost *et al.*, 1994; Touyz *et al.*, 1999). Os níveis elevados de angiotensina II surgem, portanto, como a explicação mais plausível para a menor reactividade vascular à angiotensina II na hipertensão induzida pelo DPSPX, ainda que outros factores como a pressão arterial e as alterações morfológicas vasculares possam também contribuir em menor escala. Na hipertensão renal 2K1C (Ljung, Jandhyala, Kjellstedt, 1981) e durante restrição de sódio (Thurston, Laragh, 1975), igualmente modelos de activação do sistema renina-angiotensina, também se verificam menores

respostas vasculares à angiotensina II, favorecendo a presente interpretação.

Há mais de sete décadas que a adenosina é conhecida como um potente vasodilatador (Drury, Szent-Györgyi, 1929) e, como tal, o antagonismo dos receptores da adenosina com DPSPX poderá contribuir para as alterações da reactividade vascular observadas. Esta acção vasodilatadora é provavelmente mediada pelo receptor A_{2A} (Hein, Belardinelli, Kuo, 1999) presente nas células musculares lisas e nas células endoteliais (Balcells, Suarez, Rubio, 1992). A vasodilatação induzida pela adenosina pode, portanto, resultar da acção directa sobre o músculo liso (Herlihy *et al.*, 1976) ou ser mediada pelo endotélio (Headrick, Berne, 1990). Este assunto permanece controverso, talvez porque o papel do endotélio no efeito vasodilatador da adenosina não é facilmente evidenciável uma vez que, ao contrário de outros vasodilatadores dependentes do endotélio, como a acetilcolina que contrai o músculo liso na ausência de endotélio, a adenosina dilata os vasos com e sem endotélio. A adenosina é considerada por alguns autores como um agente vasodilatador independente do endotélio (Quyyumi *et al.*, 1995; Costa, Biaggioni, 1998). Outros autores contestam esta afirmação. Alguns estudos mostram menores respostas à adenosina em preparações sem endotélio (Yen, Wu, Chiou, 1988; Martin, Potts, 1994). A adenosina, administrada intra-arterialmente, fica retida nas células endoteliais, quase não

alcançando o músculo liso vascular subjacente (Nees *et al.*, 1985). Recentemente, foi proposta a interpretação de que as células endoteliais possam actuar como uma barreira à adenosina intravascular (Gamboa *et al.*, 2003). No entanto, mesmo ligada a macromoléculas que dificultam a sua passagem pelo endotélio, a adenosina ainda é capaz de produzir vasodilatação (Olsson, Davis, Khouri, 1977). Na hipertensão induzida pelo DPSPX verifica-se disfunção endotelial (Paiva *et al.*, 1997). Contudo, não se sabe se a barreira endotelial para a adenosina é preservada ou está ausente nestas situações. Mesmo considerando a dependência do endotélio, não existe consenso quanto aos factores endoteliais envolvidos. Há evidência do envolvimento do monóxido de azoto endotelial (Martin, Potts, 1994) e da elevação dos níveis intracelulares de AMPc (Silver, Walus, DiSalvo, 1984) na dilatação das coronárias pela adenosina. Também há evidência contra o envolvimento do monóxido de azoto endotelial (Costa, Biaggioni, 1998) e do AMPc (Herlihy *et al.*, 1976). É possível que concentrações baixas de adenosina induzam vasodilatação dependente do endotélio, mas que concentrações elevadas mascarem a dependência do endotélio (Hein, Kuo, 1999). Além disso, é possível que para concentrações elevadas o receptor A_{2B} também esteja envolvido e que tal possa contribuir para as diferenças observadas nos diversos estudos (Hein, Bellardinelli, Kuo, 1999).

A hipertensão induzida por infusão de DPSPX está, portanto,

associada a alterações da reactividade vascular mesentérica, as quais são consistentes com um modelo experimental de hipertensão caracterizado por activação do sistema renina-angiotensina.

Estudo da modulação da neurotransmissão simpática pela angiotensina II

O sistema nervoso simpático é importante para o desenvolvimento da hipertensão induzida pelo DPSPX, uma vez que a desnervação simpática com 6-hidroxidopamina retarda a instalação e diminui a magnitude da elevação tensional (Sousa, Morato, Albino-Teixeira, 2002), à semelhança do que se observa nos ratos SHR (Lee *et al.*, 1987) e na hipertensão renal 2K1C (Nakada *et al.*, 1996).

Os resultados do estudo da modulação da neurotransmissão simpática pela angiotensina II na artéria e na veia mesentérica de ratos hipertensos por infusão de DPSPX contrastam com os resultados do estudo da contractilidade vascular. A angiotensina II facilita a neurotransmissão simpática (Zimmerman, Gomer, Liao, 1972). O efeito facilitatório da angiotensina II foi semelhante entre a artéria e a veia mesentérica de ratos controlo. Esta semelhança contrasta

obviamente com a maior reactividade contráctil de cerca de oito vezes da veia mesentérica quando comparada com a artéria mesentérica. Por outro lado, nos ratos hipertensos por infusão de DPSPX verificou-se um aumento do efeito facilitatório da angiotensina II na artéria mesentérica ao 14^o (mas não ao 3^o) dia de hipertensão, enquanto que na veia mesentérica não se verificou qualquer alteração no efeito facilitatório da angiotensina II sobre a neurotransmissão simpática. Mais uma vez, este perfil de resposta contrasta com a diminuição generalizada do efeito contráctil induzido pela angiotensina II na artéria e na veia mesentérica.

Estudos farmacológicos sugerem que o receptor responsável pelo efeito contráctil da angiotensina II é diferente do receptor responsável pelo efeito facilitador da neurotransmissão simpática. O losartan não alterou o efeito facilitatório da angiotensina II *in vivo* em ratos descerebrados (Ohlstein *et al.*, 1997) nem *in vitro* no ventrículo esquerdo (Moura *et al.*, 1999; Guimarães *et al.*, 2001) ou nas artérias pulmonar e mesentérica (Guimarães, Paiva, Moura, 1998; Guimarães *et al.*, 2001). Alguns artigos descrevem antagonismo do efeito facilitatório da angiotensina II pelo losartan mas referem-no como sendo muito menos potente a antagonizar a resposta pré- do que a posjuncional da angiotensina II, nomeadamente em relação à saralazina (Guimarães, Paiva, Moura, 1998), um antagonista não selectivo dos receptores da

angiotensina II, ou ao eprosartan (Guimarães *et al.*, 2001), outro antagonista do receptor AT₁ da angiotensina II. Estes factos sugerem que o receptor prejunctional para a angiotensina II seja diferente do receptor AT₁ clássico e do receptor posjunctional. A simples observação de que os efeitos pré- e posjunctionais da angiotensina II ocorrem para concentrações bastante diferentes sugere já alguma diferença ao nível do receptor envolvido; nos estudos posjunctionais a curva concentração-resposta atinge concentrações bastante superiores às necessárias para atingir o efeito facilitatório máximo. A ordem de potência de vários antagonistas do receptor AT₁ da angiotensina II difere entre o efeito facilitatório da neurotransmissão simpática e o efeito contráctil directo da angiotensina II *in vivo* em ratos descerebrados (Balt *et al.*, 2001) e *in vitro* na artéria mesentérica de Coelho (Balt *et al.*, 2002) e na artéria da cauda de Rato (Pinheiro *et al.*, 2002). No Rato, existem dois subtipos do receptor AT₁: AT_{1A} e AT_{1B} (Iwai, Inagami, 1992). Na artéria da cauda de Rato (Cox *et al.*, 1995; Cox, Story, Ziogas, 1996) e na artéria mesentérica de Coelho (Balt *et al.*, 2003) o efeito facilitatório da angiotensina II é atenuado pelo composto PD123319 (um antagonista do receptor AT₂ da angiotensina II) em concentrações que antagonizam o receptor AT_{1B} (1 µM e 10 µM), mas tal não se verifica para o efeito posjunctional da angiotensina II. No presente trabalho não foi feita a caracterização farmacológica do receptor da angiotensina II

envolvido em qualquer dos dois efeitos. No entanto, o facto de no estudo da modulação da neurotransmissão simpática pela angiotensina II não se verificar a marcada diferença na reactividade entre artéria e veia mesentérica ou a diminuição da resposta à angiotensina II nos ratos hipertensos por infusão de DPSPX sustenta, ainda que indirectamente, a hipótese de os efeitos pré- e posjuncional da angiotensina II serem mediados por receptores diferentes. Se o receptor fosse o mesmo, seria de esperar que, dados os níveis elevados de angiotensina II plasmática, o receptor prejuncional sofresse dessensibilização e originasse menor efeito facilitatório nos ratos hipertensos por infusão de DPSPX, à semelhança do que se observa para a resposta contráctil. Enquanto que a dessensibilização do receptor que medeia o efeito contráctil da angiotensina II está já bem estabelecida (Peach, 1986), a dessensibilização do receptor que medeia o efeito facilitatório prejuncional foi apenas sugerida na aorta de Coelho (Storgaard, Nedergaard, 1997) e na veia porta (Sybertz, Peach, 1980). Recentemente, Nap e colaboradores (Nap *et al.*, 2004) demonstraram que o receptor presente nos vasos e responsável pelo efeito contráctil induzido pela angiotensina II é do subtipo AT_{1A} e que o receptor neuronal responsável pela facilitação da neurotransmissão simpática pertence ao subtipo AT_{1B}. Este estudo é consistente com a rápida dessensibilização do receptor AT_{1A} quando repetidamente estimulado pela angiotensina II (Peach, 1986).

Os resultados obtidos no presente trabalho são compatíveis com a hipótese de o receptor vascular da angiotensina II ser do subtipo AT_{1A}, que rapidamente dessensibiliza, e de o receptor neuronal da angiotensina II ser diferente, eventualmente do subtipo AT_{1B}, dado que não sofre dessensibilização pela exposição a níveis elevados de angiotensina II.

O efeito facilitatório da angiotensina II está aumentado nos ratos SHR (Kawasaki, Cline, Su, 1982; Cline, 1985). Por outro lado, na fase inicial da hipertensão renal 2K1C, em que o sistema renina-angiotensina desempenha um papel fundamental (Davis, 1977), não há diferenças na neurotransmissão simpática nem no efeito facilitatório da angiotensina II (Eikenburg, Ekas, Lokhandwala, 1982). Na fase tardia da hipertensão renal 2K1C existe alguma controvérsia acerca da importância do sistema renina-angiotensina (Davis, 1977) e também sobre a modulação da neurotransmissão simpática pela angiotensina II. Na artéria mesentérica perfundida *in situ* (Zimmerman, Robertson, Jackson, 1987) observa-se aumento do efeito facilitatório da angiotensina II endógena, o qual pode contribuir para a manutenção da hipertensão. Mas, na artéria mesentérica perfundida isolada (Eikenburg, Ekas, Lokhandwala, 1982), a resposta prejuncional à angiotensina II exógena está diminuída, podendo representar um mecanismo de compensação à hipertensão, resultante de alterações no receptor ou a maior catabolismo da angiotensina II (Brunner *et al.*, 1972; Thurston,

Laragh, 1975), mas não a alterações na recaptação de noradrenalina à semelhança do observado nos ratos SHR (Eikenburg, Ekas, Lokhanwala, 1982). Estão descritas alterações na reactividade do receptor prejunctional da angiotensina II durante restrições no aporte de sódio, no sentido de se observar uma relação directa entre aporte de sódio e reactividade à angiotensina II (Sybertz, Peach, 1980; Eikenburg, Ekas, Lokhanwala, 1982) provavelmente devido a dessensibilização do receptor (Sybertz, Peach, 1980). Uma outra explicação para a menor resposta prejunctional à angiotensina II tem sido a libertação de prostaglandinas (Jackson, Campbell, 1981). A hipertensão induzida pelo DPSPX está associada a maior resposta prejunctional à angiotensina II na artéria mesentérica, à semelhança do observado nos ratos SHR (Kawasaki, Cline, Su, 1982; Cline, 1985) e na hipertensão renal 2K1C, na artéria mesentérica perfundida *in situ* (Zimmerman, Robertson, Jackson, 1987). Este aumento da libertação de noradrenalina dos terminais nervosos simpáticos pode contribuir para o aumento da resistência vascular periférica e, conseqüentemente, para a manutenção da hipertensão.

A acção facilitatória da angiotensina II sobre a libertação de noradrenalina mostrou uma tendência (não uma diferença estatisticamente significativa) para ser menor nos ratos hipertensos ao 3º dia, sobretudo na veia mesentérica. Como já foi discutido, não é provável que esta tendência se deva a

dessensibilização do receptor responsável pelo efeito facilitatório da angiotensina II. No entanto, aos 3 dias de hipertensão os receptores da adenosina estão antagonizados pelo DPSPX presente na circulação sanguínea. A nível vascular, a adenosina exógena modula a neurotransmissão simpática inibindo-a por acção no receptor A_1 (Wiklund, Cederqvist, Gustafsson, 1989) e facilitando-a através da activação do receptor A_{2A} (Wiklund, Cederqvist, Gustafsson, 1989; Gonçalves, Queiroz, 1996). Na artéria da cauda de Rato é possível observar quer o efeito inibitório quer o efeito facilitatório da adenosina exógena (Gonçalves, Queiroz, 1996; Fresco *et al.*, 2002). O DPSPX é um antagonista não selectivo dos receptores da adenosina sendo de esperar a supressão da modulação exercida pela adenosina sobre a neurotransmissão simpática no território mesentérico. Embora seja clara a modulação exercida pela adenosina exógena, tem sido difícil demonstrar o papel fisiológico da adenosina endógena sobre a neurotransmissão simpática. A adenosina endógena inibe a neurotransmissão simpática no tecido cardíaco (Richardt *et al.*, 1989). No entanto, no tecido vascular, a exposição aguda ao DPSPX não influenciou a resposta à estimulação nervosa no leito mesentérico perfundido *in situ* (Jackson, 1987) ou em condições experimentais que pretendiam estimular a produção endógena de adenosina, como a estimulação simpática sustentada associada a redução do fluxo sanguíneo mesentérico (Kuan,

Jackson, 1988) ou a hipotensão hemorrágica (Jackson, Herzer, Kuan, 1994). À semelhança do observado com a exposição aguda, o antagonismo dos receptores da adenosina com DPSPX durante 7 dias também não altera a neurotransmissão simpática na artéria mesentérica perfundida de Rato (Ralevic, Rubino, Burnstock, 1996) nem a modulação da neurotransmissão simpática por parte dos receptores da adenosina (Rubino, Burnstock, 1995; Ralevic, Rubino, Burnstock, 1996). Contudo, as respostas contrácteis induzidas por estimulação eléctrica em ratos tratados com DPSPX são menores no miocárdio auricular (Rubino, Burnstock, 1995) e maiores na artéria da cauda (Karoony, Rubino, Burnstock, 1995), quando comparadas com as respostas de ratos controlo, sugerindo que em alguns tecidos ou situações experimentais a adenosina endógena seja um importante modulador da neurotransmissão simpática. No presente estudo, a exposição aguda a uma dose de DPSPX que antagoniza os receptores da adenosina (Persson *et al.*, 1991) facilitou a libertação de noradrenalina com uma magnitude semelhante à dose maior de angiotensina II, sugerindo que nas condições experimentais presentes a adenosina endógena inibe a neurotransmissão simpática quer na artéria quer na veia mesentérica de Rato e contrariando os resultados de outros estudos (Jackson, 1987; Kuan, Jackson, 1988; Jackson, Herzer, Kuan, 1994; Karoony, Rubino, Burnstock, 1995). Diferenças na dose de DPSPX, na técnica utilizada (vaso isolado vs perfundido),

no parâmetro utilizado para avaliação da neurotransmissão simpática (pressão de perfusão, fluxo sanguíneo, tensão contráctil, libertação de $^3\text{H}\text{-NA}$) ou no território vascular (artéria mesentérica vs artéria da cauda) podem contribuir para a diversidade de resultados. Além disso, nas condições experimentais do presente estudo, a exposição aguda ao DPSPX não alterou o efeito facilitatório da angiotensina II (pelo menos à concentração de 10 nM), sugerindo que o menor efeito facilitatório da angiotensina II aos 3 dias de hipertensão não se deve ao antagonismo dos receptores da adenosina. Não é fácil, portanto, explicar a clara tendência para aos 3 dias de hipertensão se verificar menor efeito facilitatório à angiotensina II na artéria e na veia mesentérica. É razoável admitir que o antagonismo dos receptores da adenosina pelo DPSPX durante 3 dias possa influenciar o efeito facilitatório à angiotensina II de forma diferente de uma exposição aguda. Além disso, ao dia 3 da hipertensão, além do antagonismo dos receptores da adenosina pelo DPSPX também se observa aumento dos níveis plasmáticos de angiotensina II, o que acentua ainda mais a diferença entre as situações experimentais para que possam ser comparadas directamente. Na artéria mesentérica perfundida, a adenosina endógena não parece regular o efeito facilitatório da angiotensina II sobre a neurotransmissão simpática (Holycross, Jackson, 1989). Mais uma vez, neste estudo (Holycross, Jackson, 1989) a exposição ao DPSPX é aguda e não se verifica

simultaneamente elevação dos níveis de angiotensina II.

A existência de interações entre os diferentes receptores que modulam a libertação do neurotransmissor simpático pode também contribuir para as alterações na neurotransmissão simpática que se verificam na hipertensão experimental. Na hipertensão induzida pelo DPSPX observa-se, a nível vascular, aumento do efeito facilitatório mediado por adrenoceptores β prejunctionais (Guimarães, Albino-Teixeira, Paiva, 1995) e aumento do efeito inibitório mediado por adrenoceptores α_2 prejunctionais (Guimarães *et al.*, 1994), sendo o resultado global um aumento da neurotransmissão simpática (Karoon, Rubino, Burnstock, 1995). Por outro lado, no coração observa-se menor inotropismo mediado por adrenoceptores α e β (Rubino, Burnstock, 1995). Assim sendo, parece existir interação entre os receptores da adenosina e os adrenoceptores α e β prejunctionais. Nos ratos SHR as alterações na modulação prejunctional da neurotransmissão simpática parecem envolver vários receptores, nomeadamente, subsensibilidade dos adrenoceptores inibitórios α_2 (Galloway, Westfall, 1982) e da adenosina (Kubo, Su, 1983) e supersensibilidade dos adrenoceptores facilitatórios β_2 (Kawasaki, Cline, Su, 1982). Recentemente a interação entre o receptor facilitatório AT_1 para a angiotensina II (independentemente do subtipo) e o adrenoceptor inibitório α_2 tem recebido considerável atenção. Alguns estudos sugerem que é necessária a auto-inibição α_2

para que se verifique o efeito facilitatório da angiotensina II. Assim, o efeito facilitatório da angiotensina II é prevenido ou fortemente atenuado durante o antagonismo farmacológico do efeito inibitório α_2 no tecido cardíaco de Coelho (Starke, Schümann, 1972), Cobaio (Brasch *et al.*, 1995), Rato recém-nascido (Mota, Guimarães, 2002) e Ratinho (Cox *et al.*, 2000), enquanto que o efeito facilitatório da angiotensina II é aumentado durante a estimulação farmacológica do efeito inibitório α_2 no coração de Rato recém-nascido (Mota, Guimarães, 2003) e nos vasos renais de ratos SHR (Jackson *et al.*, 2001). Esta interação também foi observada em condições experimentais que minimizam a auto-inibição α_2 (Brasch *et al.*, 1995; Cox *et al.*, 2000). Contrariamente, na artéria pulmonar de Coelho observa-se um aumento da potência da angiotensina II após o bloqueio α_2 (Costa, Majewski, 1988) enquanto que na artéria da cauda de Rato não se verifica alteração do efeito facilitatório da angiotensina II pelo bloqueio α_2 (Mota *et al.*, 2000). Não é conhecida a razão para esta diferença de efeito mas poderá estar relacionada com diferenças inerentes ao tecido cardíaco e ao tecido vascular. Um estudo com Ratinhos *knockout* para os diferentes subtipos de adrenoceptores α_2 mostra que o adrenoceptor α_{2C} é o principal responsável pela interação com o receptor para a angiotensina II, embora o adrenoceptor α_{2B} possa também estar envolvido (Trendelenburg *et al.*, 2003). Foi proposto que a ausência de efeito facilitatório

da angiotensina II na presença de antagonismo α_2 esteja relacionada com a cínase C de proteínas (Cox *et al.*, 2000; Mota, Guimarães, 2002, 2003) que activada pode inactivar a via inibitória α_2 , (Cox *et al.*, 2000) ou interagir com a via do AMPc (Mota, Guimarães, 2002). Neste contexto, o maior efeito facilitatório da angiotensina II observado na artéria mesentérica de ratos hipertensos por infusão de DPSPX poderá estar relacionado com a maior sensibilidade dos adrenoceptores α_2 (Guimarães *et al.*, 1994). Estão igualmente descritas interacções entre os adrenoceptores α_2 e outros receptores inibitórios, nomeadamente os receptores A_1 da adenosina (Enero, Saidman, 1977). No entanto, nada se sabe acerca da interacção entre os receptores inibitórios A_1 da adenosina e o receptor facilitatório da angiotensina II embora a hipótese de existir qualquer relação tenha já sido levantada (Ralevic, Rubino, Burnstock, 1996). A inibição A_1 , à semelhança do que se observa para a auto-inibição α_2 , poderá ser igualmente necessária para que o efeito facilitatório da angiotensina II se revele na sua totalidade. Esta hipótese, meramente especulativa, poderia justificar a tendência para menor resposta à angiotensina II aos 3 dias de hipertensão por infusão de DPSPX. Contudo, o facto de a exposição aguda ao DPSPX não ter alterado a resposta à angiotensina II não favorece esta interpretação de interacção prejuncional entre receptor A_1 e receptor da angiotensina II. Mais uma vez, a não concordância dos resultados poderá estar relacionada com a

diferença entre uma exposição aguda e prolongada.

Estudo da sensibilidade ao estímulo doloroso agudo e papel do bolbo raquidiano ventrolateral

O estudo da sensibilidade dolorosa ao estímulo agudo em ratos hipertensos por infusão de DPSPX pretendeu avaliar se neste modelo experimental de hipertensão se reproduz a associação entre hipoalgesia e hipertensão observada noutros modelos experimentais de hipertensão (Zamir, Segal, 1979; Zamir, Simantov, Segal, 1980; Sitsen, de Jong, 1983) e na hipertensão humana (Zamir, Shuber, 1980; Ghione *et al.*, 1985; Ditto *et al.*, 1993). O facto de Ratinhos *knockout* para o receptor A_{2A} da adenosina serem hipertensos e demonstrarem hipoalgesia em testes comportamentais de dor (Ledent *et al.*, 1997) estimulou este interesse. Por outro lado, a activação do sistema renina-angiotensina na hipertensão induzida pelo DPSPX reforça a possibilidade de a angiotensina II poder ser o factor comum entre hipertensão e hipoalgesia.

No presente estudo, nos ratos hipertensos por infusão de DPSPX observou-se menor activação de neurónios espinhais induzida por estimulação nóxica mecânica, avaliada pela expressão espinal da proteína Fos, confirmando resultados

preliminares anteriores (Albino-Teixeira *et al.*, 1997). Dado que a expressão espinal da proteína Fos constitui um bom indicador de activação neuronal (Hunt, Pini, Evan, 1987) e que há uma correlação positiva com as respostas comportamentais de dor (Gogas *et al.*, 1991), os resultados obtidos sugerem que a hipertensão induzida pelo DPSPX está associada a hipoalgesia, à semelhança do que foi observado noutros modelos experimentais de hipertensão (Zamir, Segal, 1979; Zamir, Simantov, Segal, 1980; Sitsen, de Jong, 1983) e na hipertensão humana (Zamir, Shuber, 1980; Ghione *et al.*, 1985; Ditto *et al.*, 1993). A inibição de neurónios espinais foi já observada em estudos de detecção imunohistoquímica da expressão de *c-fos* na hipertensão por estenose da artéria renal (Tavares, Albino-Teixeira, Lima, 1995; Tavares *et al.*, 1997) e na hipertensão induzida pelo L-NAME (Tavares, Albino-Teixeira, Lima, 1995), e em estudos de electrofisiologia em ratos SHR (Randich, Robertson, 1994). A inibição de neurónios espinais nos ratos hipertensos por infusão de DPSPX aconteceu sobretudo nas camadas profundas do corno dorsal, o que está de acordo com o observado noutros modelos experimentais de hipertensão que utilizaram o *c-fos* para monitorizar a actividade de neurónios espinais (Tavares, Albino-Teixeira, Lima, 1995; Tavares *et al.*, 1997). Para além disso, convém salientar que estudos de electrofisiologia (Randich, Robertson, 1994) mostraram uma maior inibição de neurónios de largo espectro

dinâmico, que prevalecem nas camadas profundas do corno dorsal (Menetrey, Giesler, Besson, 1977).

Diversos estudos experimentais sugeriram que quanto mais rápida é a instalação da hipertensão maior é o grau de inibição dos neurónios espinhais. De facto, a inibição espinhal é maior na hipertensão induzida por estenose da artéria renal (Tavares, Albino-Teixeira, Lima, 1995), que se instala rapidamente (2-3 dias; Cangiano, Rodriguez-Sargent, Martinez-Maldonado, 1979), do que na hipertensão induzida pelo DPSPX ou pelo L-NAME (Tavares, Albino-Teixeira, Lima, 1995), que são modelos experimentais de hipertensão com um perfil de instalação gradual. A pressão arterial de ratos tratados pelo DPSPX sobe gradualmente a partir do dia 3/4 e estabiliza pelo dia 7 (Albino-Teixeira *et al.*, 1991) e a hipertensão induzida pelo L-NAME tem uma instalação ainda mais lenta (Albino-Teixeira, Soares-da-Silva, 1994). A hipertensão induzida pelo DPSPX está associada a maior inibição dos neurónios espinhais do que a hipertensão pelo L-NAME (Tavares, Albino-Teixeira, Lima, 1995). A rapidez de instalação da hipertensão parece, inclusivamente, ser mais importante do que a magnitude ou a duração da mesma. A hipertensão induzida pelo L-NAME caracteriza-se por uma elevação mais marcada da pressão arterial do que a hipertensão por estenose da artéria renal (Tavares, Albino-Teixeira, Lima, 1995) ou a hipertensão pelo DPSPX, sendo, no entanto, o modelo em que a inibição dos neurónios espinhais é

menos marcada (Tavares, Albino-Teixeira, Lima, 1995; Tavares *et al.*, 1997). Por outro lado, a hipertensão por estenose da artéria renal está associada a igual inibição dos neurónios espinhais aos 4 e aos 21 dias de hipertensão (Tavares, Albino-Teixeira, Lima, 1995; Tavares *et al.*, 1997), momentos em que a magnitude da elevação tensional é semelhante (Tavares, Albino-Teixeira, Lima, 1995; Tavares *et al.*, 1997).

A menor activação dos neurónios nociceptivos espinhais induzida por estimulação nóxica poderia resultar do antagonismo da acção da adenosina ou da acção directa do DPSPX sobre os neurónios nociceptivos espinhais. Dados clínicos e experimentais diversos relacionam a adenosina com a modulação de processos antinociceptivos no cérebro e na medula espinhal. Apesar de a nível muscular e cardíaco a adenosina ter uma acção algogénica (Gaspardone *et al.*, 1995), a adenosina e seus análogos induzem antinocicepção após administração intratecal e subcutânea (Holmgren *et al.*, 1986). Estudos clínicos demonstram que a infusão intravenosa de adenosina tem um efeito antinociceptivo em vários modelos de provocação de dor, diminuindo a necessidade de anestésicos voláteis e de analgesia opióide pós-operatória (revisto por Sollevi, 1997). Dado que a medula espinhal é um local fundamental para a modulação da nocicepção induzida pela adenosina (revisto por Sawynok, Liu, 2003), é pertinente questionar se a inibição dos neurónios espinhais se deve a uma

acção directa da adenosina naquela zona de processamento da informação dolorosa. Estudos electrofisiológicos indicam que a adenosina inibe neurónios nociceptivos espinhais (Salter, Henry, 1987), pelo que o eventual antagonismo da sua acção pelo DPSPX não deveria resultar em inibição. Para além disso, a avaliação das respostas dos neurónios espinhais foi realizada 10 dias após o início da infusão de DPSPX, ou seja, 3 dias após o término da mesma. Uma vez que o DPSPX praticamente não é metabolizado (Tofovic *et al.*, 1991), sendo eliminado intacto pelo organismo, não é provável que no dia 10 exista DPSPX em circulação e, portanto, que exerça qualquer efeito farmacológico. Finalmente deve referir-se que o DPSPX tem carga negativa a pH fisiológico, pelo que não penetra nas células nem atravessa a barreira hemato-encefálica (Daly *et al.*, 1985; Tofovic *et al.*, 1991).

A lesão do bolbo raquidiano ventrolateral pelo ácido quinolínico preveniu a inibição dos neurónios espinhais. Não se observaram diferenças na imunorreactividade para a proteína Fos entre o grupo controlo e o grupo de ratos hipertensos por infusão de DPSPX com lesão do bolbo raquidiano ventrolateral. Estes dados sugerem que o bolbo raquidiano ventrolateral participa na inibição de neurónios espinhais associada à hipertensão induzida pelo DPSPX, à semelhança do que se verifica na hipertensão por estenose da artéria renal (Tavares *et al.*, 1997). Está descrita maior resposta nociceptiva após lesão

bilateral do bolbo raquidiano ventrolateral com destruição de neurónios locais e fibras de passagem (Hall *et al.*, 1982) ou em que apenas os corpos celulares foram destruídos (Foong, Duggan, 1986). No presente estudo, a lesão do bolbo raquidiano ventrolateral foi unilateral (bolbo raquidiano ventrolateral esquerdo) o que pode explicar porque não se observou maior resposta nociceptiva. Uma vez que o ácido quinolínico é um agente excitotóxico que leva à morte neuronal por activação de receptores do N-metil-D-aspartato (Stone, Perkins, 1981), poupando fibras de passagem (Schwarcz, Whetsell, Mangano, 1983), não é provável que a prevenção da inibição espinhal observada com a lesão do bolbo raquidiano ventrolateral pelo ácido quinolínico se deva à interrupção de vias antinociceptivas que atravessem o bolbo raquidiano ventrolateral.

O grau de activação central do sistema renina-angiotensina na hipertensão induzida pelo DPSPX não é conhecido. Os níveis elevados de angiotensina II plasmática poderão ser responsáveis pela menor sensibilidade ao estímulo nóxico observada e pelo envolvimento do bolbo raquidiano ventrolateral na hipoalgesia associada à hipertensão.

A angiotensina II periférica não atravessa a barreira hemato-encefálica (Schelling *et al.*, 1976) mas pode ter acção central por duas formas, directa e/ou indirecta. A angiotensina II periférica pode actuar directamente nos órgãos circunventriculares,

não protegidos pela barreira hemato-encefálica (Mendelsohn *et al.*, 1984). Indirectamente, a angiotensina II periférica pode também activar neurónios do núcleo do tracto solitário, do bolbo raquidiano ventrolateral e da área postrema por uma acção secundária à estimulação de baroreceptores (Potts, Hirooka, Dampney, 1999).

Diversos dados sugerem que o bolbo raquidiano ventrolateral possa mediar a hipoalgesia associada à hipertensão. Os neurónios do bolbo raquidiano ventrolateral são activados por aumentos da pressão arterial através de aferentes do núcleo do tracto solitário (Agarwal, Gelsema, Calaresu, 1990; Murphy *et al.*, 1994), e exercem uma acção inibitória sobre a região vasopressora, localizada no bolbo raquidiano ventrolateral rostral (Agarwal, Gelsema, Calaresu, 1990; Murphy *et al.*, 1994). O bolbo raquidiano ventrolateral parece exercer um papel vasodepressor tónico, uma vez que a sua activação diminui a pressão arterial (Willeite *et al.*, 1983; Tavares *et al.*, 1997), enquanto que a sua inibição aumenta a pressão arterial (Cravo, Morrison, Reis, 1991; Tavares *et al.*, 1997). Por outro lado, a estimulação do bolbo raquidiano ventrolateral resulta em hipoalgesia (Gebhart, Ossipov, 1986) e inibição de neurónios do corno dorsal espinhal (Hall *et al.*, 1982).

A acção da angiotensina II ao nível do bolbo raquidiano ventrolateral é também importante no contexto da hipoalgesia

associada à hipertensão. No bolbo raquidiano ventrolateral, a angiotensina II exerce acção pressora ao nível rostral e depressora ao nível caudal (Muratani, Averill, Ferrario, 1991). Por outro lado, a angiotensina II endógena facilita o reflexo baroreceptor por acção no bolbo raquidiano ventrolateral rostral e inibe-o na região caudal (Saigusa, Iriki, Arita, 1996). A acção da angiotensina II endógena no bolbo raquidiano ventrolateral rostral é importante para a manutenção da hipertensão experimental (Ito *et al.*, 2002, 2003), uma vez que microinjecções de antagonistas AT₁ diminuem a pressão arterial nos ratos hipertensos, sem terem efeito nos ratos controlo (DiBona, Jones, 2001; Ito *et al.*, 2002). A acção pressora da angiotensina II depende do nível de actividade endógena do sistema renina-angiotensina, uma vez que é mais marcado em ratos sujeitos a dieta hipo-salina do que em ratos sujeitos a dieta hiper-salina (DiBona, Jones, 2001; Ito *et al.*, 2003).

A administração intracerebroventricular (Haulica *et al.*, 1983, 1986,), intratecal (Toma, Sgambato, Couture, 1997) ou subcutânea crónica (Irvine, White, 1997) de angiotensina II induz antinocicepção. Além disso, o tratamento com inibidores da enzima de conversão da angiotensina normaliza a percepção dolorosa de indivíduos hipertensos mesmo sem um controlo totalmente eficaz da pressão arterial (Guasti *et al.*, 1998). Em ratos SHR, fármacos que bloqueiam a acção do sistema renina-angiotensina mesmo em dose não antihipertensora normalizam

as respostas em testes comportamentais de dor, o que não se verifica com a hidralazina, apesar de eficaz na redução da pressão arterial (Irvine, White, Head, 1995).

A hipertensão tem sido associada ao compromisso do reflexo baroreceptor (Takeshita *et al.*, 1975; Mancina *et al.*, 1978). A angiotensina II endógena atenua o reflexo baroreceptor mesmo em dose subpressora (Casto, Phillips, 1986). O bloqueio do sistema renina-angiotensina melhora a sensibilidade do reflexo baroreceptor (Berecek *et al.*, 1983). Existe alguma controvérsia acerca de a acção da angiotensina II sobre o baroreflexo ser dependente (Ichikawa *et al.*, 1995) ou independente (Brooks, Ell, Wright, 1993) da sua acção pressora. No entanto, alguns factos favorecem a hipótese de a acção da angiotensina II sobre o baroreflexo ser independente da sua acção pressora. Em condições de activação do sistema renina-angiotensina, como a privação de sódio, se a diminuição da pressão arterial for prevenida quando o sistema renina-angiotensina é bloqueado farmacologicamente, a relação entre pressão arterial e ritmo cardíaco ou actividade simpática é deslocada para pressões menores (Xu, Brooks, 1997). A actividade dos baroreceptores e a percepção dolorosa também se encontram relacionadas. Na hipoalgesia associada à hipertensão, mas não em condições basais, a percepção dolorosa é modulada por baroreceptores (Guasti *et al.*, 2002). No Homem, a actividade do reflexo baroreceptor está inversamente

relacionada com a sensibilidade à dor (Droste *et al.*, 1994). No Rato, a desnervação dos baroreceptores anula a menor sensibilidade a estímulo nóxico induzida por elevação aguda da pressão arterial (Dworkin *et al.*, 1979).

Em resumo, a angiotensina II pode activar neurónios do bolbo raquidiano ventrolateral dando origem a duas respostas distintas: vasodepressão, por inibição dos neurónios do bolbo raquidiano ventrolateral rostral, e hipoalgesia, por inibição de neurónios nociceptivos espinhais.

Os estudos realizados até ao momento não permitem ainda, contudo, esclarecer se as alterações na sensibilidade dolorosa associadas à hipertensão são funcionalmente significativas e representam um mecanismo compensatório ou de defesa ou se reflectem efeitos laterais resultantes da activação de circuitos neuronais e/ou mediadores comuns.

Conclusões

Dos resultados experimentais obtidos é possível concluir que na hipertensão induzida pelo DPSPX se verifica activação do sistema renina-angiotensina. Os factos que directamente permitem tirar esta conclusão são:

1) o aumento dos níveis plasmáticos de angiotensina II;

2) a prevenção da hipertensão e das alterações morfológicas vasculares associadas pelo losartan, enquanto que o atenolol previne apenas a hipertensão;

3) a marcada diminuição na resposta contráctil à angiotensina II na artéria e na veia mesentérica, possivelmente por dessensibilização do receptor posjuncional.

Os resultados do estudo de modulação da neurotransmissão simpática pela angiotensina II não reflectem tão claramente a activação do sistema renina-angiotensina neste modelo experimental de hipertensão, embora se observe aumento do efeito facilitatório da angiotensina II sobre a

libertação de noradrenalina, na artéria mesentérica. No entanto, os resultados deste estudo permitem reforçar a hipótese de o receptor prejunctional da angiotensina II ser diferente do receptor posjunctional.

Finalmente, o estudo de sensibilidade ao estímulo doloroso revelou que na hipertensão por infusão de DPSPX se verifica menor activação, induzida por estimulação nóxica, dos neurónios nociceptivos espinhais e, possivelmente, hipoalgesia. Além disso, verificou-se que o bolbo raquidiano ventrolateral participa nessa inibição espinhal. Embora não tenha sido estudado, é possível que a activação do sistema renina-angiotensina, através do seu efector principal, a angiotensina II, possa também ser responsável pela inibição espinhal mediada, pelo menos em parte, pelo sistema supraspinhal que inclui o bolbo raquidiano ventrolateral.

Bibliografia

- Aalkjaer, C., Heagerty, A.M., Petersen, K.K., Swales, J.D., Mulvany, M.J. (1987). Evidence for increased media thickness, increased neuronal amine uptake, and depressed excitation-contraction coupling in isolated resistance vessels from essential hypertensives. *Circ. Res.* **61**: 181-186.
- Agarwal, S.K., Gelsema, A.J., Calaresu, F.R. (1990). Inhibition of rostral VLM by baroreceptor activation is relayed through caudal VLM. *Am. J. Physiol.* **258**: R1271-R1278.
- Albino-Teixeira, A., Azevedo, I., Branco, D., Osswald, W. (1990a). Purine agonists prevent trophic changes caused by sympathetic denervation. *Eur. J. Pharmacol.* **179**: 141-149.
- Albino-Teixeira, A., Matias, A., Soares-da-Silva, P., Sarmiento, A., Azevedo, I. (1990b). Effects of sympathetic denervation on liver fibroblasts: prevention by adenosine. *J. Auton. Pharmacol.* **10**: 181-189.
- Albino-Teixeira, A., Matias, A., Polónia, J., Azevedo, I. (1991). Blockade of adenosine receptors causes hypertension and cardiovascular structural changes in the rat. *J. Hypertens. Suppl.* **9**: S196-S197.
- Albino-Teixeira, A., Osswald, W. (1994). Influence of ACE-inhibition on hypertension caused by long-lasting infusion of an antagonist of adenosine receptors. *J. Auton. Pharmacol.* **14**: 13.
- Albino-Teixeira, A., Soares-da-Silva, P. (1994). Isosorbide 5-mononitrate reverses high blood pressure in N^G-nitro-L-arginine methyl ester treated rats. *Gen. Pharmacol.* **25**: 1329-1336.
- Albino-Teixeira, A., Tavares, I., Almeida, A., Lima, D. (1997). Inhibition of spinal nociceptive neurones during hypertension is dependent on the integrity of the caudal VLM. *Pharmacol. Toxicol.* **81**: 43.
- Allen, A.M., Dampney, R.A.L., Mendelsohn, F.A.O. (1988). Angiotensin receptor binding and pressor effects in cat subretrofacial nucleus. *Am. J. Physiol.* **255**: H1011-H1017.

- Anderson, W.P., Kett, M.M., Stevenson, K.M., Edgley, A.J., Denton, K.M., Fitzgerald, S.M. (2000). Renovascular hypertension: structural changes in the renal vasculature. *Hypertension* **36**: 648-652.
- Arribas, S., Marin, J., Ponte, A., Balfagon, G., Salaices, M. (1994). Norepinephrine-induced relaxations in rat aorta mediated by endothelial beta adrenoceptors. Impairment by ageing and hypertension. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **270**: 520-527.
- Arribas, S.M., Alonso, M.J., Marín, J., Fernandes, F., Llergo, J.L., Sánchez-Ferrer, C.F., Salaices, M. (1996). Noradrenergic transmission in the tail artery of hypertensive rats transgenic for the mouse renin gene Ren-2. *J. Auton. Pharmacol.* **16**: 69-77.
- Balcells, E., Suarez, J., Rubio, R. (1992). Functional role of intravascular coronary endothelial adenosine receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **210**: 1-9.
- Balt, J.C., Mathy, M.J., Pfaffendorf, M., van Zwieten, P.A. (2001). Inhibition of facilitation of sympathetic neurotransmission and angiotensin II-induced pressor effects in the pithed rat: comparison between valsartan, candesartan, eprosartan and embusartan. *J. Hypertens.* **19**: 2241-2250.
- Balt, J.C., Mathy, M.J., Nap., A., Pfaffendorf, M., van Zwieten, P.A. (2002). Prejunctional and postjunctional inhibitory actions of eprosartan and candesartan in the isolated rabbit mesenteric artery. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **40**: 50-57.
- Balt, J.C., Mathy, M.J., Nap., A., Pfaffendorf, M., van Zwieten, P.A. (2003). Involvement of the AT(2)-receptor in angiotensin II-induced facilitation of sympathetic neurotransmission. *J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* **3**: 181-187.
- Banskota, N.K., Taub, R., Zellner, K., Olsen, P., King, G.L. (1989). Characterization of induction of protooncogene c-myc and cellular growth in human vascular smooth muscle cells by insulin and IGF-I. *Diabetes* **38**: 123-129.
- Bataineh, A., Raij, L. (1998). Angiotensin II, nitric oxide, and end-organ damage in hypertension. *Kidney Int. Suppl.* **54**: S-14-S-19.
- Benetos, A., Levy, B.I., Lacolley, P., Taillard, F., Duriez, M., Safar, M.E. (1997). Role of angiotensin II and bradykinin on aortic collagen following converting enzyme inhibition in spontaneously hypertensive rats. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17**: 3196-3201.
- Berecek, K.H., Okuno, T., Nagahama, S., Oparil, S. (1983). Altered vascular reactivity and baroreflex sensitivity induced by chronic central administration of captopril in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* **5**: 689-700.

- Berk, B.C., Aronow, M.S., Brocks, T.A., Cragoe, E.Jr., Gimbrone, M.A., Alexander, R.W. (1987). Angiotensin II-stimulated Na^+/H^+ exchange in cultured vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **262**: 5057-5064.
- Bockman, C.S, Gonzalez-Cabrera, I., Abel, P.W. (1996). Alpha-2 adrenoceptor subtype causing nitric oxide-mediated vascular relaxation in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **278**: 1235-1243.
- Bonnet, F., Cooper, M.E., Carey, R.M., Casley, D., Cao, Z. (2001). Vascular expression of angiotensin type 2 receptor in the adult rat: influence of angiotensin II infusion. *J. Hypertens.* **19**: 1075-1081.
- Branco, D., Albino-Teixeira, A., Azevedo, I., Osswald, W. (1984). Structural and functional alterations caused at the extraneuronal level by sympathetic denervation of blood vessels. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **326**: 302-312.
- Brasch, H., Sieroslowski, L., Bergmann, N., Dominiak, P. (1995). In field-stimulated guinea-pig atria and AT_1 -receptor mediated increase of noradrenaline release by angiotensin II is seen only in the presence of prejunctional autoinhibition. *Adv. Exp. Med. Biol.* **377**: 293-298.
- Brede, M., Hadamek, K., Meinel, L., Wiesmann, F., Peters, J., Engelhardt, S., Simm, A., Haase, A., Lohse, M.J., Hein, L. (2001). Vascular hypertrophy and increased P70S6 kinase in mice lacking the angiotensin II AT_2 receptor. *Circulation* **104**: 2602-2607.
- Brizzolara-Gourdie, A., Webb, J.G. (1997). Angiotensin II potentiates vasodilation of rat aorta by cAMP elevating agonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **281**: 354-359.
- Brock, T.A., Alexander, R.W., Ekstein, L.S., Atkinson, W.J., Gimbrone, M.A.Jr. (1985). Angiotensin increases cytosolic free calcium in cultured vascular smooth muscle cells. *Hypertension* **7**: 1105-1109.
- Brooks, V.L., Ell, K.R., Wright, R.M. (1993). Pressure-independent baroreflex resetting produced by chronic infusion of angiotensin II in rabbits. *Am. J. Physiol.* **265**: H1275-H1282.
- Bruehl, S., Carlson, C.R., McCubbin, J.A. (1992). The relationship between pain sensitivity and blood pressure in normotensives. *Pain* **48**: 463-467.
- Brunner, H.R., Chang, P., Wallach, R., Sealey, J.E., Laragh, J.H. (1972). Angiotensin II vascular receptors: their avidity in relationship to sodium balance, the autonomic nervous system, and hypertension. *J. Clin. Invest.* **51**: 58-67.
- Bullock, G.R., Taylor, S.G., Weston, A.H. (1986). Influence of the vascular endothelium on agonist-induced contractions and relaxations in rat aorta. *Br. J. Pharmacol.* **89**: 819-830.

- Bund, S.J., Heagerty, A.M., Fletcher, A., Swales, J.D. (1989). Evidence for a decreased noradrenaline sensitivity in mesenteric resistance vessels from rats with chemical renal medullectomy. *Clin. Sci. (London)* **77**: 167-170.
- Campbell, T.S., Ditto, B., Seguin, J.R., Assaad, J.M., Pihl, R.O., Nagin, D., Tremblay, R.E. (2002). A longitudinal study of pain sensitivity and blood pressure in adolescent boys: results from a 5-year follow-up. *Health Psychol.* **21**: 594-600.
- Campbell, T.S., Ditto, B., Seguin, J.R., Sinray, S., Tremblay, R.E. (2003). Adolescent pain sensitivity is associated with cardiac autonomic function and blood pressure over 8 years. *Hypertension* **41**: 1228-1233.
- Cangiano, J.L., Rodriguez-Sargent, C., Martínez-Maldonado, M. (1979). Effects of antihypertensive treatment on systolic blood pressure and renin in experimental hypertension in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **208**: 310-313.
- Cao, Z., Dean, R., Wu, L., Casley, D., Cooper, M.E. (1999). Role of angiotensin receptor subtypes in mesenteric vascular proliferation and hypertrophy. *Hypertension* **34**: 408-414.
- Casto, R., Phillips, M.I. (1986). Angiotensin II attenuates baroreflexes at nucleus tractus solitarius of rats. *Am. J. Physiol.* **250**: R193-R198.
- Christensen, K.L., Mulvany, M.J. (2001). Vasodilation, not hypotension, improves resistance vessel design during treatment of essential hypertension: a literature survey. *J. Hypertens.* **19**: 1001-1006.
- Cline, W.H. (1985). Enhanced in vivo responsiveness of presynaptic angiotensin II receptor-mediated facilitation of vascular adrenergic neurotransmission in spontaneously hypertensive rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **232**: 661-669.
- Collis, M.G., Alps, B.J. (1975). Vascular reactivity to noradrenaline, potassium chloride, and angiotensin II in the rat perfused mesenteric vasculature preparation, during the development of renal hypertension. *Cardiovasc. Res.* **9**: 118-126.
- Costa, F., Biaggioni, I. (1998). Role of nitric oxide in adenosine-induced vasodilation in humans. *Hypertension* **31**: 1061-1064.
- Costa, M., Majewski, H. (1988). Facilitation of noradrenaline release from sympathetic nerves through activation of ACTH receptors, β -adrenoceptors and angiotensin II receptors. *Br. J. Pharmacol.* **95**: 993-1001.
- Cox, S.L., Ben, A., Story, D.F., Ziogas, J. (1995). Evidence for the involvement of different receptor subtypes in the pre- and postjunctional actions of angiotensin II at rat sympathetic neuroeffector sites. *Br. J. Pharmacol.* **114**: 1057-1063.
- Cox, S.L., Story, D.F., Ziogas, J. (1996). Multiple prejunctional actions of angiotensin II on noradrenergic transmission in the caudal artery of the rat. *Br. J. Pharmacol.* **119**: 976-984.

- Cox, S.L., Schelb, V., Trendelenburg, A.U., Starke, K. (2000). Enhancement of noradrenaline release by angiotensin II and bradykinin in mouse atria: evidence for cross-talk between $G_{q/11}$ protein- and $G_{i/o}$ protein-coupled receptors. *Br. J. Pharmacol.* **129**: 1095-1102.
- Cravo, S.L., Morrison, S.F., Reis, D.J. (1991). Differentiation of two cardiovascular regions within caudal ventrolateral medulla. *Am. J. Physiol.* **261**: R985-R994.
- Cronstein, B.N., Levin, R.I., Belanoff, J., Weissmann, G., Hirschhorn, R. (1986). Adenosine: an endogenous inhibitor of neutrophil-mediated injury to endothelial cells. *J. Clin. Invest.* **78**: 760-770.
- Daly, J.W., Padgett, W., Shamim, M.T., Butts-Lamb, P., Waters, J. (1985). 1,3-dialkyl-8-(p-sulfophenyl)xanthines: potent water-soluble antagonists for A_1 and A_2 -adenosine receptors. *J. Med. Chem.* **28**: 487-492.
- Danser, A.H. (1996). Local renin-angiotensin systems. *Mol. Cell Biochem.* **157**: 211-216.
- Davis, J.O. (1977). The pathogenesis of chronic renovascular hypertension. *Circ. Res.* **40**: 439-444.
- Day, M.D., Moore, A.F. (1976). Interaction of angiotensin II with noradrenaline and other spasmogens on rabbit isolated aortic strips. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **219**: 29-44.
- De Champlain, J. (1990). Pre- and postsynaptic adrenergic dysfunctions in hypertension. *J. Hypertens. Suppl.* **8**: S77-S85.
- Deng, L.Y., Schiffrin, E.L. (1991). Morphological and functional alterations of mesenteric small resistance arteries in early renal hypertension in rats. *Am. J. Physiol.* **261**: H1171-H1177.
- DiBona, G.F., Jones, S.Y. (2001). Sodium intake influences hemodynamic and neural responses to angiotensin receptor blockade in rostral ventrolateral medulla. *Hypertension* **37**: 1114-1123.
- Ditto, B., Edwards, M.C., Miller, S., D'Antono, B., Blum, S. (1993). The effects of sodium loading on blood pressure and pain responses to the cold pressor test. *J. Psychosom. Res.* **37**: 771-780.
- Donovick, P.J. (1974). A metachromatic stain for neural tissue. *Stain Technol.* **49**: 49-51.
- Dowell, F.J., Henrion, D., Benessiano, J., Poitevin, P., Levy, B. (1996). Chronic infusion of low-dose angiotensin II potentiates the adrenergic response in vivo. *J. Hypertens.* **14**: 177-182.
- Draper, A.J., Kingsbury, M.P., Redfern, P.H., Todd, M.H. (1992). Effects of chronic administration of atenolol on the in situ perfused mesentery of normotensive and hypertensive rats. *J. Auton. Pharmacol.* **12**: 89-96.

- Droste, C., Kardos, A., Brody, S., Greenlee, M.W., Roskamm, H., Rau, H. (1994). Baroreceptor stimulation: pain perception and sensory thresholds. *Biol. Psychol.* **37**: 101-113.
- Drury, A.N., Szent-Gyorgyi, A. (1929). The physiological activity of adenine compounds with special reference to their actions upon the mammalian heart. *J. Physiol.* **68**: 213-237.
- Dubey, R.K., Gillespie, D.G., Mi, Z., Suzuki, F., Jackson, E.K. (1996a). Smooth muscle cell-derived adenosine inhibits cell growth. *Hypertension* **27**: 766-773.
- Dubey, R.K., Gillespie, D.G., Osaka, K., Suzuki, F., Jackson, E.K. (1996b). Adenosine inhibits growth of rat aortic smooth muscle cells. Possible role of A_{2b} receptor. *Hypertension* **27**: 786-793.
- Dubey, R.K., Gillespie, D.G., Mi, Z., Jackson, E.K. (1997). Exogenous and endogenous adenosine inhibits fetal calf serum-induced growth of rat cardiac fibroblasts. Role of A_{2B} receptors. *Circulation* **96**: 2656-2666.
- Dubey, R.K., Gillespie, D.G., Jackson, E.K. (1998). Adenosine inhibits collagen and protein synthesis in cardiac fibroblasts. Role of A_{2B} receptors. *Hypertension* **31**: 943-948.
- Dubey, R.K., Gillespie, D.G., Mi, Z., Jackson, E.K. (1998). Adenosine inhibits growth of human aortic smooth muscle cells via A_{2B} receptor. *Hypertension* **31**: 516-521.
- Dubey, R.K., Gillespie, D.G., Jackson, E.K. (1999). Adenosine inhibits collagen and total protein synthesis in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* **33**: 190-194.
- Dworkin, B.R., Filewich, R.J., Miller, N.E., Craigmyle, N., Pickering, T.G. (1979). Baroreceptor activation reduces reactivity to noxious stimulation: implications for hypertension. *Science* **205**: 1299-1301.
- Eccleston-Joyner, C.S., Gray, S.D. (1988). Arterial hypertrophy in the fetal and neonatal spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* **12**: 513-518.
- Eikenburg, D.C., Ekas, R.D., Lokhandwala, M.F. (1982). Alterations in prejunctional responsiveness to angiotensin II during the development of 2-kidney, 1-clip Goldblatt hypertension in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **223**: 766-773.
- Endemann, D., Touyz, R.M., Li, J.-S., Deng, L.-Y., Schiffrin, E.L. (1999). Altered angiotensin II-induced small artery contraction during the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Hypertens.* **12**: 716-723.
- Enero, M.A., Saidman, B.Q. (1977). Possible feed-back inhibition of noradrenaline release by purine compounds. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **297**: 39-46.

- Folkow, B. (1956). Structural, myogenic, humoral and nervous factors controlling peripheral resistance. In *Hypotensive Drugs* (Harington): 163-174. Pergamon Press, London.
- Folkow, B., Hallbäck, M., Lundgren, Y., Weiss, L. (1970a). Background of increased flow resistance and vascular reactivity in spontaneously hypertensive rats. *Acta Physiol. Scand.* **80**: 93-106.
- Folkow, B., Hallbäck, M., Lundgren, Y., Weiss, L. (1970b). Structurally based increase of flow resistance in spontaneously hypertensive rats. *Acta Physiol. Scand.* **79**: 373-378.
- Folkow, B. (1990). "Structural factor" in primary and secondary hypertension. *Hypertension* **16**: 89-101.
- Foong, F.W., Duggan, A.W. (1986). Brain-stem areas tonically inhibiting dorsal horn neurones: studies with microinjection of the GABA analogue piperidine-4-sulphonic acid. *Pain* **27**: 361-371.
- Fresco, P., Diniz, C., Queiróz, G., Gonçalves, J. (2002). Release inhibitory receptors activation favours the A_{2A} -adenosine receptor-mediated facilitation of noradrenaline release in isolated rat tail artery. *Br. J. Pharmacol.* **136**: 230-236.
- Fujita, T., Sakaguchi, H., Shibagaki, M., Fukui, T., Nomura, M., Sekiguchi, S. (1977). The pathogenesis of Bartter's syndrome – functional and histologic studies. *Am. J. Med.* **63**: 467-474.
- Galloway, M.P., Westfall, T.C. (1982). The release of endogenous norepinephrine from the coccygeal artery of spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Circ. Res.* **51**: 225-232.
- Gamboa, A., Ertl, A.C., Costa, F., Farley, G., Manier, M.L., Hachey, D.L., Diedrich, A., Biaggioni, I. (2003). Blockade of nucleoside transport is required for delivery of intraarterial adenosine into the interstitium. Relevance to therapeutic preconditioning in humans. *Circulation* **108**: 2631-2635.
- Gaspardone, A., Crea, F., Tomai, F., Varsaci, F., Iamele, M., Gioffre, G., Chiariello, L., Gioffre, P.A. (1995). Muscular and cardiac adenosine-induced pain is mediated by A1 receptors. *J. Am. Coll. Cardiol.* **25**: 251-257.
- Gebhart, G.F., Ossipov, M.H. (1986). Characterization of inhibition of the spinal nociceptive tail-flick reflex in the rat from the medullary lateral reticular nucleus. *J. Neurosci.* **6**: 701-713.
- Geisterfer, A., Peach, M., Owens, G. (1988). Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ. Res.* **62**: 749-756.

- Ghione, S., Rosa, C., Panattoni, E., Nuti, M., Mezzasalma, L., Giuliano, G. (1985). Comparison of sensory and pain threshold in tooth pulp stimulation in normotensive man and essential hypertension. *J. Hypertens. Suppl.* **3**: S113-S115.
- Giannattasio, C., Cattaneo, B.M., Mangoni, A.A., Carugo, S., Stella, M.L., Failla, M., Trazzi, S., Sega, R., Grassi, G., Mancina, G. (1995). Cardiac and vascular structural changes in normotensive subjects with parental hypertension. *J. Hypertens.* **13**: 259-264.
- Gogas, K.R., Presley, R.W., Levine, J.D., Basbaum, A.I. (1991). The antinociceptive action of supraspinal opioids results from an increase in descending inhibitory control: correlation of nociceptive behaviour and c-fos expression. *Neuroscience* **42**: 617-628.
- Gonçalves, J., Queiróz, G. (1996). Purinoceptor modulation of noradrenaline released in rat tail artery: tonic modulation mediated by inhibitory P2Y- and facilitatory A2A-purinoceptors. *Br. J. Pharmacol.* **117**: 156-160.
- Griendling, K.K., Rittenhouse, S.E., Brock, T.A., Ekstein, L.S., Gimbrone, M.A.Jr., Alexander, R.W. (1986). Sustained diacylglycerol formation from inositol phospholipids in angiotensin II-stimulated vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **261**: 5901-5906.
- Griffin, S., Brown, W., MacPherson, F., McGrath, J., Wilson, V., Korsgaard, N., Mulvany, M., Lever, A. (1991). Angiotensin II causes vascular hypertrophy in part by a non-pressor mechanism. *Hypertension* **17**: 626-635.
- Grisk, O., Rose, H.-J., Lorenz, G., Rettig, R. (2002). Sympathetic-renal interaction in chronic arterial pressure control. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **283**: R441-R450.
- Guasti, L., Grimoldi, P., Diolisi, A., Petrozzino, M.R., Gaudio, G., Grandi, A.M., Rossi, M.G., Venco, A. (1998). Treatment with enalapril modifies the pain perception pattern in hypertensive patients. *Hypertension* **31**: 1146-1150.
- Guasti, L., Zanotta, D., Mainardi, L.T., Petrozzino, M.R., Grimoldi, P., Garganico, D., Diolisi, A., Gaudio, G., Klersy, C., Grandi, A.M., Simoni, C., Cerutti, S. (2002). Hypertension-related hypoalgesia, autonomic function and spontaneous baroreflex sensitivity. *Auton. Neurosci.* **99**: 127-133.
- Guimarães, S., Osswald, W. (1969). Adrenergic receptors in the veins of the dog. *Eur. J. Pharmacol.* **5**: 133-140.
- Guimarães, S., Paiva, M.Q., Moura, D., Vaz-da-Silva, M.J., Albino-Teixeira, A. (1994). Long-term administration of 1,3-dipropyl-8-sulphophenylxanthine (DPSPX) alters α_2 -adrenoceptor-mediated effects at the pre- but not at the postjunctional level. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **350**: 692-695.

- Guimarães, S., Albino-Teixeira, A., Paiva, M.Q. (1995). Hypertension and enhanced β -adrenoceptor-mediated facilitation of noradrenaline release produced by chronic blockade of adenosine receptors. *Br. J. Pharmacol.* **114**: 1595-1598.
- Guimarães, S., Paiva, M.Q., Moura, D. (1998). Different receptors for angiotensin II at pre- and postjunctional level of the canine mesenteric and pulmonary arteries. *Br. J. Pharmacol.* **124**: 1207-1212.
- Guimarães, S., Pinheiro, H., Tavares, P., Loio, A., Moura, D. (2001). Differential effects of eprosartan and losartan at prejunctional angiotensin II receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **363**: 509-514.
- Haefliger, J-A., Bergonzelli, G., Waeber, G., Aubert, J-F., Nussberger, J., Gavras, H., Nicod, P., Waeber, B. (1995). Renin and angiotensin II receptor gene expression in kidneys of renal hypertensive rats. *Hypertension* **26**: 733-737.
- Hall, J.G., Duggan, A.W., Morton, C.R., Johnson, S.M. (1982). The location of brainstem neurones tonically inhibiting dorsal horn neurones of the cat. *Brain Res.* **244**: 215-222.
- Hall, J.E. (1986). Control of sodium excretion by angiotensin II: intrarenal mechanisms and blood pressure regulation. *Am. J. Physiol.* **250**: R960-R972.
- Harrap, S.B., Van der Merwe, W.M., Griffin, S.A., MacPherson, F., Lever, A.F. (1990). Brief angiotensin converting enzyme inhibitor treatment in young spontaneously hypertensive rats reduces blood pressure long-term. *Hypertension* **16**: 603-614.
- Haslam, R.J., Davidson, M.M., Fox, J.E., Lynham, J.A. (1978). Cyclic nucleotides in platelet function. *Thromb. Haemost.* **40**: 232-240.
- Haulica, I., Neamtu, C., Petrescu, G., Cringu, A., Nacu, C., Topoliceanu, F., Lozneau, S. (1983). Possible opioid participation in the analgesic effect of the renin-angiotensin system. *Physiologie* **20**: 149-156.
- Haulica, I., Neamtu, C., Stratone, A., Petrescu, Gh. Branisteanu, D., Rosca, V., Slatineanu, S. (1986). Evidence for the involvement of cerebral renin-angiotensin system (RAS) in stress analgesia. *Pain* **27**: 237-245.
- Hayakawa, H., Raij, L. (1997). The link among nitric oxide synthase activity, endothelial function, and aortic and ventricular hypertrophy in hypertension. *Hypertension* **29**: 235-241.
- Headrick, J.P., Berne, R.M. (1990). Endothelium-dependent and -independent relaxations to adenosine in guinea pig aorta. *Am. J. Physiol.* **259**: H62-H67.
- Hein, T.W., Belardinelli, L., Kuo, L. (1999). Adenosine A_{2A} receptors mediate coronary microvascular dilation to adenosine: role of nitric oxide and ATP-sensitive potassium channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **291**: 655-664.

- Hein, T.W., Kuo, L. (1999). cAMP-independent dilation of coronary arterioles to adenosine. Role of nitric oxide, G proteins, and K_{ATP} channels. *Circ. Res.* **85**: 634-642.
- Henrion, D., Laher, I., Laporte, R., Bevan, J.A. (1992). Further evidence from an elastic artery that angiotensin II amplifies noradrenaline-induced contraction through activation of protein kinase C. *Eur. J. Pharmacol.* **224**: 13-20.
- Herlihy, J.T., Bockman, E.L., Berne, R.M., Rubio, R. (1976). Adenosine relaxation of isolated vascular smooth muscle. *Am. J. Physiol.* **230**: 1239-1243.
- Holmgren, M., Hedner, J., Mellstrand, T., Nordberg, G., Hedner, T. (1986). Characterization of the antinociceptive effects of some adenosine analogues in the rat. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **334**: 290-293.
- Holycross, B.J., Jackson, E.K. (1989). Adenosine-angiotensin II interactions. Part I. Role of adenosine in regulating angiotensin II-induced potentiation of noradrenergic neurotransmission and angiotensin II-induced vasoconstriction. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **250**: 433-441.
- Hoshino, J., Sakamaki, T., Nakamura, T., Kobayashi, M., Kato, M., Sakamoto, H., Kurashina, T., Yagi, A., Sato, K., Ono, Z. (1994). Exaggerated vascular response due to endothelial dysfunction and role of the renin-angiotensin system at early stage of renal hypertension in rats. *Circ. Res.* **74**: 130-138.
- Hunt, S.P., Pini, A., Evan, G. (1987). Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature* **328**: 632-634.
- Hutchinson, H.G., Trindade, P.T., Cunanan, D.B., Wu, C.F., Pratt, R.E. (1997). Mechanisms of natriuretic peptide-induced growth inhibition of vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc. Res.* **35**: 158-167.
- Ichikawa, M., Suzuki, H., Kumagai, K., Kumagai, H., Ryuzaki, M., Nishizawa, M., Saruta, T. (1995). Differential modulation of baroreceptor sensitivity by long-term antihypertensive treatment. *Hypertension* **26**: 425-431.
- Irvine, R.J., White, J.M., Head, R.J. (1995). The renin angiotensin system and nociception in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.* **56**: 1073-1078.
- Irvine, R.J., White, J.M. (1997). The effects of central and peripheral angiotensin on hypertension and nociception in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **57**: 37-41.
- Ito, S., Komatsu, K., Tsukamoto, K., Kanmatsuse, K., Sved, A.F. (2002). Ventrolateral medulla AT_1 receptors support blood pressure in hypertensive rats. *Hypertension* **40**: 552-559.
- Ito, S., Hiratsuka, M., Komatsu, K., Tsukamoto, K., Kanmatsuse, K., Sved, A.F. (2003). Ventrolateral medulla AT_1 receptors support arterial pressure in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension* **41**: 744-750.

- Iwai, N., Inagami, T. (1992). Identification of two subtypes in the rat type I angiotensin II receptor. *FEBS Lett.* **298**: 257-260.
- Jackson, E.K., Campbell, W.B. (1981). A possible antihypertensive mechanism of propranolol: antagonism of angiotensin II enhancement of sympathetic nerve transmission through prostaglandins. *Hypertension* **3**: 23-33.
- Jackson, E.K. (1987). Role of adenosine in noradrenergic neurotransmission in spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Physiol.* **253**: H909-H918.
- Jackson, E.K. (1991). Adenosine: A physiological brake on renin release. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **31**: 1-35.
- Jackson, E.K., Herzer, W.A., Kuan, C.-J. (1994). Role of adenosine in noradrenergic neurotransmission during hemorrhagic hypotension. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **270**: 589-594.
- Jackson, E.K., Herzer, W.A., Kost, C.K., Vyas, S.J. (2001). Enhanced interaction between renovascular α_2 -adrenoceptors and angiotensin II receptors in genetic hypertension. *Hypertension* **38**: 353-360.
- Johansson, B. (1976). Structural and functional changes in rat portal veins after experimental portal hypertension. *Acta Physiol. Scand.* **98**: 381-383.
- Jones, D.W., Hall, J.E. (2004). Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure and evidence from new hypertension trials. *Hypertension* **43**: 1-3.
- Jonzon, B., Nilsson, J., Fredholm, B.B. (1985). Adenosine receptor-mediated changes in cyclic AMP production and DNA synthesis in cultured arterial smooth muscle cells. *J. Cell Physiol.* **124**: 451-456.
- Kahonen, M., Mäyänen, H., Arvola, P., Porsti, I. (1994). Enhancement of arterial relaxation by long-term atenolol treatment in spontaneously hypertensive rats. *Br. J. Pharmacol.* **112**: 925-933.
- Kaneko, S., Mori, A., Tamura, S., Satoh, M., Takagi, H. (1985). Intracerebroventricular administration of angiotensin II attenuates morphine-induced analgesia in mice. *Neuropharmacology* **24**: 1131-1134.
- Karoon, P., Rubino, A., Burnstock, G. (1995). Enhanced sympathetic neurotransmission in the tail artery of 1,3-dipropyl-8-sulphophenylxanthine (DPSPX)-treated rats. *Br. J. Pharmacol.* **116**: 1918-1922.
- Katahira, K., Mikami, H., Otsuka, A., Moriguchi, A., Kohara, K., Higashimori, K., Okuda, N., Nagano, M., Morishita, R., Ogihara, T. (1994). Differential control of vascular tone and heart rate by different amino acid neurotransmitters in the rostral ventrolateral medulla of the rat. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **21**: 545-556.
- Kawasaki, H., Cline, W.H., Su, C. (1982). Enhanced angiotensin-mediated facilitation of adrenergic neurotransmission in spontaneously hypertensive rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **221**: 112-116.

- Khairallah, P.A. (1972). Action of angiotensin on adrenergic nerve endings: inhibition of norepinephrine uptake. *Fed. Proc.* **31**: 1351-1357.
- Komuro, I., Kurihara, H., Sugiyama, T., Yoshizumi, M., Takaku, F., Yazaki, Y. (1988). Endothelin stimulates c-fos and c-myc expression and proliferation of vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* **238**: 249-252.
- Konishi, C., Naito, Y., Saito, Y., Ohara, N., Ono, H. (1997). Age-related differences and roles of endothelial nitric oxide and prostanoids in angiotensin II responses of isolated, perfused mesenteric arteries and veins of rats. *Eur. J. Pharmacol.* **320**: 175-181.
- Kost, C.K., Herzer, W.A., Li, P., Jackson, E.K. (1994). Vascular reactivity to angiotensin II is selectively enhanced in the kidneys of spontaneously hypertensive rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **269**: 82-88.
- Kreulen, D.L. (1986). Activation of mesenteric arteries and veins by preganglionic and postganglionic nerves. *Am. J. Physiol.* **251**: H1267-H1275.
- Kuan, C.-J., Jackson, E.K. (1988). Role of adenosine in noradrenergic neurotransmission. *Am. J. Physiol.* **255**: H386-H393.
- Kuan, C.-J., Wells, J.N., Jackson, E.K. (1990). Endogenous adenosine restrains renin release in conscious rats. *Circ. Res.* **66**: 637-646.
- Kubalak, S.W., Webb, J.G. (1993). Angiotensin II enhancement of hormone-stimulated cAMP formation in cultured vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* **264**: H86-H96.
- Kubo, T., Su, C. (1983). Effects of adenosine on [³H]norepinephrine release from perfused mesenteric arteries of SHR and renal hypertensive rats. *Eur. J. Pharmacol.* **87**: 349-352.
- Langer, S.Z. (1997). 25 years since the discovery of presynaptic receptors: present knowledge and future perspectives. *Trends Pharmacol. Sci.* **18**: 95-99.
- Laubie, M., Schmitt, H. (1980). Action of the morphinometric agent, fentanyl, on the nucleus tractus solitarius and the nucleus ambiguus cardiovascular neurons. *Eur. J. Pharmacol.* **67**: 403-412.
- Ledent, C., Vaugeois, J.M., Schiffmann, S.N., Pedrazzini, T., El Yacoubi, M., Vanderhaeghen, J.J., Costentin, J., Heath, J.K., Vassart, G., Parmentier, M. (1997). Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A_{2a} receptor. *Nature* **388**: 674-678.
- Lee, R. (1985). Vascular changes at the prehypertensive phase in the mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. *Blood Vessels* **22**: 105-126.
- Lee, R. (1987). Structural alterations of blood vessels in hypertensive rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **65**: 1528-1535.

- Lee, R.M.K.W., Triggle, C.R., Cheung, D.W.T., Coughlin, M.D. (1987). Structural and functional consequence of neonatal sympathectomy on the blood vessels of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 10: 328-338.
- Lever, A.F. (1986). Slow pressor mechanisms in hypertension: a role for hypertrophy of resistance vessels? *J. Hypertens.* 4: 515-524.
- Levy, B.I., Benessiano, J., Henrion, D., Caputo, L., Heymes, C., Duriez, M., Poitevin, P., Samuel, J.L. (1996). Chronic blockade of AT₂-subtype receptors prevents the effect of angiotensin II on the rat vascular structure. *J. Clin. Invest.* 98: 418-425.
- Li, J-S., Sharifi, A.M., Schiffrin, E.L. (1997). Effect of AT₁ angiotensin-receptor blockade on structure and function of small arteries in SHR. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 30: 75-83.
- Lima, D., Avelino, A., Coimbra, A. (1993). Differential activation of c-fos in spinal neurones by distinct classes of noxious stimuli. *Neuroreport* 4: 747-750.
- Lind, R.W., Swanson, L.W., Ganten, D. (1985). Organization of angiotensin II immunoreactive cells and fibers in the rat central nervous system. An immunohistochemical study. *Neuroendocrinology* 40: 2-24.
- Liu, J.L., Bishop, S.P., Overbeck, H.W. (1988). Morphometric evidence for non-pressure-related arterial wall thickening in hypertension. *Circ. Res.* 62: 1001-1010.
- Ljung, B., Jandhyala, B., Kjellstedt, A. (1981). Angiotensin I converting enzyme activity in portal vein studied in normotensive rats and in models of primary and secondary hypertension. *Acta Physiol. Scand.* 111: 409-416.
- Lund-Johansen, P., Omvik, P. (1991). Acute and chronic hemodynamic effects of drugs with different actions on adrenergic receptors: a comparison between alpha blockers and different types of beta blockers with and without vasodilating effect. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 5: 605-616.
- Lyall, F., Morton, J.J., Lever, A.F., Cragoe, E.J. (1988). Angiotensin II activates Na⁺-H⁺ exchange and stimulates growth in cultured vascular smooth muscle cells. *J. Hypertens. Suppl.* 6: S438-S441.
- Malik, K.U., Nasjletti, A. (1976). Facilitation of adrenergic transmission by locally generated angiotensin II in rat mesenteric arteries. *Circ. Res.* 38: 26-30.
- Man in't Veld, A.J., Schalekamp, M.A. (1983a). Haemodynamic consequences of intrinsic sympathomimetic activity in relation to changes in plasma renin activity and noradrenaline during beta-blocker therapy for hypertension. *Postgrad. Med. J.* 59: 140-158.

- Man in't Veld, A.J., Schalekamp, M.A. (1983b). On the antihypertensive mechanisms of beta-adrenoceptor antagonists in relation to intrinsic sympathomimetic activity, cardioselectivity and hydrophilicity. *J. Pharmacol.* **14**: 69-104.
- Mancia, G., Ludbrook, J., Ferrari, A., Gregorini, L., Zanchetti, A. (1978). Baroreceptor reflexes in human hypertension. *Circ. Res.* **43**: 170-177.
- Mancia, G., Grassi, G., Parati, G., Zanchetti, A. (1997). The sympathetic nervous system in human hypertension. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* **640**: 117-121.
- Martin, P.L., Potts, A.A. (1994). The endothelium of the rat renal artery plays an obligatory role in A2 adenosine receptor-mediated relaxation induced by 5'-N-ethylcarboxamidoadenosine and N6-cyclopentyladenosine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **270**: 893-899.
- Matias, A., Albino-Teixeira, A., Polónia, J., Azevedo, I. (1991). Long-term administration of 1,3-dipropyl-8-sulphophenylxanthine causes arterial hypertension. *Eur. J. Pharmacol.* **193**: 101-104.
- McCubbin, J.W., DeMoura, R.S., Page, I.H., Olmsted, F. (1965). Arterial hypertension elicited by subpressor amounts of angiotensin. *Science* **149**: 1394-1395.
- Mendelsohn, F.A., Quirion, R., Saavedra, J.M., Aguilera, G., Catt, K.J. (1984). Autoradiographic localization of angiotensin II receptors in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**: 1575-1579.
- Menetrey, D., Giesler, G.J.Jr., Besson, J.M. (1977). An analysis of response properties of spinal cord dorsal horn neurones to nonnoxious and noxious stimuli in the spinal rat. *Exp. Brain Res.* **27**: 15-33.
- Morato, M., Sousa, T., Guimarães, S., Moura, D., Albino-Teixeira, A. (2002). The role of angiotensin II in hypertension due to adenosine receptors blockade. *Eur. J. Pharmacol.* **455**: 135-141.
- Morato, M., Sousa, T., Guimarães, S., Moura, D., Albino-Teixeira, A. (2003). Losartan and atenolol on hypertension induced by adenosine receptor blockade. *Auton. Autacoid Pharmacol.* **23**: 133-140.
- Moreno, L., Martínez-Cuesta, M.A., Piqué, J.M., Bosch, J., Esplugues, J.V. (1996). Anatomical differences in responsiveness to vasoconstrictors in the mesenteric veins from normal and portal hypertensive rats. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **354**: 474-480.
- Mota, A., Paiva, M.Q., Moura, D., Guimarães, S. (2000). Lack of interaction between α_2 -autoreceptors and prejunctional receptors mediating a facilitatory effect on noradrenaline release. *Pharmacol. Res.* **42**: 383-387.

- Mota, A., Guimarães, S. (2002). Interaction between α_2 -autoreceptors and receptors mediating the effects of angiotensin II and bradykinin in the heart of newborn rats. *Eur. J. Pharmacol.* **453**: 265-270.
- Mota, A., Guimarães, S. (2003). Influence of α_2 -autoreceptor stimulation on the facilitation by angiotensin II and bradykinin of noradrenaline release. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **368**: 443-447.
- Moura, D., Pinheiro, H., Paiva, M.Q., Guimarães, S. (1999). Prejunctional effects of angiotensin II and bradykinin in the heart and blood vessels. *J. Auton. Pharmacol.* **19**: 321-325.
- Mulvany, M.J., Halpern, W. (1976). Mechanical properties of vascular smooth muscle cells in situ. *Nature* **260**: 617-619.
- Mulvany, M.J., Hansen, P.K., Aalkjaer, C. (1978). Direct evidence that the greater contractility of resistance vessels in spontaneously hypertensive rats is associated with a narrowed lumen, a thickened media, and an increased number of smooth muscle cell layers. *Circ. Res.* **43**: 854-863.
- Mulvany, M.J., Ljung, B., Stoltze, M., Kjellstedt, A. (1980). Contractile and morphological properties of the portal vein in spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Blood Vessels* **17**: 202-215.
- Muratani, H., Averill, D.B., Ferrario, C.M., (1991). Effect of angiotensin II in ventrolateral medulla of spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Physiol.* **260**: R977-R984.
- Murphy, A.Z., Ennis, M., Shipley, M.T., Behbehani, M.M. (1994). Directionally specific changes in arterial pressure induce differential patterns of Fos expression in discrete areas of the brainstem: a double-labeling study for Fos and catacholamines. *J. Comp. Neurol.* **349**: 36-50.
- Nakada, T., Kubota, Y., Suzuki, H., Sasagawa, I., Watanabe, M., Ishigooka, M. (1996). Suppression of sympathetic nervous system attenuates the development of two-kidney, one-clip Goldblatt hypertension. *J. Urol.* **156**: 1480-1484.
- Nakamaru, M., Jackson, E.K., Inagami, T. (1986). Beta-adrenoceptor-mediated release of angiotensin II from mesenteric arteries. *Am. J. Physiol.* **250**: H144-H148.
- Nap, A., Balt, J.C., Mathy, M.-J., Pfaffendorf, M., van Zwieten, P.A. (2004). Different AT₁ receptor subtypes at pre- and postjunctional sites: AT_{1A} versus AT_{1B} receptors. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **43**: 14-20.
- Nees, S., Herzog, V., Becker, B.F., Bock, M., Des Rosiers, Ch., Gerlach, E. (1985). The coronary endothelium: a highly active metabolic barrier for adenosine. *Basic Res. Cardiol.* **80**: 515-529.

- Nilsson, O.R., Karlberg, B.E., Ohlsson, O., Thulin, T., Tolagen, K. (1979). Atenolol administered once daily in primary hypertension. Effects on blood pressure in relation to pre-treatment plasma renin activity. *Acta Med. Scand.* **206**: 303-308.
- Nishida, Y., Ding, J., Zhou, M-S., Chen, Q-H., Murakami, H., Wu, X-Z., Kosaka, H. (1998). Role of nitric oxide in vascular hyper-responsiveness to norepinephrine in hypertensive Dahl rats. *J. Hypertens.* **16**: 1611-1618.
- Ohlstein, E.H., Brooks, D.P., Feuerstein, G.Z., Ruffolo, R.R.Jr. (1997). Inhibition of sympathetic outflow by the angiotensin II receptor antagonist, eprosartan, but not by losartan, valsartan or irbesartan: relationship to differences in prejunctional angiotensin II receptor blockade. *Pharmacology* **55**: 244-251.
- Olsson, R.A., Davis, C.C., Khouri, E.M. (1977). Coronary vasoactivity of adenosine covalently linked to polylysine. *Life Sci.* **21**: 1343-1350.
- Osswald, H., Schmitz, H.J., Kemper, R. (1978). Renal action of adenosine: effect on renin secretion in the rat. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **303**: 95-99.
- Otsuka, S., Sugano, M., Makino, N., Sawada, S., Hata, T., Niho, Y. (1998). Interaction of mRNAs for angiotensin II type 1 and type 2 receptors to vascular remodeling in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **32**: 467-472.
- Owens, G.K., Rabinovitch, P.S., Schwartz, S.M. (1981). Smooth muscle cell hypertrophy versus hyperplasia in hypertension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**: 7759-7763.
- Owens, G.K., Schwartz, S.M. (1983). Vascular smooth muscle cell hypertrophy and hyperploidy in the Goldblatt hypertensive rat. *Circ. Res.* **53**: 491-501.
- Owens, G.K. (1985). Differential effects of antihypertensive drug therapy on vascular smooth muscle cell hypertrophy, hyperploidy, and hyperplasia in the spontaneously hypertensive rat. *Circ. Res.* **56**: 525-536.
- Owens, G.K., Geisterfer, A.A.T., Yang, Y.W-H., Komoriya, A. (1988). Transforming growth factor- β -induced growth inhibition and cellular hypertrophy in cultured vascular smooth muscle cells. *J. Cell Biol.* **107**: 771-780.
- Ozono, R., Wang, Z-Q., Moore, A.F., Inagami, T., Siragy, H.M., Carey, R.M. (1997). Expression of the subtype 2 angiotensin (AT₂) receptor protein in rat kidney. *Hypertension* **30**: 1238-1246.
- Page, G.D., France, C.R. (1997). Objective evidence of decreased pain perception in normotensives at risk for hypertension. *Pain* **73**: 173-180.

- Paiva, M.Q., Santos, M.J., Albino-Teixeira, A. (1997). Endothelium-dependent vascular responses in 1,3-dipropyl-8-sulphophenylxanthine (DPSPX) hypertensive rats. *J. Pharm. Pharmacol.* **49**: 74-77.
- Park, J.B., Schiffrin, E.L. (2000). Effects of antihypertensive therapy on hypertensive vascular disease. *Curr. Hypertens. Rep.* **2**: 280-288.
- Patel, J.M., Sekharam, K.M., Block, E.R. (1991). Angiotensin receptor-mediated stimulation of diacylglycerol production in pulmonary artery endothelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **5**: 321-327.
- Paxinos, G., Watson, C. (1998). The rat brain in stereotaxic coordinates (4^a ed.). Academic Press, San Diego.
- Peach, M.J. (1986). In *Kidney Hormones* (Fisher, J.W., ed.): 273-308; Academic Press, New York.
- Persson, M.G., Öhlén, A., Lindbom, L., Hedqvist, P., Gustafsson, L.E. (1991). Role of adenosine in functional hyperemia in skeletal muscle as indicated by pharmacological tools. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **343**: 52-57.
- Phillips, M.I. (1987). Functions of angiotensin in the central nervous system. *Annu. Rev. Physiol.* **49**: 413-435.
- Pinheiro, H., Moura, D., Albino-Teixeira, A., Alves, C., Torres, L., Guimarães, S. (2002). A comparison of AT₁ angiotensin II antagonists at pre- and postjunctional angiotensin II receptors of the rat tail artery. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **366**: 537-542.
- Plunkett, W.C., Overbeck, H.W. (1985). Increased arteriolar wall-to-lumen ratio in a normotensive vascular bed in coarctation hypertension. *Am. J. Physiol.* **249**: H859-H866.
- Potts, P.D., Hirooka, Y., Dampney, R.A.L. (1999). Activation of brain neurons by circulating angiotensin II: direct effects and baroreceptor-mediated secondary effects. *Neuroscience* **90**: 581-594.
- Qiu, H.Y., Henrion, D., Levy, B.I. (1994). Endogenous angiotensin II enhances phenylephrine-induced tone in hypertensive rats. *Hypertension* **24**: 317-321.
- Quyyumi, A.A., Dakak, N., Andrews, N.P., Gilligan, D.M., Panza, J.A., Cannon, R.O. (1995). Contribution of nitric oxide to metabolic coronary vasodilation in the human heart. *Circulation* **92**: 320-326.
- Ralevic, V., Rubino, A., Burnstock, G. (1996). Augmented sensory-motor vasodilatation of the rat mesenteric arterial bed after chronic infusion of the P₁-purinoceptor antagonist, DPSPX. *Br. J. Pharmacol.* **118**: 1675-1680.
- Randich, A., Robertson, J.D. (1994). Spinal nociceptive transmission in the spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto normotensive rat. *Pain* **58**: 169-183.

- Reams, G.P., Souther, M., Parisi, M., Van Stone, J.C., Bauer, J.H. (1989). Arterial-venous determinations of the "immunoreactive" angiotensin peptides in human subjects. *J. Lab. Clin. Med.* **113**: 749-752.
- Reddy, S.V.R., Maderdrut, J.L., Yaksh, T.L. (1980). Spinal cord pharmacology of adrenergic agonist-mediated antinociception. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **213**: 525-533.
- Reid, I.A. (1984). Actions of angiotensin II on the brain: mechanisms and physiologic role. *Am. J. Physiol.* **246**: F533-F543.
- Richardt, G., Waas, W., Kranzhofer, R., Cheng, B., Lohse, M.J., Schömig, A. (1989). Interaction between the release of adenosine and noradrenaline during sympathetic stimulation: a feed-back mechanism in rat heart. *J. Mol. Cell Cardiol.* **21**: 269-277.
- Rodrigo, E., Maeso, R., Muñoz-García, R., Navarro-Cid, J., Ruilope, L.M., Cachofeiro, V., Lahera, V. (1997). Endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats: consequences of chronic treatment with losartan or captopril. *J. Hypertens.* **15**: 613-618.
- Roth, R.H. (1972). Action of angiotensin on adrenergic nerve endings: enhancement of norepinephrine biosynthesis. *Fed. Proc.* **31**: 1358-1364.
- Rubino, A., Burnstock, G. (1995). Changes in sympathetic neurotransmission and adrenergic control of cardiac contractility during 1,3-dipropyl-8-sulfophenylxanthine-induced hypertension. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **275**: 422-428.
- Saigusa, T., Iriki, M., Arita, J. (1996). Brain angiotensin II tonically modulates sympathetic baroreflex in rabbit ventrolateral medulla. *Am. J. Physiol.* **271**: H1015-H1021.
- Saino, A., Pomidossi, G., Perondi, R., Valentini, R., Rimini, A., Di Francesco, L., Mancina, G. (1997). Intracoronary angiotensin II potentiates coronary sympathetic vasoconstriction in humans. *Circulation* **96**: 148-153.
- Salter, M.W., Henry, J.L. (1987). Evidence that adenosine mediates the depression of spinal dorsal horn neurons induced by peripheral vibration in the cat. *Neuroscience* **22**: 631-650.
- Saris, J.J., van Dijk, M.A., Kroon, I., Schalekamp, M.A.D.H., Danser, A.H.J. (2000). Functional importance of angiotensin-converting enzyme-dependent in situ angiotensin II generation in the human forearm. *Hypertension* **35**: 764-768.
- Sarmiento, A., Soares-da-Silva, P., Albino-Teixeira, A., Azevedo, I. (1987). Effects of denervation induced by 6-hydroxydopamine on cell nucleus activity of arterial and cardiac cells of the dog. *J. Auton. Pharmacol.* **7**: 119-126.

- Sawynok, J., Liu, X.J. (2003). Adenosine in the spinal cord and periphery: release and regulation of pain. *Prog. Neurobiol.* **69**: 313-340.
- Schafer, M., Ponicke, K., Heinroth-Hoffmann, I., Brodde, O.E., Piper, H.M., Schluter, K.D. (2001). Beta-adrenoceptor stimulation attenuates the hypertrophic effect of alpha-adrenoceptor stimulation in adult rat ventricular cardiomyocytes. *J. Am. Coll. Cardiol.* **37**: 300-307.
- Schelling, P., Hutchinson, J.S., Ganten, U., Sponer, G., Ganten, D. (1976). Impermeability of the blood-cerebrospinal fluid barrier for angiotensin II in rats. *Clin. Sci. Mol. Med. Suppl.* **3**: 399s-402s.
- Schiffrin, E.L., Deng, L-Y. (1995). Comparison of effects of angiotensin I-converting enzyme inhibition and β -blockade for 2 years on function of small arteries from hypertensive patients. *Hypertension* **25**: 699-703.
- Schiffrin, E.L., Park, J.B., Intengan, H.D., Touyz, R.M. (2000). Correction of arterial structure and endothelial dysfunction in human essential hypertension by the angiotensin receptor antagonist losartan. *Circulation* **101**: 1653-1659.
- Schwarcz, R., Whetsell, W.O.Jr., Mangano, R.M. (1983). Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. *Science* **219**: 316-318.
- Scott-Burden, T., Hahn, A.W., Resink, T.J., Buhler, F.R. (1990). Modulation of extracellular matrix by angiotensin II: stimulated glycoconjugate synthesis and growth in vascular smooth muscle cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **16**: S36-S41.
- Shibata, S., Kurahashi, K., Kuchii, M. (1973). A possible etiology of contractility impairment of vascular smooth muscle from spontaneously hypertensive rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **185**: 406-417.
- Sihm, I., Schroeder, A.P., Aalkjaer, C., Holm, M., Morn, B., Mulvany, M., Thygesen, K., Pedersen, O.I. (1994). Normalization of resistance artery structure and left ventricular morphology with a perindopril-based regimen. *Can. J. Cardiol.* **10**: 30D-32D.
- Silver, P.J., Walus, K., DiSalvo, J. (1984). Adenosine-mediated relaxation and activation of cyclic AMP-dependent protein kinase in coronary arterial smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **228**: 342-347.
- Simon, G. (1992). Stimulation of vascular Na-K pump with subpressor angiotensin II in rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **199**: 424-431.
- Simon, G., Altman, S. (1992). Subpressor angiotensin II is a bifunctional growth factor of vascular muscle in rats. *J. Hypertens.* **10**: 1165-1171.
- Simon, G., Csiky, B. (1998). Effect of neonatal sympathectomy on the development of structural vascular changes in angiotensin II-treated rats. *J. Hypertens.* **16**: 77-84.

- Simon, G., Illyes, G., Csiky, B. (1998). Structural vascular changes in hypertension: role of angiotensin II, dietary sodium supplementation, blood pressure, and time. *Hypertension* **32**: 654-660.
- Siragy, H.M., de Gasparo, M., Carey, R.M. (2000). Angiotensin type 2 receptor mediates valsartan-induced hypotension in conscious rats. *Hypertension* **35**: 1074-1077.
- Sitsen, J.M., de Jong, W. (1983). Hypoalgesia in genetically hypertensive rats (SHR) is absent in rats with experimental hypertension. *Hypertension* **5**: 185-190.
- Sitsen, J.M., de Jong, W. (1984). Observations on pain perception and hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Clin. Exp. Hypertens. A* **6**: 1345-1356.
- Sneddon, P., Burnstock, G. (1984). ATP as a co-transmitter in rat tail artery. *Eur. J. Pharmacol.* **106**: 149-152.
- Sollevi, A. (1997). Adenosine for pain control. *Acta Anaesthesiol. Scand. Suppl.* **110**: 135-136.
- Sousa, T., Morato, M., Albino-Teixeira, A. (2002). Angiotensin converting enzyme inhibition prevents trophic and hypertensive effects of an antagonist of adenosine receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **441**: 99-104.
- Starke, K., Schumann, H.J. (1972). Interactions of angiotensin, phenoxybenzamine and propranolol on noradrenaline release during sympathetic nerve stimulation. *Eur. J. Pharmacol.* **18**: 27-30.
- Stone, T.W., Perkins, M.N. (1981). Quinolinic acid: a potent endogenous excitant at amino acid receptors in CNS. *Eur. J. Pharmacol.* **72**: 411-412.
- Storgaard, T., Nedergaard, O.A. (1997). Prejunctional modulation by angiotensins of noradrenaline release from sympathetic neurons in isolated rabbit aorta. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **356**: 706-711.
- Stuart, W.D., Maeda, S., Khera, P., Fagin, J.A., Clemens, T.L. (2000). Parathyroid hormone-related protein induces G1 phase growth arrest of vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **279**: E60-E67.
- Su, C. (1978). Purinergic inhibition of adrenergic transmission in rabbit blood vessels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **204**: 351-361.
- Su, C., Kubo, T. (1984). Alpha-adrenoceptor- and prostaglandin-mediated modulation of vascular adrenergic neurotransmission in spontaneously hypertensive rats. *Jpn. J. Pharmacol.* **34**: 457-463.
- Sutter, M.C., Ljung, B. (1977). Contractility, muscle mass and agonist sensitivity of isolated portal veins from normo- and hypertensive rats. *Acta Physiol. Scand.* **99**: 484-495.

- Sybertz, E.J., Peach, M.J. (1980). In vitro neurogenic and musculotropic responses to angiotensin peptides in normal and sodium-restricted rabbits. *Circ. Res.* **46**: 836-842.
- Taddei, S., Favilla, S., Duranti, P., Simonini, N., Salvetti, A. (1991). Vascular renin-angiotensin system and neurotransmission in hypertensive persons. *Hypertension* **18**: 266-277.
- Taddei, S., Arzilli, F., Arrighi, P., Salvetti, A. (1992). Dipyridamol decreases circulating renin-angiotensin system activity in hypertensive patients. *Am. J. Hypertens.* **5**: 29-31.
- Taddei, S., Salvetti, A. (1992). Vascular tissue renin-angiotensin system in hypertensive humans. *J. Hypertens. Suppl.* **10**: S165-S172.
- Taddei, S., Virdis, A., Mattei, P., Favilla, S., Salvetti, A. (1995). Angiotensin II and sympathetic activity in sodium-restricted essential hypertension. *Hypertension* **25**: 595-601.
- Tagawa, H., Vander, A.J. (1970). Effects of adenosine compounds on renal function and renin secretion in dogs. *Circ. Res.* **26**: 327-338.
- Takai, S., Song, K., Tanaka, T., Okunishi, H., Miyazaki, M. (1996). Antinociceptive effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors and an angiotensin II receptor antagonist in mice. *Life Sci.* **59**: PL331-PL336.
- Takeshita, A., Imaizumi, T., Ashihara, T., Yamamoto, K., Hoka, S., Nakamura, M. (1982). Limited maximal vasodilator capacity of forearm resistance vessels in normotensive young men with a familial predisposition to hypertension. *Circ. Res.* **50**: 671-677.
- Takeshita, A., Tanaka, S., Kuroiwa, A., Nakamura, M. (1975). Reduced baroreceptor sensitivity in borderline hypertension. *Circulation* **51**: 738-742.
- Tallant, E.A., Clark, M.A. (2003). Molecular mechanisms of inhibition of vascular growth by angiotensin-(1-7). *Hypertension* **42**: 574-579.
- Taniyama, Y., Griendling, K.K. (2003). Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension* **42**: 1075-1081.
- Taubman, M.B., Berk, B.C., Izumo, S., Tsuda, T., Alexander, R.W., Nadalginard, B. (1989). Angiotensin II induces c-fos mRNA in aortic smooth muscle. *J. Biol. Chem.* **264**: 526-530.
- Tavares, I., Lima, D., Coimbra, A. (1993). Neurons in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord projecting to the medullary ventrolateral reticular formation express c-fos after noxious stimulation of the skin. *Brain Res.* **623**: 278-286.

- Tavares, I., Albino-Teixeira, A., Lima, D. (1995). Hypertension inhibits noxious-evoked c-fos expression in the rat spinal cord. *Neuroreport* **6**: 1664-1668.
- Tavares, I., Almeida, A., Albino-Teixeira, A., Lima, D. (1997). Lesions of the caudal ventrolateral medulla block the hypertension-induced inhibition of noxious-evoked c-fos expression in the rat spinal cord. *Eur. J. Pain* **1**: 149-160.
- Taylor, B.K., Roderick, R.E., Lezin, E.St., Basbaum, A.I. (2001). Hypoalgesia and hyperalgesia with inherited hypertension in the rat. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **280**: R345-R354.
- Tea, B-S., Der Sarkissian, S., Touyz, R.M., Hamet, P., deBlois, D. (2000). Proapoptotic and growth-inhibitory role of angiotensin II type 2 receptor in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats in vivo. *Hypertension* **35**: 1069-1073.
- Thurston, C.L., Randich, A. (1990). Acute increases in arterial blood pressure produced by occlusion of the abdominal aorta induces antinociception: peripheral and central substrates. *Brain Res.* **519**: 12-22.
- Thurston, H., Laragh, J.H. (1975). Prior receptor occupancy as a determinant of the pressor activity of infused angiotensin II in the rat. *Circ. Res.* **36**: 113-117.
- Timmermans, P.B.M.W.M., Wong, P.C., Chiu, A.T., Herblin, W.F., Benfield, P., Carini, D.J., Lee, R.J., Wexler, R.R., Saye, J.A.M. Smith, R.D. (1993). Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol. Rev.* **45**: 205-251.
- Tofovic, S.P., Branch, K.R., Oliver, R.D., Magee, W.D., Jackson, E.K. (1991). Caffeine potentiates vasodilator-induced renin release. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **256**: 850-860.
- Toma, N., Sgambato, V., Couture, R. (1997). Effect of angiotensin II on a spinal nociceptive reflex in the rat: receptor and mechanism of action. *Life Sci.* **61**: 503-513.
- Touyz, R.M., Endemann, D., He, G., Li, J-S., Schiffrin, E.L. (1999). Role of AT₂ receptors in angiotensin II-stimulated contraction of small mesenteric arteries in young SHR. *Hypertension* **33**: 366-372.
- Trendelenburg, A-U., Meyer, A., Klebroff, W., Guimarães, S., Starke, K. (2003). Crosstalk between presynaptic angiotensin receptors, bradykinin receptors and α_2 -autoreceptors in sympathetic neurons: a study in α_2 -adrenoceptor-deficient mice. *Br. J. Pharmacol.* **138**: 1389-1402.
- Tschudi, M.R., Mesaros, S., Lüscher, T.F., Malinski, T. (1996). Direct in situ measurement of nitric oxide in mesenteric resistance arteries. *Hypertension* **27**: 32-35.

- Tseng, H., Berk, B.C. (1992). The Na/K/2Cl cotransporter is increased in hypertrophied vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **267**: 8161-8167.
- Urabe, M., Su, C., Lee, T.J-F. (1987). Pre- and postsynaptic effects of angiotensin in the femoral artery of spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Blood Vessels* **24**: 1-10.
- Wang, D.H., Prewitt, R.L. (1990). Captopril reduces aortic and microvascular growth in hypertensive and normotensive rats. *Hypertension* **15**: 68-77.
- Warner, T.D. (1990). Simultaneous perfusion of rat isolated superior mesenteric arterial and venous beds: comparison of their vasoconstrictor and vasodilator responses to agonists. *Br. J. Pharmacol.* **99**: 427-433.
- Warshaw, D.M., Mulvany, M.J., Halpern, W. (1979). Mechanical and morphological properties of arterial resistance vessels in young and old spontaneously hypertensive rats. *Circ. Res.* **45**: 250-259.
- Warshaw, D.M., Root, D.T., Halpern, W. (1980). Effects of antihypertensive drug therapy on the morphology and mechanics of resistance arteries from spontaneously hypertensive rats. *Blood Vessels* **17**: 257-270.
- Weibel, E.R. (1972). A stereological method for estimating volume and surface of sarcoplasmic reticulum. *J. Microsc.* **95**: 229-242.
- Wiklund, N.P., Cederqvist, B., Gustafsson, L.E. (1989). Adenosine enhancement of adrenergic neuroeffector transmission in guinea-pig pulmonary artery. *Br. J. Pharmacol.* **96**: 425-433.
- Willete, R.N., Barcas, P.P., Krieger, A.J., Sapru, H.N. (1983). Vasopressor and depressor areas in the rat medulla. Identification by microinjection of L-glutamate. *Neuropharmacology* **22**: 1071-1079.
- Xu, L., Brooks, V.L. (1997). Sodium intake, angiotensin II receptor blockade, and baroreflex function in conscious rats. *Hypertension* **29**: 450-457.
- Yau, L., Zahradka, P. (2003). PGE(2) stimulates vascular smooth muscle cell proliferation via the EP2 receptor. *Mol. Cell Endocrinol.* **203**: 77-90.
- Yen, M.H., Wu, C.C., Chiou, W.F. (1988). Partially endothelium-dependent vasodilator effect of adenosine in rat aorta. *Hypertension* **11**: 514-518.
- Yu, S-M., Tsai, S-Y., Guh, J-H., Ko, F-N., Teng, C-M., Ou J.T. (1996). Mechanisms of catecholamine-induced proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circulation* **94**: 547-554.
- Zamir, N., Segal, M. (1979). Hypertension-induced analgesia: changes in pain sensitivity in experimental hypertensive rats. *Brain Res.* **160**: 170-173.
- Zamir, N., Shuber, E. (1980). Altered pain perception in hypertensive humans. *Brain Res.* **201**: 471-474.

- Zamir, N., Simantov, R., Segal, M. (1980). Pain sensitivity and opioid activity in genetically and experimentally hypertensive rats. *Brain Res.* **184**: 299-310.
- Zhou, X.J., Schluter, K.D., Piper, H.M. (1996). Hypertrophic responsiveness to beta 2-adrenoceptor stimulation on adult ventricular cardiomyocytes. *Mol. Cell Biochem.* **163-164**: 211-216.
- Zimmerman, B.G., Gomer, S.K., Liao, J.C. (1972). Action of angiotensin on vascular adrenergic nerve endings : facilitation of norepinephrine release. *Fed. Proc.* **31**: 1344-1350.
- Zimmerman, J.B., Robertson, D., Jackson, E.K. (1987). Angiotensin II-noradrenergic interactions in renovascular hypertensive rats. *J. Clin. Invest.* **80**: 443-457.