

Papel del sistema renina angiotensina en la respuesta simpática inducida por la prueba presora al frío en humanos.

Lida Esther Zavała¹, María Cierco¹, Antonio Gutiérrez², María del Rosario Garrido³ y Anita Israel³.

¹Unidad de Investigaciones Farmacológicas y Toxicológicas, Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda, ²Hospital Universitario "Alfredo Van Grieken". Coro, Venezuela y ³Laboratorio de Neuropeptidos, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
Correo electrónico: astern88@hotmail.com

Palabras clave: Losartan, eprosartan, valsartan, antagonistas AT₁ de angiotensina, prueba presora al frío.

Resumen. El objetivo del presente estudio fue evaluar el papel del receptor AT₁ de la angiotensina sobre la respuesta simpática inducida por la prueba presora al frío (PPF), en voluntarios sanos. Se incluyeron 82 sujetos sanos, en un estudio doble ciego controlado con placebo. Se determinaron los valores de la presión arterial y la frecuencia cardíaca, antes y 175 minutos después de la administración oral única de placebo, losartan (50 mg), valsartan (80 mg) o eprosartan (600 mg). Inmediatamente después, los sujetos fueron sometidos a la prueba presora al frío (PPF), midiéndose los mismos parámetros hemodinámicos. La PPF incrementó la presión arterial sistólica, diastólica y media así como la frecuencia cardíaca en el grupo placebo. El pretratamiento con losartan, valsartan o eprosartan bloqueó la respuesta presora a la PPF sin producir cambios en la respuesta de frecuencia cardíaca. Nuestros resultados demuestran que la angiotensina II endógena, a través del receptor AT₁, contribuye a la respuesta al estrés mediada simpáticamente en humanos.

Role of the renin-angiotensin system on the sympathetic response induced by the cold pressor test in humans.

Invest Clín 2007; 48(2): 155 - 165

Key words: Losartan, eprosartan, valsartan, angiotensin II receptor antagonists, cold pressor test.

Abstract. The aim of this study was to evaluate the role of AT₁ angiotensin II receptor on the sympathetic response to the cold pressor test (CPT) in normotensive healthy volunteers. Eighty-two healthy volunteers were included in this double-blind, placebo-controlled study. Blood pressure and heart rate were determined before and one hundred and seventy five minutes after oral administration of placebo, losartan (50 mg), valsartan (80 mg) or eprosartan (600 mg). Immediately, the subjects underwent CPT and then the same hemodynamic parameters were measured. CPT increased arterial blood pressure (systolic, diastolic and mean) and HR in placebo-treated group. Pretreatment with a single dose of losartan, valsartan or eprosartan blunted CPT-induced pressor response, but not the rise in heart rate. Our results demonstrate that endogenous angiotensin II, through stimulation of AT₁ receptor, supports sympathetic mediated stress-response in humans.

Recibido: 11-11-2005. Aceptado: 20-07-2006.

INTRODUCCIÓN

Existe evidencia que demuestra la interrelación entre el sistema renina angiotensina (SRA) y la respuesta al estrés. En efecto, la secreción de renina, y en consecuencia, los niveles circulantes de angiotensina II (ANG II) están incrementados en un número de paradigmas de estrés (1, 2). El estrés aumenta los niveles circulantes de ANG II incrementando la secreción de renina a través de la estimulación simpática por medio de la activación del receptor β_1 adrenérgico. Además, la presencia de receptores de ANG II y de inmunoreactividad para ANG II en regiones relacionadas con la respuesta al estrés tanto en el sistema nervioso central como periférico, sugiere un papel de la ANG II en las respuestas neuroendocrinas y autonómicas al mismo (3-5). El estrés, incrementa la expresión de receptores AT₁ de angiotensina (RAT₁) en áreas cere-

brales cruciales para el control central de esta reacción, tales como el núcleo paraventricular del hipotálamo, la adenohipófisis y la médula suprarrenal (6, 7). Estos hallazgos indican que la ANG II media la regulación de la reacción al estrés a través de los RAT₁. Más aún, la ANG II ejerce sus efectos no sólo mediante su interacción con RAT₁ postsinápticos, sino también vía RAT₁ presinápticos; estos últimos se sabe que amplifican la liberación de norepinefrina de los terminales nerviosos simpáticos e incrementan su recaptación. La ANG II también estimula la capacidad de síntesis de catecolaminas e incluso a sus catalizadores biosintéticos como la enzima tirosina hidroxilasa, paso limitante en la producción de estos neurotransmisores. Entonces, la liberación amplificada de norepinefrina, a través de su unión al receptores α_1 adrenérgicos postsinápticos (8), aumenta la vasoconstricción. Por ello es lógico pensar que, los efectos de-

letéreos producto de la elevación en los niveles circulantes de ANG II, podrían ser tratados bloqueando los RAT₁ y en consecuencia reducir el eflujo simpático periférico.

Es bien conocido que la activación tanto del SRA como del sistema nervioso simpático (SNS) juega un papel importante en los procesos adaptativos cardiovasculares. Además, la acción de estos dos sistemas parece estar interrelacionada a varios niveles. Algunos estudios realizados en modelos animales apoyan la noción de que la ANG II está involucrada en la regulación del SNS y podría tener algún papel en las respuestas cardiovasculares al estrés (9, 10). Sin embargo, la evidencia experimental muestra que es mucho más difícil establecer tal interrelación en los humanos (11, 12). Se han utilizado varios inhibidores de la cascada del SRA para investigar las relaciones entre estos dos sistemas vasopresores (13). Por ejemplo, se han reportado resultados controversiales en relación a la influencia de los inhibidores de la enzima convertidora de ANG II (IECA) sobre los cambios reflejos mediados por vía simpática en estudios que utilizaron pruebas de ejercicio y la prueba presora al frío (PPF) (14-16). Tampoco la evidencia experimental producto de la evaluación del efecto de los antagonistas de los RAT₁ sobre la respuesta simpático-adrenal al estrés es concluyente. Así, se ha demostrado que el losartan no afecta la respuesta simpático-adrenal a la hipoglicemia inducida por insulina en humanos, en términos de liberación de epinefrina (17). Pero, en pacientes con insuficiencia cardiaca crónica, la administración de losartan fue capaz de reducir la respuesta hemodinámica y neurohumoral a la PPF (18). De aquí que la interrogante de si la ANG II endógena en humanos es capaz de influir en la respuesta cardiovascular a estímulos estresantes es aún materia de debate.

Por lo tanto, en este estudio se investigó la interrelación entre la estimulación del

SRA y el SNS, utilizando un modelo de estrés agudo aplicado a voluntarios sanos, con el objeto de precisar si la presencia de un SRA intacto es determinante para la respuesta simpática a la PPF, una prueba conocida de estrés agudo que se sabe que incrementa la actividad simpática, y que se refleja en incrementos de la presión arterial y la frecuencia cardiaca (19). Es razonable pensar que si la ANG II contribuye a la respuesta cardiovascular mediada por el sistema simpático en humanos, la interferencia del SRA a nivel de su receptor disminuiría la actividad simpática y en consecuencia la respuesta cardiovascular al estrés inducido por la PPF.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio experimental doble ciego y controlado con placebo. Se reclutaron 82 sujetos sanos determinado por la historia clínica y el examen físico completo antes de su ingreso. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Área Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional Experimental "Francisco de Miranda", UNEFM y llevado a cabo de acuerdo a los principios de la Declaración de Helsinki. Todos los participantes otorgaron el consentimiento informado previo.

Los sujetos fueron divididos en cuatro grupos a saber Grupo A: losartan (Cozaar®, DuPont-Merck) 50 mg VO (n = 14); Grupo B: valsartan (Diovan®, Novartis) 80 mg VO (n = 13); Grupo C: eprosartan (Teveten®, Solvay Pharma SA) 600 mg VO (n = 18) y Grupo D tratado con placebo 1 tableta VO (n = 37).

PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Todos los sujetos fueron evaluados en las mismas condiciones: en la mañana (8:00 a.m.) y en ayunas. Luego de vaciar la vejiga para evitar el incremento de la actividad de

los nervios simpáticos por distensión vesical (20), y de ser sometidos a 15 minutos de descanso en posición supina, se tomaron las mediciones basales de PA sistólica (PAS) y diastólica (PAD) con un esfigmomanómetro de mercurio colocado en el brazo izquierdo y la Frecuencia Cardíaca (FC) fue monitoreada con un oxímetro de pulso colocado en el dedo. Inmediatamente se administró una sola dosis oral de alguno de los tratamientos. Ciento setenta y cinco minutos después se midieron los mismos parámetros cardiovasculares y seguidamente se aplicó la PPF sumergiendo la mano derecha hasta la muñeca en agua helada por 2 minutos (21) e indicando a los participantes evitar sostener la respiración, la contracción isométrica o de realizar maniobras de Valsalva. La PA y FC fueron medidas nuevamente, una vez finalizada la PPF. La presión arterial media (PAM) fue calculada por la fórmula $PAM = PAD + 1/3 (PAS - PAD)$.

Todos los datos se expresan como la media \pm EEM. La significancia de las diferencias entre los grupos fue calculada por ANOVA de una vía o *t* pareado. Valores de $p < 0,05$ fueron considerados como estadísticamente significativos.

RESULTADOS

Los datos antropométricos de los sujetos estudiados se resumen en la Tabla I. La prueba presora al frío (PPF) se acompañó de un aumento significativo de la PAS, PAD, la PAM y la FC en el grupo placebo (Figs. 1, 2 y 3, Tabla II), con una distribución similar en la respuesta presora entre ambos sexos (Fig. 2). En la Fig. 1 se muestra el curso temporal de la respuesta cardíaca a la PPF, se destaca que la FC aumentó significativamente desde valores de $72,3 \pm 3$ latidos/minuto a un máximo de $82,3 \pm 4$ latidos /minuto (entre los 30 y 60 s), y luego disminuyó. El aumento en la PA (comparado con los valores basales) durante la PPF

TABLA I
PARÁMETROS ANTROPOMÉTRICOS DE LOS SUJETOS ESTUDIADOS

Parámetro	n	$\bar{X} \pm EEM$
Sexo		
Masculino	24	
Femenino	58	
Edad (años)		$26,5 \pm 0,9$
Peso (kg)		$64,2 \pm 1,5$
Talla (m)		$1,65 \pm 0,02$
IMC (kg/m ²)		$23,61 \pm 0,44$

$\bar{X} \pm EEM$: promedio más o menos error estándar de la media. IMC: índice de masa corporal.

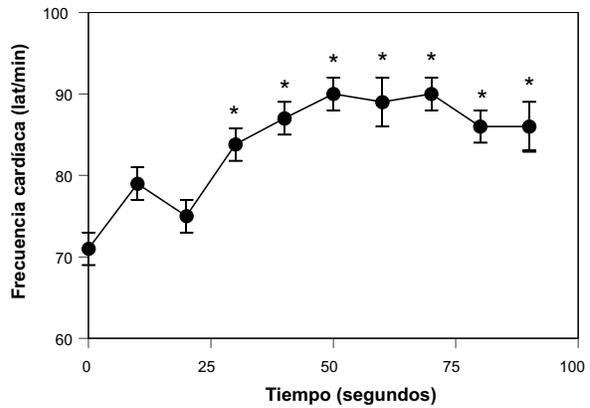


Fig. 1. Curso temporal de la frecuencia cardíaca frente a la prueba presora al frío en sujetos sanos. $p < 0,05$ comparado con basal.

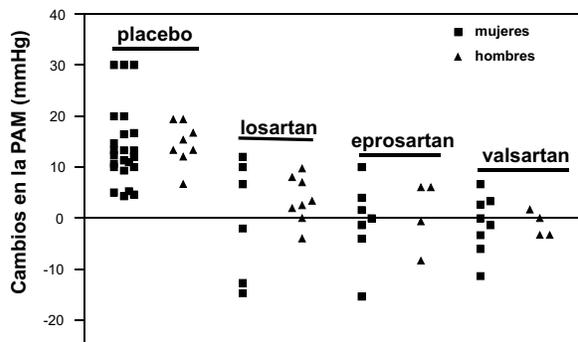


Fig. 2. Distribución de los incrementos individuales de la PAM durante la prueba presora al frío en voluntarios sanos tratados con placebo, losartan, eprosartan o valsartan.

TABLA II
EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE PLACEBO, LOSARTAN, VALSARTAN O EPROSARTAN
SOBRE LA RESPUESTA HEMODINÁMICA AL ESTRÉS POR FRÍO EN VOLUNTARIOS SANOS

	Valores basales antes del Tratamiento			0 min PPF			2 min PPF		
	PAS	PAD	FC	PAS	PAD	FC	PAS	PAD	FC
Placebo (N = 37)	106,9±1,8	68,6±1,1	70,6±2	107,6±1,8	69,5±1,3	72,3±2	122,2±2,2**	80,8±1,5**	82,3±4**
Losartan (N = 14)	109,9±4,2	77,05±2,6	80,4±3	108,7±4,1	75,0±3,0	80,1±3	112,0±5,7	76,8±4,0	88,5±4**
Valsartan (N = 13)	105,8±3,8	71,7±2,5	74,5±2	103,4±4,1	67,5±1,9#	79,9±2	107,6±4,8	71,0±2,6	87,5±2*
Eprosartan (N = 18)	105,4±2,5	66,7±2,1	79,1±1	103,2±2,3	65,9±1,8	75,1±3	108,9±3,5	70,7±2,6	90,0±5*

PPF = prueba presora al frío. PAS = presión arterial sistólica (mmHg). PAD = presión arterial diastólica. FC = frecuencia cardíaca (lat/min).
 Prueba de t pareado: *p < 0,05, **p < 0,01 comparado con su basal al minuto 0 de la PPF, #p < 0,03 comparado con su basal antes de la administración de valsartan.

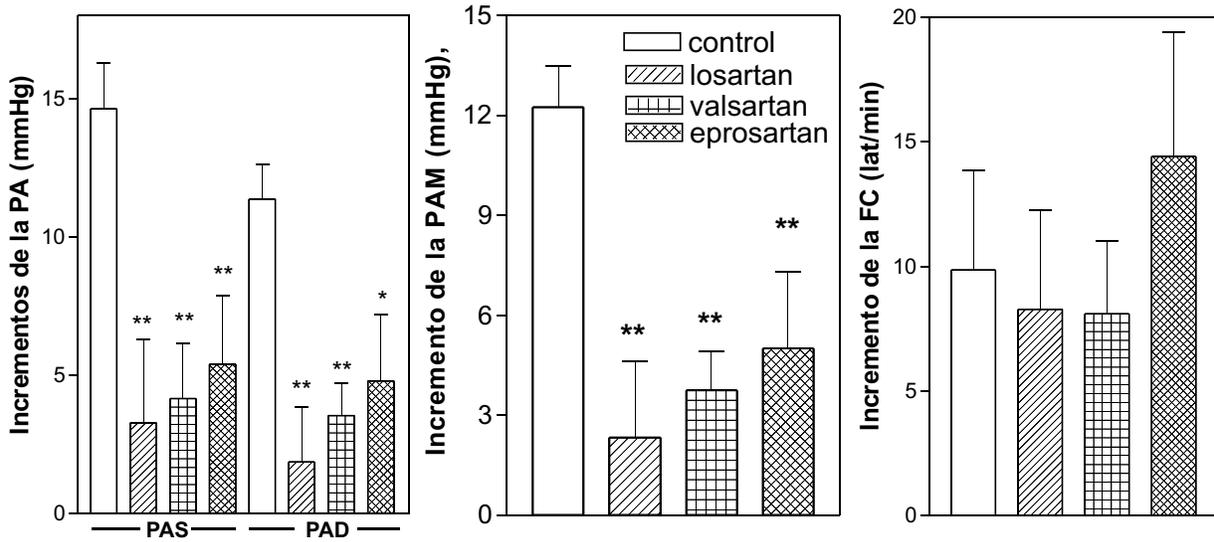


Fig. 3. Incremento de las presiones arteriales sistólica (PAS), diastólica (PAD) (izquierda), media (PAM) (centro) y en la frecuencia cardiaca (derecha) durante la prueba presora al frío en voluntarios sanos tratados con placebo, losartan, valsartan o eprosartan. Los resultados se expresan como el promedio \pm EEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ comparado con placebo-control.

en el grupo placebo fue el siguiente: PAS = $14,6 \pm 1,7$ mmHg, PAD = $11,4 \pm 1,3$ mmHg y PAM = $12,5 \pm 2,0$ mmHg (Fig. 2). El pretratamiento con losartan o eprosartan no alteró los valores basales de PAS, PAD y PAM o FC, mientras que el valsartan redujo significativamente los valores basales de la PAM (Fig. 4). La administración de los antagonistas del receptor AT₁ (losartan, valsartan o eprosartan) suprimió completamente la respuesta presora a la PPF, sin afectar el incremento en la FC (Fig. 2 y 3, Tabla II). Igualmente, la respuesta presora en los grupos tratados fue similar entre ambos sexos (Fig. 2).

DISCUSIÓN

El estrés agudo inducido por la PPF produce la activación del sistema nervioso autónomo simpático con el consecuente incremento de la presión arterial y la frecuencia cardíaca (19) que se asocian a aumento de los niveles séricos de mediadores de la contracción del músculo liso tales como la endotelina-1 (22) y la norepinefri-

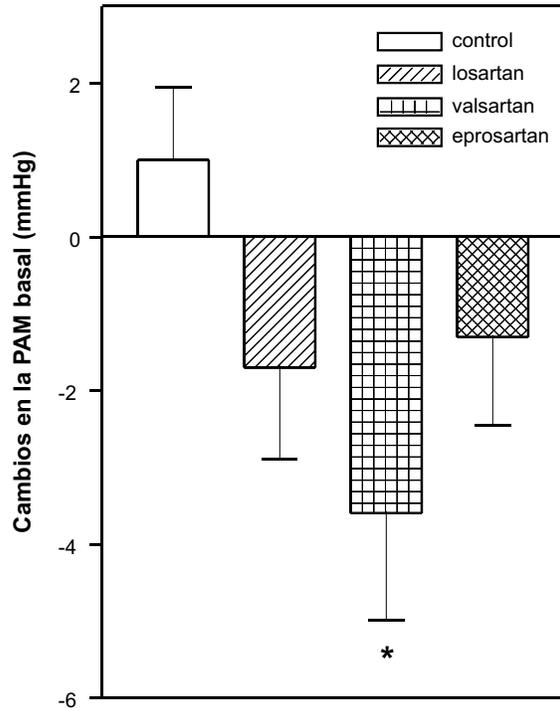


Fig. 4. Cambios en la presión arterial media (PAM) basal en voluntarios sanos tratados con placebo, losartan, valsartan o eprosartan. Los resultados se expresan como el promedio \pm EEM. * $p < 0,05$ comparado con placebo-control.

na (23). Además, la ANG II puede estimular otros sistemas presores, como SNS, a través de diversas vías incluyendo la modulación de la respuesta simpática para la estimulación del reflejo cardiovascular mediado por mecanismos centrales (12), facilitando la transmisión simpática en diferentes órganos (24).

La ANG II circulante puede tener acceso a núcleos cerebrales localizados en áreas fuera de la barrera hematoencefálica involucrados en la regulación cardiovascular, y de esta manera mediar un incremento en la actividad nerviosa simpática (25). En la periferia, la ANG II se asocia a un papel permisivo en la liberación de norepinefrina desde los terminales nerviosos simpáticos, a través de múltiples mecanismos que incluyen el aumento en la biosíntesis de catecolaminas, la estimulación de células ganglionares, la liberación de catecolaminas desde la médula suprarrenal y la disminución de la recaptación presináptica de catecolaminas (8).

Así, la inhibición del SRA puede ser determinante para reducir los efectos deletéreos del aumento del eflujo simpático. En efecto, estudios realizados en los que se utilizaron modelos bien caracterizados de estrés en roedores, han demostrado que la administración de antagonistas de los receptores AT₁ previene la respuesta simpatoadrenal y hormonal al estrés (10, 26, 27). En ratas descerebradas el tratamiento con losartan reduce efectivamente la respuesta cardiovascular a la estimulación simpática (28) y en ratas conscientes, el tratamiento con candesartan previene la liberación simpatoadrenal, hormonal y urinaria de catecolaminas en respuesta al estrés agudo por aislamiento (29). Estos resultados sugieren que los receptores AT₁ cumplen un papel fundamental en las respuestas fisiológicas al estrés agudo.

En este estudio se evaluó el efecto de tres antagonistas selectivos de los recepto-

res AT₁ sobre la respuesta hemodinámica en sujetos normotensos. Se demostró que la aplicación de la PPF en el grupo placebo incrementó la FC, PAS, PAD y PAM. El bloqueo agudo con dosis únicas de cualquiera de los antagonistas estudiados, bloqueó la respuesta presora, pero no tuvo efecto sobre el incremento de la FC inducido por la PPF. Estos datos sugieren que en condiciones en las cuales el SRA se encuentra marcadamente activado tales como en el estrés agudo (31), la ANG II contribuye a la respuesta presora adrenérgica o incluso la intensifica, produciendo una facilitación de la actividad simpática.

Los resultados se corresponden con los ya reportados en pacientes con insuficiencia cardíaca crónica tratados con losartan. La elevación compensatoria en la actividad simpática observada en estos pacientes, es atenuada por el antagonista AT₁ y se asoció a menor incremento de la presión arterial, de la resistencia vascular periférica y de los niveles circulantes de epinefrina inducidos por la PPF (18). Aun más, en pacientes con estenosis coronaria severa demostrada angiográficamente, la PPF produjo un incremento marcado en la resistencia vascular coronaria y esta respuesta fue bloqueada por la infusión intracoronaria de inhibidor de la enzima convertidora, el benazeprilat (32); de igual modo el losartan normalizó la respuesta anormal de la dilatación de la arteria coronaria izquierda en pacientes con hipertensión esencial sometidos a la PPF (33). Estos hallazgos apoyan nuestros resultados ya que demuestran que la producción tisular miocárdica de ANG II modula la vasoconstricción simpática de las arterias coronarias en el humano, y sugieren un papel funcional de los receptores presinápticos AT₁ en el corazón humano (32, 33).

Los tres antagonistas AT₁ evaluados en el presente estudio son bloqueantes potentes, como se evidencia en su habilidad para

inhibir la contracción del músculo liso vascular inducida por ANG II, tanto *in vivo* como *in vitro*, así como por su capacidad para reducir la presión arterial en modelos experimentales de hipertensión (34-36). Sin embargo, el eprosartan difiere de estos antagonistas de los receptores AT₁, ya que es un compuesto no bifénilo, no tetrazólico, con una alta afinidad por los receptores AT₁ (37). Estos resultados, aunados al hecho que el eprosartan es un antagonista más efectivo a nivel presináptico, indica que la interacción entre la ANG II y el SNS ocurre predominantemente en los receptores del terminal nervioso simpático, por lo que la acción facilitadora de la ANG II endógena sería abolida mediante el bloqueo de estos receptores durante la estimulación simpatoadrenal inducida por la PPF (10).

En consistencia con observaciones previas reportadas por Parati y col. (38) en humanos sometidos a PPF, en el presente estudio la frecuencia cardíaca aumentó significativamente durante el estrés, alcanzando el valor máximo durante los períodos de 30 y 60 segundos y un valor mínimo a los 40 y 90 segundos. El descenso de la frecuencia cardíaca, durante la realización de la PPF podría corresponderse con el mecanismo compensador parasimpático del baroreflejo, en oposición al simpático activado, generando valores de FC inferiores incluso al valor basal.

Dampney y col. (39) han postulado la existencia de dos vías centrales diferentes en la génesis de la respuesta cardiovascular al estrés agudo. La existencia de vías independientes, permitiría explicar el efecto diferencial de los antagonistas de los receptores AT₁, sobre los incrementos de la presión arterial y de la frecuencia cardíaca inducidos por la PPF. En este sentido, Porter y col. caracterizaron la contribución de la ANG II central en los cambios fisiológicos del baroreflejo secundarios al estrés agudo,

en ratas jóvenes, demostraron que el aumento de la respuesta taquicardizante producida por el estrés agudo no fue afectada por la administración tanto central como periférica del losartan, lo que sugiere que la ANG II no contribuye al incremento del brazo simpático del baroreflejo inducido por estrés (40).

Los resultados del presente estudio en voluntarios sanos con terapia a corto plazo, no son directamente extrapolables a situaciones como los efectos de la terapia crónica en pacientes con activación de sistemas neurohumorales, sin embargo pueden ser considerados en el diseño de estrategias de tratamiento en pacientes con enfermedades cardiovasculares, en las cuales la activación simpática es un importante factor pronóstico (41). El efecto inhibitorio adicional de los antagonistas de los receptores AT₁ sobre la actividad nerviosa simpática, conjuntamente con la mejoría de las variables hemodinámicas, podría contribuir de manera importante al conocimiento de los efectos benéficos de los antagonistas de los receptores AT₁ en la supervivencia de los pacientes con insuficiencia cardíaca o en aquellos que hayan sufrido un infarto agudo del miocardio (18). De acuerdo con estos análisis, se debe tomar en consideración que la acción vasodilatadora de los inhibidores del SRA no representa la única ventaja de este grupo de fármacos en el tratamiento de pacientes con síndromes coronarios, HTA e insuficiencia cardíaca.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico PI-06-30-5064-2003. Universidad Central de Venezuela y Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda, UNEFM.

REFERENCIAS

1. **Jindra A Jr, Kvetnansky R.** Stress-induced activation of inactive renin. Molecular weight aspects. *J Biol Chem* 1982; 257: 5997-5999.
2. **Ganong WF, Barbieri C.** Neuroendocrine components in the regulation of renin secretion. In: *Frontiers in Neuroendocrinology*. (Ed Ganong WF, Martini L), Raven Press, New York, NY, 1982; 7: pp231-262.
3. **Catt KJ, Mendelshon FAO, Millan MA, Aguilera G.** The role of angiotensin II receptors in vascular regulation. *J Cardiovasc Pharmacol* 1984; 6(Suppl 4):5575- 5586.
4. **Catt KJ, Wyann PC, Millan MA, Mendelsohn FA, Aguilera G.** Brain receptors for angiotensin II and corticotropin releasing factor. In: *Frontiers in Neuroendocrinology*. (Ed Ganong WF, Martini L), Raven Press. New York, NY 1986: pp225-253.
5. **Saavedra JM.** Brain and pituitary angiotensin. *Endocr Rev* 1992; 13:329-380.
6. **Aguilera G, Kiss A, Luo X.** Increased expression of type 1 angiotensin II receptors in the hypothalamic paraventricular nucleus following stress and glucocorticoid administration. *J Neuroendocrinol* 1995; 7:775-783.
7. **Castrén E, Saavedra JM.** Angiotensin II receptors in the paraventricular nucleus, subfornical organ and pituitary gland of hypophysectomized, adrenalectomized and vasopressin-deficient rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:725-729.
8. **Dendorfer A, Raasch W, Tempel K, Dominiak P.** Interactions between the renin-angiotensin system (RAS) and the sympathetic system. *Basic Res Cardiol* 1998; 93 (Suppl): 24-29.
9. **Xu L, Brooks VL.** ANG II chronically supports renal and lumbar sympathetic activity in sodium-deprived, conscious rats. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol 40)*: 1996; 271:H2591-H2598.
10. **Cierco M, Israel A.** Role of AT₁ receptor in the cardiovascular response to footshock. *European J Pharmacol* 1994; 251:103-106.
11. **Mendelsohn FAO, Doyle AE, Gray GW.** Lack of response of sympathetic nervous system to angiotensin infusion. *Lancet* 1990; 1:492-493.
12. **Reid IA.** Interactions between ANG II, sympathetic nervous system, and baroreceptor reflexes in regulation of blood pressure. *Am J Physiol (Endocrinol Metab 25)* 1992; 262:E763-E778.
13. **Brunner HR, Nussberger J, Waebler B.** Angiotensin II blockade compared with other pharmacological methods of inhibiting the renin-angiotensin system. *J Hypertension* 1993; 11 (Suppl 3):553-558.
14. **Beaulieu M, Lacourciere Y, Cleroux J.** Unchanged neurogenic vasoconstrictor response after exercise during angiotensin converting enzyme inhibition with fosinopril. *Am J Hypertens* 1994; 7:763-766.
15. **McGrath BP, Arnolda LF.** Enalapril reduces the catecholamine response to exercise in patients with heart failure. *Eur J Clin Pharmacol* 1986; 30:485-487.
16. **Minatoguchi S, Ito H, Koshiji M, Masao K, Hirakawa S, Majewski H.** Enalapril decreases plasma noradrenaline levels during the CPT in human hypertensives. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1992; 19:279-282.
17. **Worek RH, Ibsen H, Frandsen E, Dige-Petersen H.** AT₁ receptor blockade and the sympathoadrenal response to insulin-induced hypoglycemia in humans. *Am J Physiol (Endocrinol Metab 35)*. 1997; 272:E415-E421.
18. **Rodríguez-García JL, Paule A, Domínguez J, García-Escribano JR, Vazquez M.** Effect of the angiotensin II antagonist losartan on endothelin-1 and norepinephrine plasma levels during cold pressor test in patients with chronic heart failure. *Int J Cardiol* 1999; 70: 293-301.
19. **Hines EA, Brown GE.** The cold pressor test for measuring the reactivity of the blood pressure: data concerning 571 normal and hypertensive subjects. *Am Heart J* 1936; 11:1-9.
20. **Fagius J, Karhuvaara S.** Sympathetic activity and blood pressure increases with bladder distension in humans. *Hypertension* 1989; 14:511-517.

21. Victor RG, Leimbach WN Jr, Seals DR, Wallin BG, Mark AL. Effects of the cold pressor test on muscle sympathetic nerve activity in humans. *Hypertension* 1987; 9:429-436.
22. Fyhrquist F, Saijonmaa O, Metsarinne K, Tikkanen I, Rosenlof K, Tikkanen T. Raised plasma endothelin-1 concentration following cold pressor test. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 169:217-221.
23. Rostrup M, Smith G, Bjornstad H, Westheim A, Stokland O, Eide I. Left ventricular mass and cardiovascular reactivity in young men. *Hypertension* 1994; 23(Suppl): 1168-1171.
24. Liao JC, Zimmerman BG. Effect of angiotensin on uptake of ³H-norepinephrine in dog cutaneous arteries. *Proc Soc Exp Biol Med* 1972; 139:216-219.
25. Ferrario CM, Gildenberg PL, McCubbin JW. Cardiovascular effects of angiotensin mediated by central nervous system. *Circ Res* 1972; 30:257-262.
26. Castrén E, Saavedra JM. Repeated stress increases the density of angiotensin II binding sites in the rat paraventricular nucleus and subfornical organ. *Endocrinology* 1988; 122:370-372.
27. Saavedra JM, Ando H, Armando I, Baiardi G, Bregonzio C, Jezova M, Zhou J. Brain angiotensin II, an important stress hormone: Regulatory sites and therapeutic opportunities. *Ann New York Acad Sci* 2004; 1018:76-84.
28. Wong PB, Bernard R, Timmermans PBMW. Effect of blocking angiotensin II receptor subtype on rat sympathetic nerve function. *Hypertension* 1992; 19 (6 Suppl): 663-667.
29. Armando I, Carranza A, Nishimura Y, Hoe KL, Barontini M, Terron JA, Falcon-Neri A, Ito T, Juorio AV, Saavedra JM. Peripheral administration of an angiotensin II AT₁ receptor antagonist decreases the hypothalamic-pituitary-adrenal response to isolation stress. *Endocrinology* 2001; 142:3880-3889.
30. Eliot RS. Stress and the heart: Mechanisms, measurement, and management. *Postgrad Med* 1992; 92: 237-248.
31. Wong PC, Hart SD, Timmermans PBMW. Effect of angiotensin II antagonism on canine renal sympathetic nerve function. *Hypertension*. 1991; 17: 1127-1134.
32. Saino A, Pomidossi G, Perondi R, Morganti A, Turolo L, Mancina G. Modulation of sympathetic coronary vasoconstriction by cardiac renin-angiotensin system in human coronary heart disease. *Circulation* 2000; 101:2277-2283.
33. Deng YB, Yang HY, Li CL, Chang Q. Angiotensin receptor antagonist losartan improves endothelial function of epicardial coronary arteries in patients with essential hypertension. *Clin Cardiol* 2002; 25:422-428.
34. Criscione L, de Gasparo M, Buhlmayer P, Whitebread S, Ramjoue HP, Wood J. Pharmacological profile of valsartan: a potent, orally active, nonpeptide antagonist of the angiotensin II AT₁-receptor subtype. *Br J Pharmacol* 1993; 110:761-771.
35. Wong PC, Price WA, Chiu AT, Duncia JV, Carini DJ, Wexler RR, Johnson AL, Timmermans PB. Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. VIII. Characterization of functional antagonism displayed by DuP 753, an orally active antihypertensive agent. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 252:719-725.
36. Edwards RM, Aiyar N, Ohlstein EH, Weidley EF, Griffin E, Ezekiel M, Keenan RM, Ruffolo RR, Weinstock J. Pharmacological characterization of the nonpeptide angiotensin II receptor antagonist, SK and F 108566. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; 260: 175-181.
37. Brooks DP, Ohlstein EH, Ruffolo RR Jr. Pharmacology of eprosartan, an angiotensin II receptor antagonist: Exploring hypotheses from clinical data. *Am Heart J* 1999; 138: S246-S251.
38. Parati G, Pomidossi G, Ramirez A, Gavazzi C, Bertinieri G, Mancina G. Reproducibility of laboratory tests evaluating neural cardiovascular regulation in man. *J Hypertens Suppl* 1983; 1:88-90.
39. Dampney R, Coleman M, Fontes Y, Hiorooka J, Horiuchi J, Polson P, Potts

- P, Tagawa T.** Central mechanisms underlying short term and long term regulation of the cardiovascular system. Proceedings of the Australian Physiological and Pharmacological Society 2001; 32:1-12.
40. **Porter J.** Contribution of central ANG II to acute stress-induced changes in baroreflex function in young rats. *Journal Phys. Regulator integrative comp. Physiol* 2000; 279:R1368-R1391.
41. **Cohn JN, Levine TB, Olivari MT, Garberg V, Lura D, Francis GS, Simon AB, Rector T.** Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N Engl J Med* 1984; 311:819-823.