

WLADIMIR MIGNONE GORDO

INTERAÇÃO ENTRE SISTEMA NERVOSO
AUTÔNOMO E FUNÇÃO VASCULAR NA
HIPERTENSÃO ARTERIAL RESISTENTE

*INTERACTION BETWEEN AUTONOMIC NERVOUS
SYSTEM AND VASCULAR FUNCTION IN RESISTANT
HYPERTENSION*

Campinas

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

WLADIMIR MIGNONE GORDO

**INTERAÇÃO ENTRE SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO E FUNÇÃO
VASCULAR NA HIPERTENSÃO ARTERIAL RESISTENTE**

*INTERACTION BETWEEN AUTONOMIC NERVOUS SYSTEM AND
VASCULAR FUNCTION IN RESISTANT HYPERTENSION*

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção de título de Doutor em Farmacologia.

PhD thesis submitted to the Medical Sciences Faculty, University of Campinas to obtain the PhD title in Pharmacology.

Orientador: Prof. Dr. Heitor Moreno Junior

Este exemplar corresponde à versão
final da tese defendida pelo aluno
Wladimir Mignone Gordo, e orientado
pelo Prof. Dr. Heitor Moreno Junior

Campinas

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

G652i Gordo, Wladimir Mignone, 1969-
 Interação entre sistema nervoso autônomo e função
 vascular na hipertensão arterial resistente / Wladimir
 Mignone Gordo. -- Campinas, SP : [s.n.], 2014.

 Orientador : Heitor Moreno Júnior.
 Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
 Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

 1. Hipertensão. 2. Sistema nervoso autônomo. 3.
 Obesidade. I. Moreno Junior, Heitor, 1958-. II.
 Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
 Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Interaction between autonomic nervous system and vascular function in resistant hypertension

Palavras-chave em inglês:

Hypertension

Autonomic nervous system

Obesity

Área de concentração: Farmacologia

Titulação: Doutor em Farmacologia

Banca examinadora:

Gabriel Forato Anhé [Presidente]

Marcelo Nicolás Muscará

Luiz Cláudio Martins

Marcos Mello Moreira

Juan Carlos Yugar Toledo

Data de defesa: 03-12-2014

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

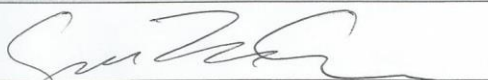
BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

WLADIMIR MIGNONE GORDO

ORIENTADOR PROF. DR. HEITOR MORENO JUNIOR

MEMBROS:

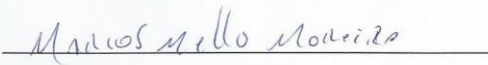
1. PROF. DR. GABRIEL FORATO ANHE



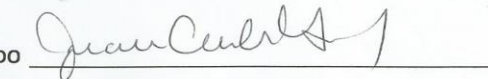
2. PROF. DR. LUIZ CLÁUDIO MARTINS



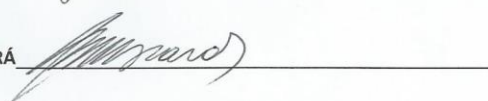
3. PROF. DR. MARCOS MELLO MOREIRA



4. PROF. DR. JUAN CARLOS YUGAR TOLEDO



5. PROF. DR. MARCELO NICOLÁS MUSCARÁ



Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas

Data: 03 de dezembro de 2014

RESUMO

Em pacientes hipertensos resistentes, frequentemente obesos, tanto a pressão arterial elevada como a obesidade contribuem para a disfunção vascular. Além disso, resultados prévios demonstraram que distúrbios autonômicos estão relacionados com a obesidade e hipertensão e que a redução da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) pode representar um fator de risco para a hipertensão. Para melhor entender a relação entre a disfunção autonômica e a hipertensão arterial resistente (HAR), este trabalho teve a finalidade de avaliar a associação entre a VFC, obesidade e função vascular na HAR. Trinta e sete pacientes com hipertensão arterial resistente foram selecionados. Os parâmetros da VFC foram obtidos a partir da gravação ambulatorial simultânea com Holter/MAPA de 24 horas e analisados no domínio do tempo. A função endotelial foi avaliada com a técnica da vasodilatação mediada pelo fluxo (VMF) e a rigidez arterial pela velocidade da onda de pulso (VOP). Encontramos correlação positiva entre o desvio padrão de todos os intervalos RR normais (SDNN) e o desvio padrão das médias dos intervalos RR normais calculados em intervalos de 5 min (SDANN) com a VMF ($r = 0,56$, $p = 0,001$; $r = 0,48$, $p = 0,006$, respectivamente) mas não com a VOP. Além disso, SDNN foi negativamente correlacionada com o índice de massa corporal e circunferência da cintura ($r = -0,44$, $p = 0,01$; $r = -0,34$, $p = 0,04$, respectivamente). Esses achados reforçam a importância da hiperativação do sistema nervoso simpático em hipertensos resistentes obesos. Além disso, a associação entre os parâmetros da VFC e a disfunção endotelial e obesidade sugerem um potencial mecanismo fisiopatológico na resistência à terapia anti-hipertensiva.

Palavras-chave: hipertensão, sistema nervoso autônomo e obesidade.

ABSTRACT

Resistant hypertensive patients are generally overweight or obese, either high blood pressure as obesity contribute to vascular damage. Moreover, previous data showed that autonomic imbalance is related to obesity as well as hypertension. Reduced heart rate variability (HRV) may represent a risk factor for hypertension. In order to better understand the relationship between impaired autonomic function and resistant hypertension (RHTN), we aimed to evaluate the association between HRV, obesity and vascular function in RHTN. Thirty-seven resistant hypertensive patients were selected. Parameters of HRV were derived from the simultaneous recording of 24-hour Holter ambulatory electrocardiographic /ABPM and analyzed in time domain. Endothelial function was assessed by flow mediated dilation (FMD) technique and arterial stiffness by pulse wave velocity (PWV). We found positive correlation between standard deviation of all normal RR intervals (SDNN) and standard deviation of mean RR interval in all 5-minute segments of a 24-hour recording (SDANN) with FMD ($r = 0.56$, $p = 0.001$; $r = 0.48$, $p = 0.006$, respectively) but not with PWV. In addition, SDNN was negatively correlated with body mass index and waist circumference ($r = -0.44$, $p = 0.01$; $r = -0.34$, $p = 0.04$, respectively). These data strengthen the importance of sympathetic overactivity in obese resistant hypertensive subjects. Furthermore, the relationship between HRV parameters with endothelial dysfunction and obesity suggest a potential pathophysiological mechanism in RHTN.

Keywords: hypertension, autonomic nervous system, obesity.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	xiii
AGRADECIMENTOS	xv
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 ASPECTOS PRELIMINARES	1
1.2 HIPERTENSÃO ARTERIAL RESISTENTE	2
1.3 HIPERTENSÃO ARTERIAL RESISTENTE E SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO	5
1.4 AVALIAÇÃO DO SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO EM PACIENTES HIPERTENSOS	6
1.5 HIPERTENSÃO ARTERIAL E RIGIDEZ VASCULAR	9
1.6 HIPERTENSÃO ARTERIAL E FUNÇÃO ENDOTELIAL	10
1.7 ASSOCIAÇÃO ENTRE SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO E FUNÇÃO VASCULAR	11
2. OBJETIVOS	14
3. CAPÍTULO I	15
4. CONCLUSÕES	31
5. REFERÊNCIAS	32

DEDICATÓRIA



Dedico nosso trabalho ao Dr. Robert Francis Furchgott (1916-2009), um cientista extraordinário que fez grandes contribuições para a nossa compreensão da fisiologia cardiovascular e farmacologia. Ele foi agraciado com o “Prêmio Nobel 1998” em Fisiologia/Medicina por identificar o papel fundamental que o “óxido nítrico” desempenha na regulação da função cardiovascular.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

*À minha esposa e meu filho, **Fabiana e Yuri**, pelo carinho e amor, sem os quais nada faria sentido.*

*Aos meus pais, **Wladimir e Virgínia**, e meus irmãos, **Vânia e Guilherme**, pelo apoio e incentivo.*

*Ao meu orientador, **Prof. Dr. Heitor Moreno Jr**, pela oportunidade e por compartilhar sua genialidade, meu muito obrigado.*

*Aos meus amigos e companheiros de pesquisa do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular, **Natália Ruggeri Barbaro, Ana Paula Cabral de Faria, Andréa Sabbatini, Vanessa Fontana, Ana Paula Beppler Lino, Rodrigo Modolo e Leandro de Mattos Boer Martins**, por toda cooperação, pelo convívio diário e pela troca de experiências.*

*Aos professores **Edson Antunes, Stephen Hyslop, Gabriel Forato Anhê e Márcio Jansen Figueiredo**, pelos ensinamentos, correções e discussões fundamentais para o êxito deste trabalho.*

Aos funcionários, pacientes e voluntários que participaram deste projeto.

*À **FAPESP e CNPq** pelo auxílio e apoio científico.*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Fisiopatologia da HAR relacionada à hiperatividade simpática	04
Figura 2: Métodos para avaliação da atividade simpática	07

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AOS	Apneia obstrutiva do sono
ARA	Antagonista do receptor de angiotensina
DM	Diabetes mellitus
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DRC	Doença renal crônica
eNOS	Óxido nítrico sintase
HAR	Hipertensão arterial resistente
HTN	Hipertensão arterial
IMC	Índice de massa corporal
LR	Receptor de leptina
NA	Noradrenalina
NO	Óxido nítrico
NF-κB	Fator nuclear kappa-B
SNA	Sistema nervoso autônomo
SNP	Sistema nervoso parassimpático
SNS	Sistema nervoso simpático
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
TAP	Tonometria arterial periférica
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
VFC	Variabilidade da frequência cardíaca
VMF	Vasodilatação mediada pelo fluxo
VOP	Velocidade da onda de pulso

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Preliminares

Entre vários mecanismos fisiológicos estabelecidos, o sistema nervoso autônomo (SNA) e o endotélio vascular desempenham um importante papel na regulação da PA [1]. Alterações na funcionalidade destes mecanismos estão diretamente relacionadas ao desenvolvimento da hipertensão arterial sistêmica (HAS) [2-4].

A hiperatividade do sistema nervoso simpático (SNS) está criticamente envolvida na patogênese da HAS, correlacionando-se positivamente com a gravidade da mesma [5-6]. Além disso, estudos recentes demonstraram redução da PA, a curto prazo, em hipertensos resistentes através do procedimento de denervação renal e estimulação dos barorreceptores carotídeos, sugerindo a importância do SNS na fisiopatologia da HAR [7-10].

Adicionalmente, foram descobertas fortes associações entre o SNS, as alterações hemodinâmicas (aumento da resistência vascular periférica, diminuição da distensibilidade arterial e redução da perfusão tecidual) e metabólicas (resistência insulínica, obesidade e dislipidemia), frequentemente encontradas no paciente hipertenso [11-16].

Embora existam várias evidências da associação entre função autonômica e função vascular em indivíduos saudáveis e hipertensos, os mecanismos fisiopatológicos envolvidos nesta interação foram pouco explorados até hoje. Considerando a importante associação entre o sistema nervoso autônomo e a função vascular na HAS, o estudo que se segue como capítulo desta tese de doutorado (modelo alternativo) visa avaliar a interação entre a atividade do sistema nervoso autônomo e função vascular em pacientes hipertensos resistentes.

1.2 Hipertensão Arterial Resistente

Mesmo com a disponibilidade de fármacos efetivos atualmente para o tratamento da hipertensão arterial, estudos como o *National Health Nutrition Education Survey* revelaram que somente 34% da população americana de adultos hipertensos têm a PA controlada (<140/90 mmHg), o restante não atinge as metas recomendadas pelo consenso [17-18].

No Brasil, a HAS apresenta prevalência variável entre 22,3% e 43,9% [19-20], apresentando apenas 19,6% de controle adequado da PA [20-21]. A baixa adesão [22], regimes de tratamento inadequados, medidas incorretas da PA e outras causas de pseudo-hipertensão explicam em parte esse insucesso no controle da PA. Entretanto, há um percentual ainda significativo de pacientes que, mesmo excluídos esses fatores, apresentam real resistência ao tratamento anti-hipertensivo, sendo classificados como hipertensos resistentes.

Por determinação da *American Heart Association (AHA)* e *European Society of Hypertension (ESH)*, HAR é definida pela PA que se mantém em níveis acima das metas recomendadas, sendo maior que 140/90 mmHg ou 130/80 mmHg em pacientes com diabetes ou com doença renal crônica (DRC), com o uso de, no mínimo, três fármacos anti-hipertensivos com ações sinérgicas em doses máximas ou toleradas, sendo um deles idealmente um diurético. Além disso, pacientes que estão com a PA controlada, mas que necessitam de quatro ou mais anti-hipertensivos também foram incluídos como resistentes ao tratamento nessas diretrizes [23].

A prevalência exata da HAR não está bem estabelecida, porém evidências indiretas de estudos populacionais sugerem que este é um problema clínico relativamente comum. Por exemplo, na população que participou do *Framingham Heart Study*, somente 48% do total de pacientes tratados e menos de 40% dos pacientes idosos estavam com a PA

controlada [24]. No estudo *Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial (ALLHAT)* somente 66% dos pacientes de alto risco atingiram as metas pressóricas (<140/90 mmHg) [25]. No Brasil, um estudo clínico recente realizado em 2012 com 606 pacientes hipertensos encontrou a prevalência de 3% de hipertensos resistentes.

De acordo com as diretrizes da *American Heart Association* para HAR [26], baseando-se em dados demográficos e resultados dos estudos de Framingham e ALLHAT, os maiores preditores da ausência de controle pressórico são a idade avançada, PA demasiadamente elevada na avaliação inicial, obesidade, excesso de ingestão de sódio, *diabetes mellitus* (DM) e doença renal crônica (DRC).

O envelhecimento e sua interface com a ativação do SNS estão bem documentados [27-31]. Vários estudos demonstraram que a atividade nervosa simpática está aumentada com o envelhecimento e alguns índices de atividade simpática, especialmente a atividade simpática muscular, estão mais relacionadas à PA nas idades avançadas [27-32].

Além do envelhecimento, a obesidade, o excesso de aldosterona, o DM e a apneia obstrutiva do sono (AOS) cobrem uma grande área do mosaico de características dos pacientes hipertensos resistentes [33-40]. Em estudos do tipo coorte com pacientes hipertensos resistentes, a média do índice de massa corporal (IMC) foi maior que 32 kg/m², a prevalência de hiperaldosteronismo foi de aproximadamente 20% e os casos de AOS diagnosticados ou suspeitos foi de 83% [41-42]. Ademais, entre os pacientes com HAR, o hiperaldosteronismo foi mais prevalente nos pacientes com diagnóstico de AOS confirmado do que nos pacientes com baixo risco desta comorbidade. Isso reforça que a AOS, o excesso de aldosterona e a obesidade são comorbidades frequentemente relacionadas aos pacientes hipertensos resistentes e podem influenciar a atividade simpática (Figura 1).



Figura 1. Fisiopatologia da HAR relacionada à hiperatividade simpática (Modificado de Tsioufis, Kordalis et al.) [40]. Condições como AOS, obesidade e excesso de aldosterona são fatores desencadeantes de inflamação, resistência insulínica e disfunção endotelial. Como consequência, há hiperativação do SNS e sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) que possuem, por suas vezes, a propriedade de hiperativação recíproca podendo incorrer em HAR.

O prognóstico dos pacientes com HAR comparado ao de pacientes com HAS não foi completamente avaliado até o momento. Presumivelmente, o prognóstico é menos favorável, visto que estes pacientes possuem um histórico prolongado de HA não controlada somada a outros fatores de risco cardiovascular como diabetes, AOS, hipertrofia

do ventrículo esquerdo e doença renal crônica. O grau de redução dos riscos cardiovasculares ao tratamento da HAR também é desconhecido [33].

1.3 Hipertensão arterial resistente e sistema nervoso autônomo

O SNA, através das divisões em simpático e parassimpático, modula diversas funções do sistema cardiovascular [43]. Tanto o SNS quanto o sistema nervoso parassimpático (SNP) estão continuamente ativos. A intensidade de ativação destes sistemas pode aumentar ou diminuir por ação do sistema nervoso central, de acordo com as necessidades momentâneas do organismo [44].

Nos últimos anos, novas descobertas em relação ao papel do SNS na fisiopatologia da HAS foram feitas. Entre elas, incluem-se a hiperativação simpática no desenvolvimento da HAS não apenas nos estágios iniciais da doença, mas na sua manutenção e agravamento com o surgimento de lesões de órgãos-alvo tais como hipertrofia ventricular esquerda, disfunção diastólica do ventrículo esquerdo e enrijecimento e remodelamento arteriais [45-49].

Com relação às opções terapêuticas para a hiperatividade do SNS, além do bloqueio periférico dos receptores adrenérgicos com o uso de alfa e betabloqueadores, faz-se necessário mencionar as emergentes evidências da atividade simpatoinibitória dos antagonistas dos receptores de angiotensina II (ARAI) e mineralocorticoide [50-52]. Agentes de ação central são efetivos como anti-hipertensivos na HAR, mas possuem alta incidência de eventos adversos e falta de evidências de desfecho cardiovascular primário [53]. Entretanto, alguns resultados têm sido alcançados com recentes estudos intervencionistas de inibição simpática através da ativação de barorreceptores carotídeos com estímulos elétricos [54] e denervação simpática renal seletiva [55].

1.4 Avaliação do sistema nervoso autônomo

Os métodos clínicos para avaliação regional da função do SNS em pacientes hipertensos são três: a eletrofisiologia (utilizando-se a microneurografia), a neuroquímica (utilizando-se a dosagem da diluição plasmática de isótopos de noradrenalina em veias de órgãos específicos como o coração e o rim) e a utilização da eletrocardiografia ambulatorial, para análise da variabilidade do sinal elétrico, batimento a batimento, para avaliação da VFC (Figura 2).

A microneurografia é uma técnica que permite o estudo dos disparos nervosos em fibras simpáticas subcutâneas distribuídas na pele e no músculo esquelético. A técnica envolve a inserção de eletrodos de tungstênio posicionando-os sobre as fibras simpáticas, mais comumente, os nervos fibular ou mediano. Registros na forma de *bursts* da atividade nervosa autonômica, sincronizados com os batimentos cardíacos, são gerados [56].

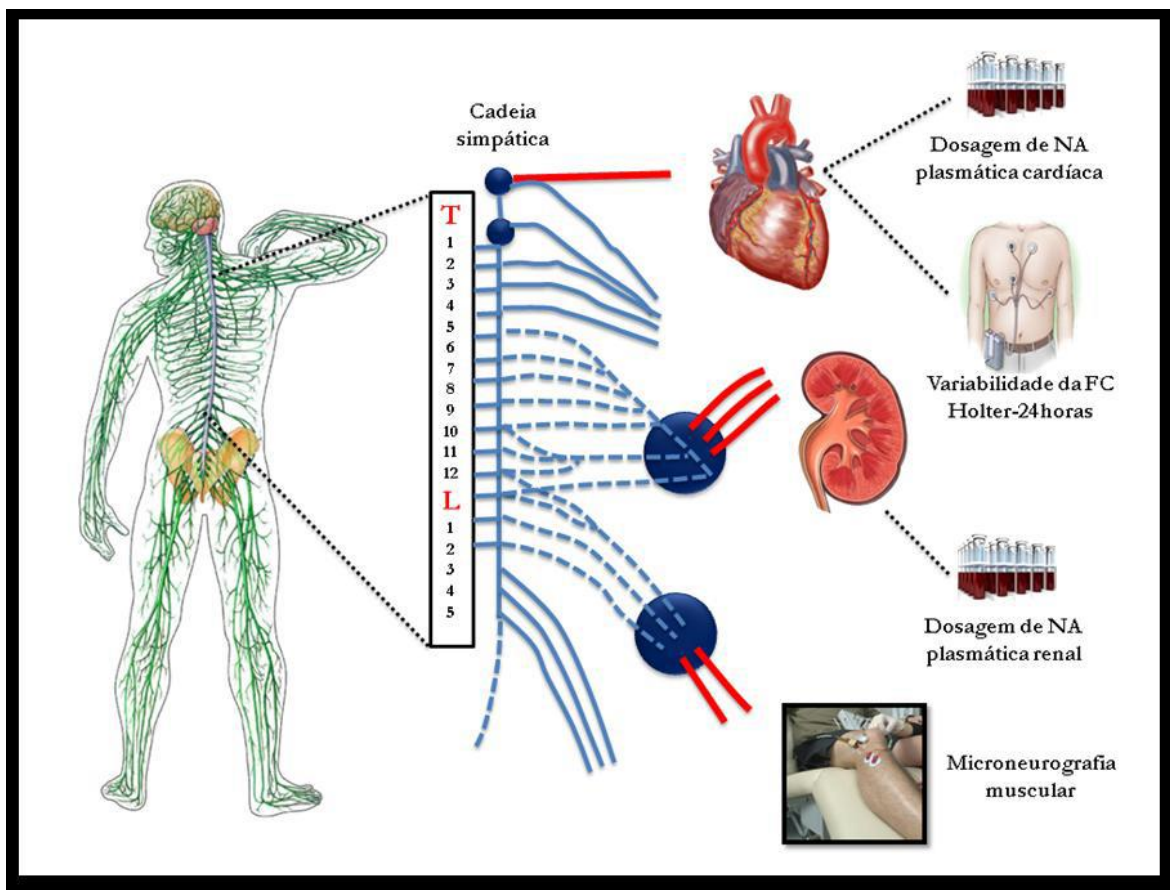


Figura 2. Métodos para avaliação da atividade simpática em pacientes hipertensos (modificado de Esler) [3]. Dosagem plasmática de noradrenalina no coração e rim, microneurografia do nervo fibular e análise da variabilidade da frequência cardíaca.

A dosagem das taxas de NA liberada pode ser avaliada clinicamente utilizando-se medidas radioisotópicas de noradrenalina plasmática nos órgãos dos indivíduos. Como os métodos microneurográficos são incapazes de avaliarem a atividade dos nervos simpáticos dos órgãos internos, a dosagem de NA orgânica regional pode ser utilizada. Através da infusão de NA tritiada e as dosagens locais do plasma do seio coronário e das veias renais, é possível estimar o grau de liberação do neurotransmissor no coração e nos rins [57-59].

Embora a investigação clínica tenha aumentado o nosso conhecimento sobre a função do SNS e seu envolvimento na fisiopatologia de várias doenças cardiovasculares,

incluindo a HA, não há nenhuma recomendação para a estimativa da atividade adrenérgica na HAR. Apesar das avaliações da função adrenérgica terem sido determinadas com a microneurografia e as medidas de NA plasmática em órgãos específicos realizadas em estudos clínicos, nenhuma técnica pode ser classificada como “padrão ouro” e as metodologias descritas acima são basicamente utilizadas como ferramentas de investigação clínica para estudos científicos [60]. A frequência cardíaca em repouso e ao estímulo são reguladas não apenas pelo SNS, mas pelo SNP, que é também dependente dos receptores cardíacos adrenérgicos. Ademais, a modulação autonômica em repouso na posição supina denota limitada correlação com outros índices da atividade simpática como a NA plasmática e atividade simpática muscular [61]. Com relação à excreção urinária de catecolaminas em 24 horas, a inabilidade de avaliação dinâmica da atividade do SNS e a dificuldade de se determinar se a origem das catecolaminas é sistêmica ou renal são dignas de nota [62]. Especificamente com relação aos níveis de NA plasmática, constituem-se limitações substanciais à análise e interpretação dos dados a sua baixa reprodutibilidade, baixa sensibilidade e a incapacidade de discriminação se os níveis de NA são decorrentes do aumento da secreção ou diminuição do *clearance* dos níveis elevados de neurotransmissores circulantes [63-66].

A análise do poder espectral da frequência cardíaca é comumente aplicada como alternativa não invasiva do estudo da atividade simpática do coração [67-68]. O ramo simpático do sistema nervoso aumenta a frequência cardíaca, implicando em intervalos mais curtos entre batimentos. Por sua vez, o ramo parassimpático desacelera o ritmo cardíaco, resultando em intervalos maiores entre os batimentos. Assim, a VFC pode ser medida com base nos intervalos entre batimentos, os quais são mais facilmente calculados como sendo os períodos entre ondas R consecutivas, ou intervalos RR [69]. A VFC pode

ser usada para avaliação dos distúrbios autônomos, doenças e mortalidade geral [70]. As medidas da VFC nos domínios do tempo e da frequência têm sido utilizadas com sucesso para avaliação do tônus simpático e parassimpático [71]. Embora haja ainda diferenças nos valores de referência da VFC em diversos estudos, há consenso de que menores valores destes índices referentes à função vagal estão associados, prospectivamente, à morte e incapacidade [72]. A atividade parassimpática e a VFC estão associadas à disfunção imunológica e inflamação que estão, direta ou indiretamente, relacionadas à grande gama de doenças cardiovasculares e ao diabetes [73-74].

1.5 Hipertensão arterial e rigidez arterial

A rigidez arterial é caracterizada por alterações na estrutura da parede arterial, em especial da camada média, principalmente por proliferação de colágeno e quantidades diminuídas de elastina ou quebra delas [75]. A complacência da parede vascular depende da contribuição do colágeno e elastina, que conferem integridade estrutural e elasticidade ao vaso. Além de mudanças estruturais, alterações em células musculares lisas contribuem para o desenvolvimento da rigidez arterial. O tônus vascular pode ser modificado por deposição de cálcio e pela ação de mediadores parácrinos como angiotensina II, endotelina, estresse oxidativo e óxido nítrico [76-77]. Além do próprio processo de envelhecimento das grandes artérias que resulta em menor complacência [78], patologias como o diabetes [79], HAS [80], DRC e o tabagismo [81] participam como aceleradores desse processo.

A rigidez arterial pode ser avaliada de maneira não invasiva pela estimativa da VOP, um método simples e reprodutível [82-83]. Estudos epidemiológicos demonstraram que o aumento da VOP, marcador de rigidez arterial, está associado com aumento de risco da morbidade e mortalidade por doença cardiovascular [84-85]. Estudo recente que avaliou

a rigidez arterial nos subgrupos da HAR, demonstrou maior VOP nos pacientes com PA não controlada em relação aos que conseguem o controle da PA [86]. A fisiopatologia da rigidez arterial tem como base um processo conhecido como remodelamento cardiovascular. O remodelamento cardiovascular se caracteriza por alterações estruturais e funcionais nos tecidos vasculares em resposta às alterações mecânicas, hemodinâmicas e neurohumorais que acompanham a hipertensão [87].

1.6 Hipertensão arterial e função endotelial

O endotélio exerce funções vasodilatadora, anticoagulante e anti-inflamatória fundamentais para a manutenção da homeostasia. Em diversas doenças cardiovasculares, como a hipertensão arterial, ocorre disfunção endotelial. O endotélio sadio tem função protetora contra o desenvolvimento de lesões vasculares mantendo a vasodilatação, inibindo a agregação plaquetária, a proliferação das células musculares lisas e a adesão leucocitária. O óxido nítrico é o principal responsável por essas ações [88-91], sendo considerado o mais importante fator endotelial, ou fator relaxante derivado do endotélio (EDRF, do inglês *Endothelial-Derived Relaxing Factor*), ao lado da prostaciclina e do fator hiperpolarizante derivado do endotélio [92-95]. Além disso, o endotélio pode também gerar fatores contráteis conhecidos por EDCFs, como as endotelinas [96], a angiotensina II [97-98], as prostaglandinas vasoconstritoras e espécies reativas de oxigênio [99]. A disfunção endotelial na hipertensão arterial leva a desequilíbrio da produção/liberação dos fatores contráteis e relaxantes podendo causar: diminuição da geração de óxido nítrico/aumento das espécies reativas de oxigênio [100-104], aumentando dessa forma o tônus vascular, aumento da permeabilidade vascular levando à formação de edema subendotelial [105-108], aumento da expressão de moléculas de adesão com consequente aumento da

aderência leucocitária à parede vascular [109-110] e aceleração da coagulação intravascular e aumento da proliferação de células musculares lisas levando à hipertrofia/hiperplasia da parede vascular [111-112]. Portanto, fica claro que o endotélio tem papel central na hipertensão, controlando a permeabilidade vascular, a proliferação de células musculares lisas, a adesão leucocitária, a coagulação e o equilíbrio entre os fatores endoteliais (EDRFs e EDCFs).

Entre os métodos mais utilizados atualmente para avaliação da função endotelial, podemos citar o método da vasodilatação mediada pelo fluxo (VMF). Descrito pela primeira vez por Anderson e Mark, em 1989, o método VMF não é invasivo e permite medições repetidas. O exame baseia-se na promoção de isquemia transitória causada pelo garroteamento aplicado no membro superior, desencadeando a liberação de NO pelo endotélio vascular que, quando íntegro, promove vasodilatação compensatória. Portanto, o método é capaz de avaliar a integridade da função endotelial a partir da dilatação arterial endotélio-dependente.

1.7 Associação entre o sistema nervoso autônomo e a função vascular

A disfunção autonômica e vascular frequentemente estão presentes no processo de desenvolvimento de várias doenças cardiovasculares, sugerindo a existência de complexa interação entre os dois sistemas [113-116]. Recentemente, vários estudos apontaram para a potencial associação entre a VFC e função endotelial. Watanabe et al 2013, relataram a associação entre VFC e VMF em pacientes com doença isquêmica do coração [117].

Curiosamente, esta correlação não foi encontrada em indivíduos com diabetes e utilizando agentes betabloqueadores. A ausência de associação entre função endotelial e SNA nos indivíduos tratados com betabloqueadores ou nos diabéticos reforça a hipótese de que o SNA afeta a função endotelial. Outro grupo também sugeriu a correlação entre alguns marcadores da função endotelial e atividade simpática em indivíduos saudáveis. Num estudo com 314 indivíduos saudáveis, a função endotelial na artéria braquial se correlacionou inversamente com os níveis de norepinefrina plasmática [118]. Swierblewska, et al. realizaram medidas simultâneas da função vascular e da atividade simpática através dos métodos da tonometria arterial periférica (TAP) e da atividade simpática nervosa muscular (ASNM) e encontraram correlação negativa entre estes parâmetros ($r = -0,8$, $p = 0,005$) [119].

Em certas condições, como na HAS, a associação entre o SNA e função vascular pode contribuir para processos patológicos. Gamboa, et al. investigou a interação entre óxido nítrico e SNA na hipertensão arterial [120]. O óxido nítrico endotelial atua no relaxamento do músculo liso da parede vascular causando sua dilatação, aumento do fluxo sanguíneo e redução da pressão arterial. Alterações neste processo demonstram ser um componente importante da disfunção endotelial descrito na hipertensão. Porém, o comprometimento da disponibilidade de óxido nítrico neste estudo não foi suficiente para causar disfunção endotelial e a participação do SNA foi considerada crítica para o desenvolvimento do processo fisiopatológico da hipertensão [121]. Além da disfunção endotelial, existem outros relatos de correlação entre alterações vasculares e o funcionamento do SNA. Yeragani, et al. compararam parâmetros da função vascular com medidas da VFC, em pacientes com transtornos de ansiedade, e encontraram significativa

correlação negativa entre alterações do intervalo R-R e a VOP braquial ($r = 0,4-0,65$; $p = 0,05-0,007$) [122]. A simples medida do diâmetro da artéria braquial pode ser também um indicador para risco cardiovascular e foi recentemente considerada um marcador da função vascular [123]. Recentemente, um estudo utilizando velocímetro Doppler observou dilatação da artéria braquial ao levantar as pernas a partir da posição supina, na ausência de mudanças da PA e FC. Esta dilatação pode ser explicada pelo reflexo resultante da estimulação dos receptores cardiopulmonares e nos leva a pensar que o diâmetro da artéria braquial é controlado principalmente pelo SNA [124]. Mesmo com as evidências relacionando SNA com função vascular em indivíduos saudáveis e em várias patologias, esta área permanece ainda pouco explorada. A investigação e compreensão desta interação na hipertensão arterial resistente pode fornecer uma estratificação de risco mais abrangente e uma estratégia terapêutica mais eficaz para esta condição.

2. OBJETIVOS

- 1- Verificar os padrões da VFC durante o período de 24 horas em pacientes hipertensos resistentes;
- 2- Investigar a associação entre os parâmetros da VFC e a função vascular em pacientes hipertensos resistentes;
- 3- Avaliar a associação entre os parâmetros da VFC e a obesidade na HAR.

3. CAPÍTULO I



UNICAMP

Tel: +55-19-3521-9538

Fax: +55-19-3289-2968

CARDIOVASCULAR PHARMACOLOGY
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES
STATE UNIVERSITY OF CAMPINAS - UNICAMP
P.O. BOX 6111, CAMPINAS, 13083-970, SP, BRAZIL



e-mail: hmoreno@uol.com.br
Heitor Moreno Jr., MD, PhD

14th July 2014

EDITOR-IN-CHIEF

Myron H. Weinberger

JOURNAL OF AMERICAN SOCIETY OF HYPERTENSION

Dear Dr. Myron H. Weinberger,

Please find enclosed our original manuscript “**Autonomic nervous system and vascular function in resistant hypertension**”. The paper hereby submitted follows some important publications of our group in resistant hypertension and we would like to publish it in *Journal of American Society of Hypertension* due the relevance of this syndrome.

This manuscript is original and is not under consideration by any other journal.

All authors have approved the submission of the present study in this journal. The authors Barbaro, NR and Gordo, WM contributed equally to this work. Leandro Boer-Martins is employee of Novartis Pharmaceuticals Corporation. All authors declare no conflict of interest.

Yours sincerely,

Natália Ruggeri Barbaro, PharmD, M.Sc

Wladimir M. Gordo, PharmD, M.Sc

Heitor Moreno Jr., MD, PhD

Faculty of Medical Sciences – State University of Campinas,

Cardiovascular Pharmacology and Hypertension Section

Campinas, SP, Brazil. 13081-970

e-mail: hmoreno@uol.com.br

Title: Interaction between autonomic nervous system and vascular function in resistant hypertension

Running title: Autonomic imbalance and resistant hypertension

Keywords: resistant hypertension, heart rate variability, vascular stiffness and endothelial dysfunction.

Authors: Natália Ruggeri Barbaro^{1*}; Wladimir Mignone Gordo^{1*}, Leandro Boer-Martins , Ana P. C. Faria, Rodrigo G. P. Modolo¹ , Andrea Rodrigues Sabbatini¹ , Márcio Jansen Figueiredo², Ana P. Beppler Lino², Vanessa Fontana¹ and Heitor Moreno¹

*Barbaro, NR and Gordo, WM contributed equally to this work.

Affiliations:

¹ Laboratory of Cardiovascular Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas (Unicamp), Campinas, Brazil.

² Departament of Internal Medicine. Discipline of Cardiology. Faculty of Medical Sciences, University of Campinas (Unicamp), Campinas, Brazil.

Corresponding author:

Heitor Moreno Junior, MD, PhD.

Laboratory of Cardiovascular Pharmacology– Faculty of Medical Sciences, University of Campinas. FCM 10 Building, 1st Floor. Campinas, Brazil. CEP: 13083-970

Phone: +55 19 3521 9538

email: hmoreno@uol.com.br

Introduction

Resistant hypertensive patients (RHTN) have elevated cardiovascular risk due to poor blood pressure control and high prevalence of target organ damage (TOD) [1-3]. Moreover, these patients are generally overweight or obese [4]. Further evidences indicate that either high blood pressure as obesity contribute to vascular damage [5-6]. In fact, RHTN individuals present decrease in brachial artery flow-mediated flow (FMD) and higher arterial stiffness [5], the latter is a strong and independent predictor of all-cause and cardiovascular mortality in hypertensive patients [7].

Previous data showed that sympathetic nervous system plays an important role in the blood pressure control, demonstrated by reduction on BP after renal denervation in RHTN individuals [8]. In addition, sympathetic overactivity is associated with nondipping pattern in resistant hypertension [9] and diabetic RHTN presents circadian disruption [10]. Despite the commonly held concept that cardiac autonomic dysfunction is related to the development of hypertension [11-12], how autonomic imbalance contributes its pathophysiology remains unclear. The measurement of heart rate variability (HRV) is a non-invasive method to assess autonomic nervous system, which it is evaluated by time and frequency domains [13]. Reduced HRV may indicate hyperactive sympathetic system or hypoactive parasympathetic system [9]. In addition, lower HRV was associated with increased mortality in cardiovascular diseases [14], but some studies could not find any association between risk factors and HRV [15-16].

In order to better understand the pathophysiological mechanisms among autonomic imbalance and resistant hypertension, this study aims to evaluate the association between HRV and vascular function in RHTN.

METHODS

Patient population

A cross-sectional study was performed in the Outpatient Resistant Hypertension Clinic at the Hospital of University of Campinas. Thirty-seven resistant hypertensive patients were recruited. The diagnosis of RHTN required a proper office BP measurement technique and ambulatory BP monitoring (ABPM) to confirm persistently elevated BP levels. All patients were followed and treated for a period of at least 6 months with regular scheduled appointments before characterized as resistant to treatment. We performed physical examination, complete medical history inquiry, electrocardiogram and laboratory testing in all individuals. Exclusion criteria included secondary hypertension including Conn's or Cushing's syndrome, renal artery stenosis, pheochromocytoma, coarctation of the aorta), liver and renal disease, heart failure (ejection fraction < 50%), stroke, peripheral vascular disease, smokers and in use of beta-blockers within one year.

The patients signed a written informed consent form before being enrolling in the study, which was approved by the Research Ethics Committee at the Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, São Paulo, Brazil (approval n. 400/2011) and the procedures were performed in accordance with the Declaration of Helsinki.

Blood pressure measurements

Brachial BP from each patient (SBP and DBP) was measured twice in the right arm by a trained healthcare professional, with the patient in the seated position and using a validated digital sphygmomanometer (HEM-907XL, OMRON Healthcare Inc., Bannockburn, IL, USA.). These measurements were assessed according to the AHA Scientific Statement [17].

The 24-hour ABPM was evaluated using a Spacelabs 90217 ambulatory blood pressure monitor (Spacelabs Inc, Redmon, WA, USA) [18]. Patients were instructed to keep normal daily activities and to note their sleep period in a personal diary.

Heart rate variability

Heart rate variability (HRV) parameters were derived from the simultaneous recording of 24-hour Holter ambulatory electrocardiographic /ABPM and analyzed in time and frequency domains. A three-channel, 24-hour Holter recording was obtained using the CardioMapa digital 24-hour recorder device and the CardioSmart Institutional CS 550 software (Cardio Sistemas Comércio e Industria Ltda, Sao Paulo, SP, Brazil).

Time domain HRV parameters included the following measures: standard deviation of all normal RR intervals in a 24-hour Holter recording (SDNN (ms)); standard deviation of mean RR interval in all 5-minute segments of a 24-hour recording (SDANN (ms)); square root of the mean squared differences between successive RR intervals (rMSSD (ms)); percentage of differences between successive RR intervals greater than 50 ms (pNN50 (%)).

FMD technique

Endothelial function was assessed by flow mediated dilation (FMD) technique [19]. It was used a ACUSON CV 70 ultrasound equipment with a high resolution linear vascular transducer (5–13MHz, Siemens Medical, Erlangen, Germany). The procedure followed the International Brachial Artery Reactivity Task Force guidelines [20].

PWV measurement

Pulse wave velocity was measured using the SphygmoCor System (Atcor Medical, Sydney, Australia) with the patient in the supine position. Pulse wave of the carotid and femoral arteries were analyzed estimating the delay with respect to the ECG wave. Distance measurements were taken with a measuring tape from the sternal notch to the carotid femoral recording site. Carotid-femoral PWV was calculated by dividing traveled distance by transit time ($PWV = \text{distance}/\text{time}$). We performed at least two measurements. In the case of differences higher than 0.5 m/s, a third measurement was performed. The PWV value was reported as the mean, whose values were corrected for mean arterial pressure.

Laboratory assessments

Blood samples were collected at 8:00 hour after overnight fasting. Serum cholesterol, LDL, HDL, triglycerides, glucose, aldosterone, creatinine were measured.

Statistical analysis

For database management and statistical analysis, we used GraphPad Prism 5.0. The results were expressed as the mean $\pm$ standard deviation (SD). Normality of distribution was assessed by the Kolmogorov-Smirnov test. Correlation analysis was performed using Spearman's rank test. The level of significance (α) accepted was less than 0.05.

RESULTS

General patient characteristics are shown in table 1 and biochemical parameters in table 2. Among the 37 patients, 21 were female (57%) and 16 male (43%). The average age was 57 ± 11 years, body mass index (BMI) was 30.8 ± 5.1 kg/m² and waist circumference (WC) was 100 ± 6 cm. The mean of office BP levels were SBP: 147 ± 22 and DBP: 88 ± 15 mmHg. FMD and PWV values were $7.1 \pm 1.6\%$ and 9.4 ± 1.2 m/s, respectively.

HRV parameters observed were: 24-hour-SDNN (104.6 ± 37.4 ms), 24-hour-SDANN (97.6 ± 34.4 ms), 24hour-rMSSD (26.7 ± 14.2 ms) and 24-hour-pNN50 (4.7 ± 6.2 ms). We found positive correlation between both HRV parameters - SDNN and SDANN- with FMD (figure 1), but not with PWV. In addition, only SDNN was negatively correlated with BMI and waist circumference (figure 4).

RHTN subjects were taking a mean of 4.7 antihypertensive drugs. The distribution in percentage was diuretics (100%), angiotensin receptor blocker (75.2%), calcium channel blocker (60.7%), angiotensin-converting enzyme inhibitors (30.1%), spironolactone (27.8%), and centrally acting antihypertensive drugs (6.2%).

DISCUSSION

We demonstrated that HRV parameters (SDNN and SDANN), which mainly reflect sympathetic overactivity, were associated to endothelial function in RHTN patients. Also, lower SDNN values correlated with BMI and waist circumference. These findings contribute to novel insights into the pathophysiological link between abnormal variability patterns and vascular damage in resistant hypertension. The vast majority of studies have implicated that lower values of HRV parameters are related with disability and mortality in cardiovascular diseases [14, 21]. However, whether autonomic imbalance is cause or consequence of hypertension remains unclear.

Recent trials had demonstrated that catheter-based renal sympathetic denervation can be used to reduce blood pressure in resistant hypertensive patients, which have sympathetic overactivity [8]. Although recent trial have failed to demonstrate blood pressure reduction after renal denervation, it is not discarded the technique for treatment of severe hypertension. In addition, sympathetic overactivity may interfere in several systems leading to hypertension, highlighting the importance to explore its mechanisms.

Prior study showed that reduced HRV parameters are associated with blunted nocturnal BP fall in RHTN patients [9]. In addition, we recently found that type 2 diabetic RHTN individuals (T2D RHTN) have greater autonomic imbalance evaluated by HRV parameters in time domain compared to non-diabetic patients. As expected, T2D RHTN had higher BMI in this previous work [10]. However, the involvement of autonomic imbalance with former conditions is intriguing. Indeed, a common characteristic among diabetes, hypertension and obesity is vascular injury [22]. Obese animal model developed arterial stiffness and increased blood pressure, these changes are reversed after weight loss [23].

Moreover, RHTN individuals present reduced brachial artery flow-mediated dilation (FMD) and higher arterial stiffness [5]. One mechanism that might explain the involvement between sympathetic overactivity in the pathophysiology of resistant hypertension is through vascular function. We found that HRV parameters correlate with endothelial dysfunction and BMI strengthening this relationship. In agreement with our findings, sympathetic stimulation reduced endothelial function in health volunteers, and this is reversed by α -receptor blockade [24], suggesting that abnormal variability patterns may have a causative role in vascular dysfunction.

Our findings suggest that autonomic imbalance plays a key role in RHTN condition through obesity and vascular dysfunction. In conclusion, this study provides evidence that reduced HRV parameters (SDNN and SDANN) are involved with impaired endothelial

function in resistant hypertension. Furthermore, the relationship between SNS overactivity and BMI offer an important link between obesity and vascular injury in RHTN. In this context, clinical trials are necessary to elucidate whether targeting autonomic nervous system in RHTN would improve cardiovascular outcome in above condition.

Our study had relatively small sample size due to rigorous exclusion criteria and no causation relationship can be done.

References

1. Calhoun, D.A., et al., *Refractory hypertension: determination of prevalence, risk factors, and comorbidities in a large, population-based cohort*. Hypertension, 2014. **63**(3): p. 451-8.
2. Cuspidi, C., et al., *High prevalence of cardiac and extracardiac target organ damage in refractory hypertension*. J Hypertens, 2001. **19**(11): p. 2063-70.
3. Pierdomenico, S.D., et al., *Cardiovascular outcome in treated hypertensive patients with responder, masked, false resistant, and true resistant hypertension*. Am J Hypertens, 2005. **18**(11): p. 1422-8.
4. Martins, L.C., et al., *Characteristics of resistant hypertension: ageing, body mass index, hyperaldosteronism, cardiac hypertrophy and vascular stiffness*. J Hum Hypertens, 2011. **25**(9): p. 532-8.
5. Figueiredo, V.N., et al., *Vascular stiffness and endothelial dysfunction: Correlations at different levels of blood pressure*. Blood Press, 2012. **21**(1): p. 31-8.
6. Campia, U., M. Tesaro, and C. Cardillo, *Human obesity and endothelium-dependent responsiveness*. Br J Pharmacol, 2012. **165**(3): p. 561-73.
7. Laurent, S., et al., *Aortic stiffness is an independent predictor of all-cause and cardiovascular mortality in hypertensive patients*. Hypertension, 2001. **37**(5): p. 1236-41.
8. Esler, M.D., et al., *Renal sympathetic denervation in patients with treatment-resistant hypertension (The Symplicity HTN-2 Trial): a randomised controlled trial*. Lancet, 2010. **376**(9756): p. 1903-9.
9. Salles, G.F., et al., *A reduced heart rate variability is independently associated with a blunted nocturnal blood pressure fall in patients with resistant hypertension*. J Hypertens, 2014. **32**(3): p. 644-51.
10. Boer-Martins, L., et al., *Relationship of autonomic imbalance and circadian disruption with obesity and type 2 diabetes in resistant hypertensive patients*. Cardiovasc Diabetol, 2011. **10**: p. 24.
11. Liao, D., et al., *Association of cardiac autonomic function and the development of hypertension: the ARIC study*. Am J Hypertens, 1996. **9**(12 Pt 1): p. 1147-56.
12. Singh, J.P., et al., *Reduced heart rate variability and new-onset hypertension: insights into pathogenesis of hypertension: the Framingham Heart Study*. Hypertension, 1998. **32**(2): p. 293-7.
13. Sztajzel, J., *Heart rate variability: a noninvasive electrocardiographic method to measure the autonomic nervous system*. Swiss Med Wkly, 2004. **134**(35-36): p. 514-22.
14. Thayer, J.F., S.S. Yamamoto, and J.F. Brosschot, *The relationship of autonomic imbalance, heart rate variability and cardiovascular disease risk factors*. Int J Cardiol, 2010. **141**(2): p. 122-31.
15. Kluttig, A., O. Kuss, and K.H. Greiser, *Ignoring lack of association of heart rate variability with cardiovascular disease and risk factors: response to the manuscript "The relationship of autonomic imbalance, heart rate variability cardiovascular disease risk factors" by Julian F. Thayer, Shelby S. Yamamoto, Jos F. Brosschot*. Int J Cardiol, 2010. **145**(2): p. 375-6.
16. Ziegler, D., et al., *Selective contribution of diabetes and other cardiovascular risk factors to cardiac autonomic dysfunction in the general population*. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2006. **114**(4): p. 153-9.
17. Calhoun, D.A., et al., *Resistant hypertension: diagnosis, evaluation, and treatment: a scientific statement from the American Heart Association Professional Education Committee of the Council for High Blood Pressure Research*. Circulation, 2008. **117**(25): p. e510-26.

18. Groppelli, A., et al., *Evaluation of noninvasive blood pressure monitoring devices Spacelabs 90202 and 90207 versus resting and ambulatory 24-hour intra-arterial blood pressure.* Hypertension, 1992. **20**(2): p. 227-32.
19. Celermajer, D.S., et al., *Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis.* Lancet, 1992. **340**(8828): p. 1111-5.
20. Corretti, M.C., et al., *Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force.* J Am Coll Cardiol, 2002. **39**(2): p. 257-65.
21. Kleiger, R.E., et al., *Decreased heart rate variability and its association with increased mortality after acute myocardial infarction.* Am J Cardiol, 1987. **59**(4): p. 256-62.
22. Urbina, E.M., et al., *Increased arterial stiffness is found in adolescents with obesity or obesity-related type 2 diabetes mellitus.* J Hypertens, 2010. **28**(8): p. 1692-8.
23. Weisbrod, R.M., et al., *Arterial stiffening precedes systolic hypertension in diet-induced obesity.* Hypertension, 2013. **62**(6): p. 1105-10.
24. Hijmering, M.L., et al., *Sympathetic activation markedly reduces endothelium-dependent, flow-mediated vasodilation.* J Am Coll Cardiol, 2002. **39**(4): p. 683-8.

Table 1: General characteristics of resistant hypertensive subjects

	RHTN (n=37)
Age (years)	57 ± 11
Gender (F/M)	21/16
BMI (kg/m ²)	30.8 ± 5.1
WC (cm)	100 ± 16
Office SBP (mmHg)	147 ± 22
Office DBP (mmHg)	88 ± 15
ABPM SBP (mmHg)	128 ± 27
ABPM DBP mmHg)	75 ± 16
FMD (%)	7.1 ± 1.6
PWV (m/s)	9.4 ± 1.2

Values are expressed as mean ± standard deviation. RHTN: resistant hypertension; F: female; M: male; BMI: body mass index; WC: Waist circumference; SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure; ABPM: ambulatory BP measurement; FMD: flow mediated dilation; PWV: pulse wave velocity

Table 2: Biochemical parameters of resistant hypertensive subjects

	RHTN (n=37)
Glucose (mg.dL-1)	119.3 ± 63.8
HbA1c (%)	7.1 ± 2.0
Cholesterol (mg.dL-1)	197.5 ± 34.5
LDL-c (mg.dL-1)	119.1 ± 29.8
HDL-c (mg.dL-1)	50.3 ± 10.3
Triglycerides (mg.dL-1)	139.8 ± 74.5
Creatinine (mg.dL-1)	0.9 ± 0.2
Creatinine Clearance (ml per min per 1.73m ²)	94.5 ± 16.5
Microalbuminuria, mg/24 h	18.0 ± 20.3
Na (mEq.L-1)	140.6 ± 2.1
K (mEq.L-1)	4.2 ± 0.4
Aldosterone (ng/dL)	7.4 ± 1.8

Values are expressed as mean ± standard deviation. RHTN: resistant hypertension; LDL and HDL: low- and high-density lipoproteins, respectively.

Table 3: Parameters of heart rate variability in resistant hypertensive subjects

	RHTN (n=37)
SDNN (ms)	104.6 $\pm$ 37.4
SDANN (ms)	97.6 $\pm$ 34.4
rMSSD (ms)	26.7 $\pm$ 14.2
pNN50 (ms)	4.7 $\pm$ 6.2

Values are expressed as mean $\pm$ standard deviation. RHTN: resistant hypertension; SDNN: Standard deviation of all normal RR intervals in 24-hour Holter recording; SDANN: Standard deviation of means of RR intervals in all 5-minute segments of 24-hour recording; rMSSD: Square root of the mean squared differences between successive RR intervals; pNN50: Percentage of differences between successive RR intervals that are greater than 50 ms;

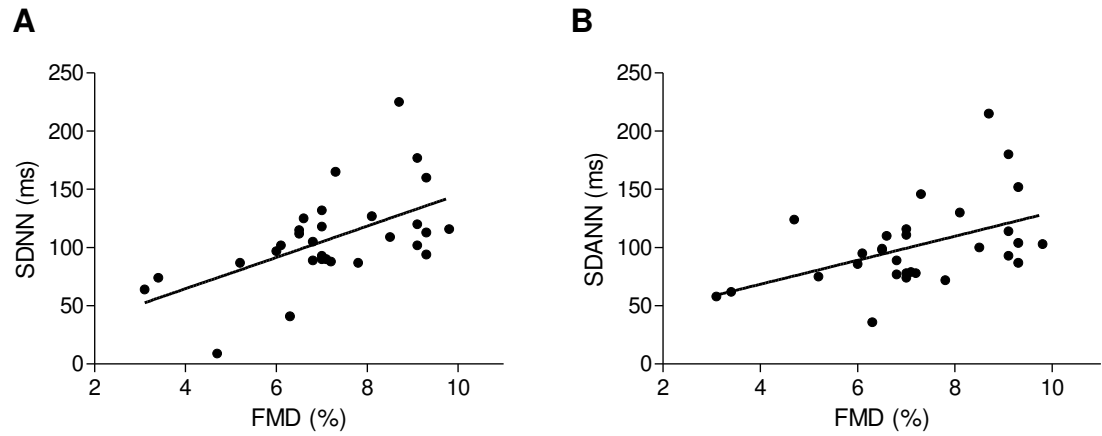


Figure 1: A- Correlation between standard deviation of normal R-R intervals (SDNN) and flow mediated dilatation (FMD) in resistant hypertensive subjects ($r = 0.56$, $p = 0.001$); B- Correlation between standard deviation of means of R-R intervals in all 5-minute segments of 24-hour recording (SDANN) and flow mediated dilatation (FMD) in resistant hypertensive subjects ($r = 0.48$, $p = 0.006$)

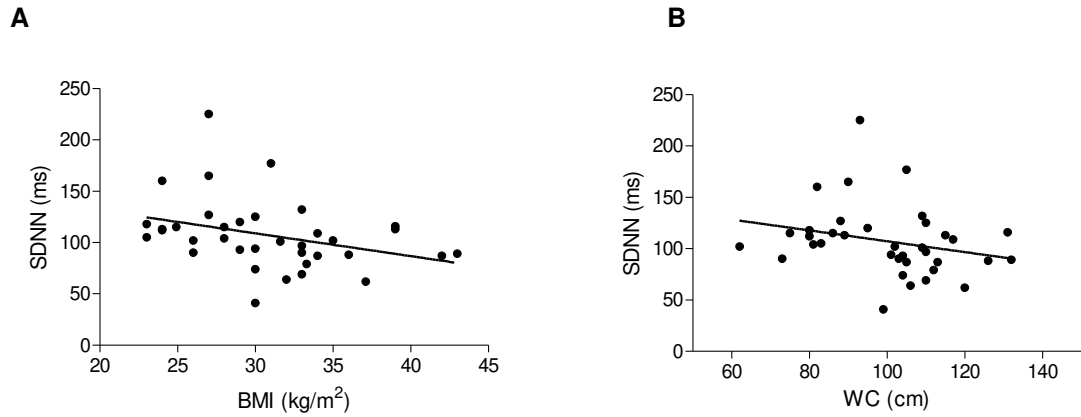


Figure 3: A) Correlation between standard deviation of normal R-R intervals (SDNN) and body mass index (BMI) in resistant hypertension subjects ($r = -0.44$, $p = 0.01$; B) Correlation between SDNN and waist circumference (WC) in resistant hypertensive subjects ($r = -0.34$, $p = 0.039$).

4. CONCLUSÕES

Os achados do presente estudo reforçam a importância da hiperatividade simpática na HAR. Além disso, a relação entre os parâmetros da VFC (SDNN e SDANN) e disfunção endotelial, IMC e circunferência abdominal sugerem potenciais mecanismos fisiopatológicos na resistência à terapia anti-hipertensiva.

5. REFERÊNCIAS

1. Oparil, S., M.A. Zaman, and D.A. Calhoun, *Pathogenesis of hypertension*. Ann Intern Med, 2003. 139(9): p. 761-76.
2. Grassi G. Sympathetic neural activity in hypertension and related diseases. Am J Hypertens. 2010 Oct;23(10):1052-60.
3. Esler M. The sympathetic system in essential hypertension. Rev Port Cardiol. 2000 Apr;19 Suppl 2:II9-14.
4. Gamboa A, Okamoto LE, Diedrich A, et al. Sympathetic activation and nitric oxide function in early hypertension. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2012; 302:H1438-43.
5. Grassi, G., et al., Sympathetic and reflex alterations in systo-diastolic and systolic hypertension of the elderly. J Hypertens, 2000. 18(5): p. 587-93.
6. Grassi, G., et al., Sympathetic and reflex abnormalities in heart failure secondary to ischaemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. Clin Sci (Lond), 2001. 101(2): p. 141-6.
7. DiBona GF, Kopp UC. Neural control of renal function. Physiol Rev 1997; 77: 75-197.
8. Krum H, Schlaich M, Whitbourn R, et al. Catheter-based renal sympathetic denervation for resistant hypertension: a multicentre safety and proof-of-principle cohort study. Lancet 2009; 373: 1275-81.
9. O'Brien E. Renal sympathetic denervation for resistant hypertension. Lancet 2009; 373:2109.
10. Krum H, Schlaich M, Whitbourn R, et al. Catheter-based renal sympathetic denervation for resistant hypertension: a multicentre safety and proof-of-principle cohort study. Lancet 2009; 373: 1275-1281.
11. Grassi G, Seravalle G, Cattaneo BM, Bolla GB, Lanfranchi A, Colombo M, et al. Sympathetic activation in obese normotensive subjects. Hypertension. 1995 Apr;25(4 Pt 1):560-3.
12. Grassi G, Dell'Oro R, Facchini A, Quarti Trevano F, Bolla GB, Mancia G. Effect of central and peripheral body fat distribution on sympathetic and baroreflex function in obese normotensives. J Hypertens. 2004 Dec;22(12):2363-9.
13. Vaz M, Jennings G, Turner A, Cox H, Lambert G, Esler M. Regional sympathetic nervous activity and oxygen consumption in obese normotensive human subjects. Circulation. 1997 Nov 18;96(10):3423-9.

14. Landsberg L. Insulin-mediated sympathetic stimulation: role in the pathogenesis of obesity-related hypertension (or, how insulin affects blood pressure, and why). *J Hypertens*. 2001 Mar;19(3 Pt 2):523-8.
15. Masuo K, Mikami H, Ogihara T, Tuck ML. Sympathetic nerve hyperactivity precedes hyperinsulinemia and blood pressure elevation in a young, nonobese Japanese population. *Am J Hypertens*. 1997 Jan;10(1):77-83.
16. Huggett RJ, Scott EM, Gilbey SG, Stoker JB, Mackintosh AF, Mary DA. Impact of type 2 diabetes mellitus on sympathetic neural mechanisms in hypertension. *Circulation*. 2003 Dec 23;108(25):3097-101.
17. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jr., et al. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA*. 2003; 289(19): 2560-72.
18. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jr., et al. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension*. 2003; 42(6): 1206-52.
19. Cesarino, C.B., et al., Prevalence and sociodemographic factors in a hypertensive population in Sao Jose do Rio Preto, Sao Paulo, Brazil. *Arq Bras Cardiol*, 2008. 91(1): p. 29-35.
20. Rosario, T.M., et al., Prevalence, control and treatment of arterial hypertension in Nobres - MT. *Arq Bras Cardiol*, 2009. 93(6): p. 622-8, 672-8.
21. Jardim, P.C., et al., High blood pressure and some risk factors in a Brazilian capital. *Arq Bras Cardiol*, 2007. 88(4): p. 452-7.
22. de Souza WA, Yugar-Toledo JC, Bergsten-Mendes G, Sabha M, Moreno H, Jr. Effect of pharmaceutical care on blood pressure control and health-related quality of life in patients with resistant hypertension. *Am J Health Syst Pharm*. 2007; 64(18): 1955-61.
23. Calhoun DA, Jones D, Textor S, Goff DC, Murphy TP, Toto RD, et al. Resistant hypertension: diagnosis, evaluation, and treatment. A scientific statement from the American Heart Association Professional Education Committee of the Council for High Blood Pressure Research. *Hypertension*. 2008; 51(6): 1403-19.
24. Lloyd-Jones DM, Evans JC, Larson MG, O'Donnell CJ, Roccella EJ, Levy D. Differential control of systolic and diastolic blood pressure : factors associated with lack of blood pressure control in the community. *Hypertension*. 2000; 36(4): 594-9.

25. Cushman WC, Ford CE, Cutler JA, Margolis KL, Davis BR, Grimm RH, et al. Success and predictors of blood pressure control in diverse North American settings: the antihypertensive and lipid-lowering treatment to prevent heart attack trial (ALLHAT). *J Clin Hypertens* (Greenwich). 2002; 4(6): 393-404.
26. Calhoun DA, Jones D, Textor S, Goff DC, Murphy TP, Toto RD, et al. Resistant hypertension: diagnosis, evaluation, and treatment: a scientific statement from the American Heart Association Professional Education Committee of the Council for High Blood Pressure Research. *Circulation*. 2008; 117(25): e510-26.
27. Joyner MJ, Charkoudian N, Wallin BG. Sympathetic nervous system and blood pressure in humans: individualized patterns of regulation and their implications. *Hypertension*. 2010; 56(1): 10-6.
28. Hart EC, Joyner MJ, Wallin BG, Johnson CP, Curry TB, Eisenach JH, et al. Age-related differences in the sympathetic-hemodynamic balance in men. *Hypertension*. 2009; 54(1): 127-33.
29. Jones PP, Shapiro LF, Keisling GA, Jordan J, Shannon JR, Quaipe RA, et al. Altered autonomic support of arterial blood pressure with age in healthy men. *Circulation*. 2001; 104(20): 2424-9.
30. Fagius J, Wallin BG. Long-term variability and reproducibility of resting human muscle nerve sympathetic activity at rest, as reassessed after a decade. *Clin Auton Res*. 1993; 3(3): 201-5.
31. Sundlof G, Wallin BG. Human muscle nerve sympathetic activity at rest. Relationship to blood pressure and age. *J Physiol*. 1978; 274: 621-37.
32. Narkiewicz K, Phillips BG, Kato M, Hering D, Bieniaszewski L, Somers VK. Gender-selective interaction between aging, blood pressure, and sympathetic nerve activity. *Hypertension*. 2005; 45(4): 522-5.
33. Calhoun DA, Jones D, Textor S, Goff DC, Murphy TP, Toto RD, et al. Resistant hypertension: diagnosis, evaluation, and treatment: a scientific statement from the American Heart Association Professional Education Committee of the Council for High Blood Pressure Research. *Circulation*. 2008; 117(25): e510-26.
34. Joyner MJ, Charkoudian N, Wallin BG. Sympathetic nervous system and blood pressure in humans: individualized patterns of regulation and their implications. *Hypertension*. 2010; 56(1): 10-6.
35. Hart EC, Joyner MJ, Wallin BG, Johnson CP, Curry TB, Eisenach JH, et al. Age-related differences in the sympathetic-hemodynamic balance in men. *Hypertension*. 2009; 54(1): 127-33.

36. Jones PP, Shapiro LF, Keisling GA, Jordan J, Shannon JR, Quaife RA, et al. Altered autonomic support of arterial blood pressure with age in healthy men. *Circulation*. 2001; 104(20): 2424-9.
37. Fagius J, Wallin BG. Long-term variability and reproducibility of resting human muscle nerve sympathetic activity at rest, as reassessed after a decade. *Clin Auton Res*. 1993; 3(3): 201-5.
38. Sundlof G, Wallin BG. Human muscle nerve sympathetic activity at rest. Relationship to blood pressure and age. *J Physiol*. 1978; 274: 621-37.
39. Narkiewicz K, Phillips BG, Kato M, Hering D, Bieniaszewski L, Somers VK. Gender-selective interaction between aging, blood pressure, and sympathetic nerve activity. *Hypertension*. 2005; 45(4): 522-5.
40. Tsioufis C, Kordalis A, Flessas D, Anastasopoulos I, Tsiachris D, Papademetriou V, et al. Pathophysiology of resistant hypertension: the role of sympathetic nervous system. *Int J Hypertens*. 2011; 2011: 642416.
41. Calhoun DA, Nishizaka MK, Zaman MA, Thakkar RB, Weissmann P. Hyperaldosteronism among black and white subjects with resistant hypertension. *Hypertension*. 2002; 40(6): 892-6.
42. Logan AG, Perlikowski SM, Mente A, Tisler A, Tkacova R, Niroumand M, et al. High prevalence of unrecognized sleep apnoea in drug-resistant hypertension. *J Hypertens*. 2001; 19(12): 2271-7.
43. Taylor AA. Autonomic control of cardiovascular function: clinical evaluation in health and disease. *J Clin Pharmacol*. 1994; 34(5): 363-74.
44. Malliani A, Pagani M, Lombardi F, Cerutti S. Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. *Circulation*. 1991; 84(2): 482-92.
45. Grassi G, Seravalle G, Mancina G. Left ventricular hypertrophy and sympathetic activity. *Adv Exp Med Biol*. 1997; 432: 173-9.
46. Greenwood JP, Scott EM, Stoker JB, Mary DA. Hypertensive left ventricular hypertrophy: relation to peripheral sympathetic drive. *J Am Coll Cardiol*. 2001 Nov 15; 38(6): 1711-7.
47. Schlaich MP, Kaye DM, Lambert E, Sommerville M, Socratous F, Esler MD. Relation between cardiac sympathetic activity and hypertensive left ventricular hypertrophy. *Circulation*. 2003 Aug 5; 108(5): 560-5.
48. Burns J, Sivananthan MU, Ball SG, Mackintosh AF, Mary DA, Greenwood JP. Relationship between central sympathetic drive and magnetic resonance imaging-determined left ventricular mass in essential hypertension. *Circulation*. 2007 Apr 17; 115(15): 1999-2005.

49. Strand AH, Gudmundsdottir H, Os I, Smith G, Westheim AS, Bjornerheim R, et al. Arterial plasma noradrenaline predicts left ventricular mass independently of blood pressure and body build in men who develop hypertension over 20 years. *J Hypertens*. 2006 May;24(5):905-13.
50. Grassi G, Seravalle G, Dell'Oro R, Trevano FQ, Bombelli M, Scopelliti F, et al. Comparative effects of candesartan and hydrochlorothiazide on blood pressure, insulin sensitivity, and sympathetic drive in obese hypertensive individuals: results of the CROSS study. *J Hypertens*. 2003 Sep;21(9):1761-9.
51. Menon DV, Arbique D, Wang Z, Adams-Huet B, Auchus RJ, Vongpatanasin W. Differential effects of chlorthalidone versus spironolactone on muscle sympathetic nerve activity in hypertensive patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009 Apr;94(4):1361-6.
52. Wray DW, Supiano MA. Impact of aldosterone receptor blockade compared with thiazide therapy on sympathetic nervous system function in geriatric hypertension. *Hypertension*. 2010 May;55(5):1217-23.
53. Calhoun DA, Jones D, Textor S, Goff DC, Murphy TP, Toto RD, et al. Resistant hypertension: diagnosis, evaluation, and treatment: a scientific statement from the American Heart Association Professional Education Committee of the Council for High Blood Pressure Research. *Circulation*. 2008 Jun 24;117(25):e510-26.
54. Scheffers IJ, Kroon AA, Schmidli J, Jordan J, Tordoir JJ, Mohaupt MG, et al. Novel baroreflex activation therapy in resistant hypertension: results of a European multi-center feasibility study. *J Am Coll Cardiol*. 2010 Oct 5;56(15):1254-8.
55. Krum H, Schlaich M, Whitbourn R, Sobotka PA, Sadowski J, Bartus K, et al. Catheter-based renal sympathetic denervation for resistant hypertension: a multicentre safety and proof-of-principle cohort study. *Lancet*. 2009 Apr 11;373(9671):1275-81.
56. Vallbo AB, Hagbarth KE, Torebjork HE, Wallin BG. Somatosensory, proprioceptive, and sympathetic activity in human peripheral nerves. *Physiol Rev*. 1979 Oct;59(4):919-57.
57. Kaye DM, Lefkovits J, Jennings GL, Bergin P, Broughton A, Esler MD. Adverse consequences of high sympathetic nervous activity in the failing human heart. *J Am Coll Cardiol*. 1995 Nov 1;26(5):1257-63.
58. Esler M, Lambert G, Jennings G. Increased regional sympathetic nervous activity in human hypertension: causes and consequences. *J Hypertens Suppl*. 1990 Dec;8(7):S53-7.
59. Esler M, Jennings G, Lambert G, Meredith I, Horne M, Eisenhofer G. Overflow of catecholamine neurotransmitters to the circulation: source, fate, and functions. *Physiol Rev*. 1990 Oct;70(4):963-85.

60. Grassi G, Esler M. How to assess sympathetic activity in humans. *J Hypertens*. 1999 Jun;17(6):719-34.
61. Grassi G, Vailati S, Bertinieri G, Seravalle G, Stella ML, Dell'Oro R, et al. Heart rate as marker of sympathetic activity. *J Hypertens*. 1998 Nov;16(11):1635-9.
62. Kopin IJ. Catecholamine metabolism: basic aspects and clinical significance. *Pharmacol Rev*. 1985 Dec;37(4):333-64.
63. Grassi G, Esler M. How to assess sympathetic activity in humans. *J Hypertens*. 1999 Jun;17(6):719-34.
64. Grassi G, Vailati S, Bertinieri G, Seravalle G, Stella ML, Dell'Oro R, et al. Heart rate as marker of sympathetic activity. *J Hypertens*. 1998 Nov;16(11):1635-9.
65. Kopin IJ. Catecholamine metabolism: basic aspects and clinical significance. *Pharmacol Rev*. 1985 Dec;37(4):333-64.
66. Grassi G, Bolla G, Seravalle G, Turri C, Lanfranchi A, Mancia G. Comparison between reproducibility and sensitivity of muscle sympathetic nerve traffic and plasma noradrenaline in man. *Clin Sci (Lond)*. 1997 Mar;92(3):285-9.
67. Kingwell BA, Thompson JM, Kaye DM, McPherson GA, Jennings GL, Esler MD. Heart rate spectral analysis, cardiac norepinephrine spillover, and muscle sympathetic nerve activity during human sympathetic nervous activation and failure. *Circulation*. 1994 Jul;90(1):234-40.
68. Eckberg DL. Sympathovagal balance: a critical appraisal. *Circulation*. 1997 Nov 4;96(9):3224-32.
69. Montano N, Ruscone TG, Porta A, Lombardi F, Pagani M, Malliani A. Power spectrum analysis of heart rate variability to assess the changes in sympathovagal balance during graded orthostatic tilt. *Circulation*. 1994; 90(4): 1826-31.
70. Sztajzel J. Heart rate variability: a noninvasive electrocardiographic method to measure the autonomic nervous system. *Swiss Med Wkly*. 2004 Sep 4;134(35-36):514-22.
71. Thayer JF, Yamamoto SS, Brosschot JF. The relationship of autonomic imbalance, heart rate variability and cardiovascular disease risk factors. *Int J Cardiol*. 2010 May 28;141(2):122-31.
72. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. *Circulation*. 1996 Mar 1;93(5):1043-65.
73. Ershler WB, Keller ET. Age-associated increased interleukin-6 gene expression, late-life diseases, and frailty. *Annu Rev Med*. 2000;51:245-70.

74. Kiecolt-Glaser JK, McGuire L, Robles TF, Glaser R. Emotions, morbidity, and mortality: new perspectives from psychoneuroimmunology. *Annu Rev Psychol.* 2002;53:83-107.
75. Stewart, A.D., et al., Acute reduction of blood pressure by nitroglycerin does not normalize large artery stiffness in essential hypertension. *Hypertension*, 2006. 48(3): p. 404-10.
76. Safar, M.E. and P. Lacolley, Disturbance of macro- and microcirculation: relations with pulse pressure and cardiac organ damage. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007. 293(1): p. H1-7.
77. Zieman, S.J., V. Melenovsky, and D.A. Kass, Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. 25(5): p. 932-43.
78. O'Rourke, M.F., et al., Pressure wave transmission along the human aorta. Changes with age and in arterial degenerative disease. *Circ Res*, 1968. 23(4): p. 567-79.
79. Aronson, D., Cross-linking of glycated collagen in the pathogenesis of arterial and myocardial stiffening of aging and diabetes. *J Hypertens*, 2003. 21(1): p. 3-12.
80. Benetos, A., et al., Determinants of accelerated progression of arterial stiffness in normotensive subjects and in treated hypertensive subjects over a 6-year period. *Circulation*, 2002. 105(10): p. 1202-7.
81. Sigrist, M., et al., Vascular calcification and cardiovascular function in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*, 2006. 21(3): p. 707-14.
82. Asmar, R.G., et al., Arterial distensibility and ambulatory blood pressure monitoring in essential hypertension. *Am J Cardiol*, 1988. 61(13): p. 1066-70.
83. Asmar, R., et al., Assessment of arterial distensibility by automatic pulse wave velocity measurement. Validation and clinical application studies. *Hypertension*, 1995. 26(3): p. 485-90.
84. Laurent, S., et al., Aortic stiffness is an independent predictor of fatal stroke in essential hypertension. *Stroke*, 2003. 34(5): p. 1203-6.
85. Blacher, J., et al., Impact of aortic stiffness on survival in end-stage renal disease. *Circulation*, 1999. 99(18): p. 2434-9.
86. Martins, L.C., et al., Characteristics of resistant hypertension: ageing, body mass index, hyperaldosteronism, cardiac hypertrophy and vascular stiffness. *J Hum Hypertens*, 2011. 25(9): p. 532-8.

87. Intengan, H.D. and E.L. Schiffrin, Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension*, 2001. 38(3 Pt 2): p. 581-7.
88. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 9265-9, 1987.
89. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-6, 1987.
90. Furchgott RF. Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite. The basis for the proposal that acid-activatable inhibitory factor from bovine retractor penis factor is inorganic nitrite and endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide. In: Vanhoutte PM (ed.). *Vasodilation*. New York, Raven, 401-4, 1988.
91. Myers PR, Guerra JR, Harrison DG. Release of NO and EDRF from cultured endothelial cells. *Am J Physiol* 256: H1030-H1037, 1989.
92. Bolotina BM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PG, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 368: 850-3, 1994.
93. Nagao T, Vanhoutte PM. Characterization of endothelium-dependent relaxations resistant to nitro-L-arginine in the porcine coronary artery. *Br J Pharmacol* 107: 1102-7, 1992.
94. Garland CJ, McPherson GA. Evidence that nitric oxide does not mediate the hyperpolarization and relaxation to acetylcholine in the rat small mesentery artery. *Br J Pharmacol* 105: 429-35, 1992.
95. Félétou M, Vanhoutte PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 23: 1082-90, 1996.
96. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332: 411-5, 1988.
97. Krieger EM, Santos RAS. Angiotensinas. Aspectos fisiológicos. *Hipertensão* 1(1): 7-10, 1998.
98. Wood AJJ. Angiotensin receptors and antagonists. *Drug Therapy* 334:1649-54, 1996.
99. Moncada S, Vane JR. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A₂ and prostacyclin. *Pharmacol Rev* 30: 293-331, 1979.

100. Côrtes SF, Andriantsitohaina R, Stoclet JC. Alterations of cyclo-oxygenase products and NO in responses to angiotensin II of resistance arteries from the spontaneously hypertensive rat. *Br J Pharmacol* 119: 1635-41, 1996.
101. Lüscher TF, Raij L, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent responses in normotensives and hypertensives Dahlrats. *Hypertension* 9: 157-63, 1987.
102. Hayakawa H, Raij L. Nitric oxide synthase activity and renal injury in genetic hypertension. *Hypertension* 31: 266-70, 1998.
103. Hayakawa H, Raij L. The link among nitric oxide synthase activity, endothelial function and aortic and ventricular hypertrophy in hypertension. *Hypertension* 29: 235-41, 1997.
104. Qiu HY, Henrion D, Benessiano J, Heymes C, Tournier B, Lévy BI. Decreased flow-induced dilation and increased production of cGMP in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 32: 1098-103, 1998.
105. Neal CR, Michel CC. Opening in frog microvascular endothelium induced by high intravascular pressures. *J Phys* 492: 39-52, 1996.
106. Wu KK, Thiagarajan P. Role of endothelium in thrombosis and hemostasis. *Ann Rev Med* 47: 315-31, 1996.
107. Chien S, Fan F, Lee MM, Handley, DA. Effects of arterial pressure on endothelial transport of macromolecules. *Biorheology* 21: 631-41, 1984.
108. Kurose I, Kubes P, Wolf R et al. Inhibition of nitric oxide production. Mechanism of vascular albumin leakage. *Circ Res* 73: 164-71, 1993.
109. De Caterina R, Basta G Dell'Omo G et al. Soluble vascular cell adhesion molecule- 1 as a biohumoral correlate of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 2646-54, 1997.
110. Sullivan GW, Sarembock IJ, Linden J. The role of inflammation in vascular diseases. *J Leuc Biol* 67: 591-602, 2000.
111. Lee AJ. The role of rheology and hemostatic factor in hypertension. *J Hum Hypertens* 11: 767-76, 1997.
112. Lip GYH. Target organ damage and the prothrombotic state in hypertension. *Hypertension* 36: 975-77, 2000.
113. Hijmering ML, Stroes ES, Olijhoek J, et al. Sympathetic activation markedly reduces endothelium-dependent, flow-mediated vasodilation. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39: 683-8.

114. Iemitsu M, Miyauchi T, Maeda S, et al. Intense exercise causes decrease in expression of both endothelial NO synthase and tissue NOx level in hearts. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000; 279: R951-9.
115. Victor RG, Leimbach WN, Seals DR, et al. Effects of the cold pressor test on muscle sympathetic nerve activity in humans. *Hypertension* 1987; 9: 429-36.
116. Thijssen DH, de Groot P, Kooijman M, et al. Sympathetic nervous system contributes to the age-related impairment of flow-mediated dilation of the superficial femoral artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291: H3122-9.
117. Watanabe S, Amiya E, Watanabe M, et al. Simultaneous heart rate variability monitoring enhances the predictive value of flow-mediated dilation in ischemic heart disease. *Circ J* 2013; 77: 1018-25.
118. Kaplon RE, Walker AE, Seals DR. Plasma norepinephrine is an independent predictor of vascular endothelial function with aging in healthy women. *J Appl Physiol* 2011; 111: 1416-21.
119. Sverrisdóttir YB, Jansson LM, Hägg U, et al. Muscle sympathetic nerve activity is related to a surrogate marker of endothelial function in healthy individuals. *PLoS ONE* 2010; 5: e9257.
120. Gamboa A, Okamoto LE, Diedrich A, et al. Sympathetic activation and nitric oxide function in early hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012; 302: H1438-43.
121. Owlya R, Vollenweider L, Trueb L, et al. Cardiovascular and sympathetic effects of nitric oxide inhibition at rest and during static exercise in humans. *Circulation* 1997; 96: 3897-903.
122. Yeragani VK, Tancer M, Seema KP, et al. Increased pulsewave velocity in patients with anxiety: implications for autonomic dysfunction. *J Psychosom Res* 2006; 61: 25-31.
123. London GM, Pannier BM, Laurent S, et al. Brachial artery diameter changes associated with cardiopulmonary baroreflex activation in humans. *Am J Physiol* 1990; 258: H773-7.
124. Graff B, Szyndler A, Czechowicz K, et al. Relationship between heart rate variability, blood pressure and arterial wall properties during air and oxygen breathing in healthy subjects. *Auton Neurosci* 2013; 178: 60-6.