



NATÁLIA RUGGERI BARBARO

BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS SOBRE A  
RIGIDEZ ARTERIAL EM HIPERTENSOS  
RESISTENTES

*INFLAMMATORY MARKERS AND ARTERIAL STIFFNESS  
IN RESISTANT HYPERTENSION*

Campinas  
2013





UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Ciências Médicas

NATÁLIA RUGGERI BARBARO

ORIENTAÇÃO: Prof. Dr. Heitor Moreno Junior.

BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS SOBRE A RIGIDEZ  
ARTERIAL EM HIPERTENSOS RESISTENTES

*INFLAMMATORY MARKERS AND ARTERIAL STIFFNESS IN  
RESISTANT HYPERTENSION*

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP para obtenção de título de Mestra em Farmacologia.

*Master's thesis submitted to the Post Graduated Study Program of Faculty of Medical Sciences, University of Campinas - UNICAMP to obtain the title of Master in Pharmacology.*

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO  
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA POR  
NATÁLIA RUGGERI BARBARO, E  
ORIENTADA PELO PROF. DR. HEITOR  
MORENO JUNIOR.

Campinas, 2013

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

B232b Barbaro, Natália Ruggeri, 1988-  
Biomarcadores inflamatórios sobre a rigidez arterial em hipertensos resistentes  
/ Natália Ruggeri Barbaro. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Heitor Moreno Junior.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de  
Ciências Médicas.

1. Hipertensão. 2. Citocinas. I. Moreno Junior, Heitor, 1958-. II. Universidade  
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Inflammatory markers and arterial stiffness in resistant hypertension

**Palavras-chave em inglês:**

Hypertension

Cytokines

**Área de concentração:** Farmacologia

**Titulação:** Mestra em Farmacologia

**Banca examinadora:**

Heitor Moreno Junior [Orientador]

Eliana Cotta de Faria

Francisco Antônio Helfenstein Fonseca

**Data de defesa:** 23-04-2013

**Programa de Pós-Graduação:** Farmacologia

---

**BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO**

**NATÁLIA RUGGERI BARBARO**

---

**ORIENTADOR: PROF. DR. HEITOR MORENO JUNIOR**

---

**MEMBROS:**

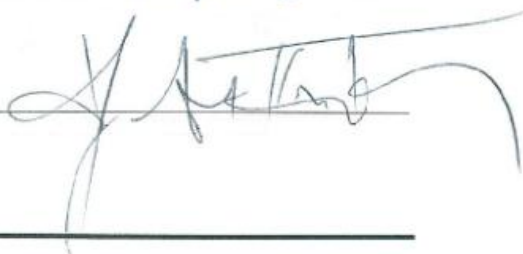
1. PROF. DR. HEITOR MORENO JUNIOR



2. PROFA. DRA. ELIANA COTTA DE FARIA



3. PROF. DR. FRANCISCO ANTONIO HELFENSTEIN FONSECA



---

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

---

Data: 23 de abril de 2013

## AGRADECIMENTOS

---

*A Deus.*

*Ao meu orientador, **Prof. Dr. Heitor Moreno Jr**, pessoa especial, grande mestre, que nos inspira pelo exemplo pessoal e profissional. Obrigada pela oportunidade, por compartilhar sua sabedoria, não só para este processo, mas para minha vida toda.*

*Aos meus pais, **Karla e José**, pelos conselhos e incentivos, pela formação que me proporcionaram e por me prepararem para encarar desafios, estando sempre ao meu lado.*

*À minha grande companheira e minha melhor amiga, minha irmã, **Daniela**, pelo apoio e amor.*

*À toda minha família, em especial à minha avó **Gilda** e minha tia **Maria da Glória**, grandes pilares em minha educação.*

*Aos meus amigos e companheiros de pesquisa do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular, **Vanessa Fontana, Ana Paula Cabral de Faria, Andrea Sabbatini, Valéria Figueiredo, Carolina de Haro Moraes, Rodrigo Modolo, Thiago Quinaglia, Rodrigo Santos e Adilson Tomaz**, por toda cooperação, pelo convívio diário e pela troca de experiências, que torna nosso grupo único, meu muito obrigado.*

*A todos os meus demais amigos, que foram um apoio imprescindível a este momento.*

*Aos pacientes e voluntários que participaram deste projeto.*

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

"Uma boa pergunta nunca é respondida completamente.  
Não é um parafuso a ser apertado, mas uma semente a ser plantada,  
que dará mais frutos, tornando verde a paisagem das idéias"

John Ciardi

# LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

---

RESUMO .....	xii
ABSTRACT .....	xiv
1. INTRODUÇÃO .....	- 17 -
1.1 Considerações Gerais .....	- 17 -
1.2 Hipertensão Arterial Resistente .....	- 19 -
1.2.1 Definição .....	- 20 -
1.2.2 Incidência e Prevalência .....	- 21 -
1.2.3 Fatores Associados e Fisiopatologia .....	- 22 -
1.2.4 Lesões de órgãos-alvo (LOA) .....	- 24 -
1.2.5 Rigidez Vascular .....	- 25 -
1.3 Inflamação na Hipertensão .....	- 26 -
1.3.1 Interleucina-6 (IL-6) .....	- 28 -
1.3.2 Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) .....	- 29 -
1.3.3 Interleucina-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) .....	- 30 -
1.3.4 Interleucina-10 (IL-10) .....	- 33 -
2. OBJETIVOS .....	- 37 -
3. CONCLUSÕES .....	- 39 -
CAPÍTULO I .....	- 41 -
REFERÊNCIAS .....	- 65 -



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

---

Ang II	Angiotensina II
ARP	Atividade de Renina Plasmática
AT1	Receptor 1 de Angiotensina II
CBM	Complexo oligomérico
DRC	Doença Renal Crônica
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EROs	Espécies reativas de oxigênio
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HAR	Hipertensão arterial resistente
HVE	Hipertrofia do ventrículo esquerdo
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1
IKK	Inibidor de quinase Kappa B
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 $\beta$
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-6R	Receptor de interleucina 6
IL-10R	Receptor de interleucina 10
IMC	Índice de massa corporal
JAK	Janus quinase
LOA	Lesões de órgãos-alvo
MAPA	Monitoração ambulatorial de pressão arterial
NF-kB	Fator de transcrição nuclear B
PA	Pressão arterial

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

---

PCR-US	Proteína C reativa ultra sensível
sIL6-R	Receptor solúvel de interleucina 6
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
SNS	Sistema nervoso simpático
SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
STAT	Transdutor de sinal e ativador de transcrição
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TNFR1	Receptor 1 de fator de necrose tumoral
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular 1
VOP	Velocidade de onda de pulso

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

---

Figura 1. Envolvimento da inflamação na hipertensão	27
Figura 2. Via de ativação clássica do NF- $\kappa$ B	32
Figura 3. Interação da IL-10 com seus receptores (IL-10R)	34
Quadro 1: Fatores contribuintes para hipertensão arterial resistente	23

### RESUMO

A inflamação tem sido associada à hipertensão arterial e lesões de órgãos-alvo, sendo que elevados níveis de biomarcadores inflamatórios como a interleucina 6 (IL-6), 10 (IL-10), 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e a proteína C reativa ultra sensível (PCR-US) têm sido relacionados à doenças cardiovasculares. Estes biomarcadores inflamatórios estão envolvidos na rigidez arterial, um importante fator de risco cardiovascular. De fato, a hipertensão arterial resistente (HAR) possui um prognóstico desfavorável atribuído ao não controle pressórico e a outros fatores de risco associados. Entretanto, ainda não foi estabelecido o perfil dessas citocinas na HAR, também não se conhece o potencial impacto desses biomarcadores inflamatórios na rigidez arterial. Este estudo transversal em 32 pacientes com HAR, 20 com hipertensão de grau leve a moderado (HAS) e 20 normotensos (NT) teve como objetivo avaliar a relação de marcadores inflamatórios com a rigidez arterial em pacientes hipertensos resistentes. Foram avaliadas as medidas de pressão arterial de consultório e rigidez arterial, através da velocidade de onda de pulso (VOP). As concentrações plasmáticas de IL-10, IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  foram determinadas por ELISA e PCR-US por nefelometria. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar os níveis de IL-6, TNF- $\alpha$  e PCR-US, assim como os valores de VOP, enquanto o teste Qui-quadrado foi utilizado para avaliação das variáveis IL-10 (<1,0 and >1,0pg/mL) e IL-1 $\beta$  (<0,012 and >0,012 pg/mL). Análise de regressão linear múltipla foi conduzida para testar se havia associação independente dos marcadores inflamatórios (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e PCR-US) com a VOP. Os grupos não apresentaram diferenças de idade, gênero e IMC. A VOP foi maior nos pacientes HAR ( $10.5 \pm 2.2$ m/s), seguidos por pacientes HAS ( $8.7 \pm 2.1$ m/s) e indivíduos NT ( $7.2 \pm 1.0$ m/s) ( $p < 0.05$ ). Os níveis de TNF- $\alpha$  (média; (95% CI)) foram significativamente maiores nos grupos HAR: 3,3 (2,19 –

4,42pg/mL) e HAS: 3,09 (2,61-3,56) comparados aos NT 1,94 (1,48 – 2,39) ( $p<0.05$ ), mas não houve diferença entre níveis de IL-6. O grupo de HAR teve maior proporção de sujeitos com níveis elevados de IL-10 (78.1% de IL-10  $>1.0$  pg/mL) comparados aos HAS (50%) e NT (20%). Além disso, a proporção de pacientes HAR com IL-1 $\beta$  aumentada também foi maior (100%) comparada aos HAS (45%) e NT (25%). Finalmente, apenas a IL-1 $\beta$  foi independentemente associada a VOP ( $p<0,001$ ;  $R^2= 0,49$ ;  $\beta=0,079$ ). Pacientes HAR apresentaram níveis aumentados de citocinas inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-10), assim como rigidez arterial. Em adição, a concentração de IL-1 $\beta$  é um fator de risco independente para rigidez arterial.

**Palavras-chave:** hipertensão arterial resistente, inflamação, citocinas, rigidez arterial.

**ABSTRACT**

Inflammation has been associated with hypertension and target organ damage and increased levels of inflammatory biomarkers such as interleukin-6 (IL-6), 10 (IL-10), 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and high sensitive C protein (hs-CRP) have been described in cardiovascular diseases. These inflammatory biomarkers are implicated in arterial stiffness, an important cardiovascular risk factor. Indeed, resistant hypertension (RHTN) leads to unfavorable prognosis attributed to poor blood pressure (BP) control and other cardiovascular risk factors. However, the potential impact of these inflammatory biomarkers on arterial stiffness in RHTN subjects has not been demonstrated. A cross-sectional study was performed in 32 RHTN, 20 mild to moderate hypertensive patients (HTN) and 20 normotensive (NT) subjects. Office BP and arterial stiffness, assessed by pulse wave velocity (PWV) were evaluated. Indeed, IL-10, IL-6, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  were determined by ELISA and hs-CRP by nephelometry. Kruskal-Wallis was used to compare levels of IL-6, TNF- $\alpha$  and hs-CRP as well as values of PWV, whereas Chi-square was used to evaluate IL-10 (<1.0 and >1.0pg/mL) and IL-1 $\beta$  (<0.012 and >0.012 pg/mL). Multiple linear regression analysis tested the association of inflammatory biomarkers (IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and hs-CRP) with PWV. No differences were observed between the 3 groups with respect to age, gender and BMI. PWV was increased in RHTN ( $10.5 \pm 2.2$ m/s) followed by HTN patients ( $8.7 \pm 2.1$ m/s) compared to NT individuals ( $7.2 \pm 1.0$ m/s) ( $p < 0.05$ ). TNF- $\alpha$  levels (mean; (95% CI)) were significantly higher in RHTN 3.3 (2.19 - 4.42pg/mL) and HTN: 3.09 (2.61-3.56) than NT subjects 1.94 (1.48 - 2.39) ( $p < 0.05$ ) but no differences were observed regarding IL-6 levels. RHTN group had higher frequency of subjects with increased levels of IL-10 (78.1% of IL-10 >1.0 pg/mL) compared with HTN (50%) and NT (20%). Moreover, RHTN had higher frequency of subjects with increased levels of IL-1 $\beta$

## ABSTRACT

---

(100%) compared to HTN (45% ) and NT (25%). Finally, IL-1 $\beta$  was independently associated to PWV ( $p < 0.001$ ;  $R^2 = 0.49$ ;  $\beta = 0.079$ ). Taken together, RHTN subjects presented increased levels of inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-10) as well as of arterial stiffness. In addition, we found that IL-1 $\beta$  levels are an independent risk factor for arterial stiffness.

**Keywords:** resistant hypertension, inflammation, cytokines, arterial stiffness.

# **1.INTRODUÇÃO**



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Considerações Gerais

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é caracterizada por níveis elevados (> 140/90mmHg) e sustentados de pressão arterial (PA). A prevalência da HAS na população brasileira é cerca de 30% [1] e a morbimortalidade relacionada a esta doença aumenta progressivamente com a elevação da PA a partir de 115/75mmHg [2].

Atualmente, há um amplo arsenal terapêutico anti-hipertensivo, porém apenas 34% dos pacientes conseguem o controle da PA segundo as metas recomendadas (<140/90mmHg) [3-4].

O insucesso do controle da PA pode ser devido a não adesão farmacológica, excesso na ingestão de sódio, sobrepeso, hipertensão secundária e uso de alguns fármacos. Estes fatores, quando identificados, podem ser tratados de maneira eficaz [4]. No entanto, uma parcela significativa de pacientes hipertensos ainda é resistente ao tratamento farmacológico, sendo classificados como hipertensos resistentes.

A hipertensão arterial resistente (HAR) é definida como a PA que permanece acima da meta pressórica apesar do uso de três agentes anti-hipertensivos de diferentes classes, em doses otimizadas, sendo um deles, diurético. Também, estão incluídos aqueles pacientes nos quais se obtém o controle da PA com quatro ou mais medicações [5].

A prevalência da HAR não está bem estabelecida, apesar de estudos observacionais estimarem que seja entre 15% e 18% [6]. Porém, análises recentes encontraram que dentre os pacientes hipertensos, apenas 3% eram resistentes [7]. Embora a prevalência varie de acordo com a população estudada, está estabelecido que esta condição clínica está

associada a uma alta prevalência de lesões de órgãos-alvo (LOA) [8] e conseqüentemente, com alto risco cardiovascular, sendo um problema clínico relevante [9-10]

Os mecanismos que levam à resistência hipertensiva não estão completamente elucidados, porém é reconhecido que este subgrupo de hipertensos tem maior risco cardiovascular tanto pelo histórico de PA elevada quanto pelas LOA [5, 8].

Primariamente, a elevação da PA induz o desenvolvimento de LOA por alterações hemodinâmicas. Essas lesões causadas pela HAS estão associadas com a mortalidade e morbidade [11]. Assim, alguns fatores afetam a gravidade dos danos desses órgãos, independentemente do nível de PA, como por exemplo, a rigidez arterial, é preditora de eventos cardiovasculares como infarto agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral [12-13], ou então o grau de hipertrofia do ventrículo esquerdo (HVE) que é modificado pela atividade SRAA [14].

A rigidez arterial ocorre como consequência das mudanças estruturais no tecido conectivo na parede vascular, porém os mecanismos envolvidos ainda não estão completamente elucidados [15]. Estudos recentes têm sugerido que na hipertensão existe uma relação entre o sistema imunológico e LOA [16-17]. Nos vasos, a inflamação aumenta a proliferação de células musculares lisas e participa no remodelamento vascular [18].

Além disso, a expressão e a concentração plasmática de alguns marcadores inflamatórios encontram-se aumentados em pacientes com doenças cardiovasculares. Essas moléculas incluem a proteína C reativa ultra-sensível (PCR-US) [19], citocinas como as interleucinas (IL-6 e IL-1 $\beta$ ), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), angiotensina II (Ang II), entre outros [20-22]. Inclusive, na HAR, foi relatada associação positiva entre a ocorrência de HVE e inflamação, expressa por níveis de PCR-US [17].

Em relação aos outros biomarcadores inflamatórios, as concentrações plasmáticas de IL-6 e TNF-  $\alpha$  foram correlacionadas com a rigidez arterial em pacientes hipertensos [20] e a IL-1 $\beta$  foi associada a mudanças nos níveis pressóricos e ocorrência de HAS, em um estudo longitudinal abordado em pacientes aparentemente saudáveis, normotensos, que foram seguidos por 6,5 anos [21].

Por outro lado, há evidências que a interleucina 10 (IL-10), exerce proteção vascular por sua ação anti-inflamatória. Na ausência de IL-10, a infusão de Ang II promoveu alteração na função vascular [23]. A IL-10 inibe a liberação de mediadores inflamatórios realizada por macrófagos e monócitos, e assim, impede a secreção de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, TNF-  $\alpha$  e IL-1 $\beta$  [24-25].

Há estudos na literatura sugerindo a relação desses biomarcadores inflamatórios na LOA e com HAS, entretanto, ainda não foi estabelecido o perfil desses biomarcadores e seu impacto sobre a rigidez vascular na HAR.

Diante de tais informações, o estudo que se segue como capítulo desta tese de mestrado (modelo alternativo) visa avaliar os níveis das citocinas inflamatórias e a rigidez arterial em hipertensos resistentes em comparação com hipertensos de grau leve a moderado e normotensos.

## 1.2 Hipertensão Arterial Resistente

No Brasil, a HAS apresenta prevalências entre 22,3% e 43,9% [26-27]. Embora existam diversos medicamentos anti-hipertensivos disponíveis, estudos revelam apenas 19,6% de controle adequado da PA nos pacientes hipertensos [27-28]. A falta de cumprimento das metas terapêuticas deve-se, em parte, a não aderência ao tratamento anti-hipertensivo [29], seja ele composto somente por mudanças no estilo de vida como redução

de ingestão de sal e álcool, perda de peso e realização de atividade física regular, ou, acrescido de terapia medicamentosa. Entretanto, existe um grupo de pacientes o qual, apesar da adequada realização das orientações e administração de múltiplos medicamentos, os níveis pressóricos mantêm-se elevados, sendo chamados de hipertensos resistentes.

### 1.2.1 Definição

Segundo a *American Heart Association* (AHA) e a *European Society of Hypertension* (ESH), HAR é definida pela PA que mantém-se 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, a AHA incluiu como hipertensos resistentes, aqueles pacientes que conseguem o controle da PA em uso de quatro ou mais fármacos anti-hipertensivos, também em doses otimizadas [5, 30].

É de extrema importância para qualquer avaliação diagnóstica excluir a presença de pseudoresistência e causas de hipertensão secundária entre indivíduos considerados hipertensos resistentes. A pseudoresistência é descrita como o aparente não controle pressórico que, na verdade, é devido a medidas inadequadas da PA, escolha terapêutica, tanto da classe de fármacos quanto de doses inapropriadas, falta de aderência ao tratamento, hipertensão do jaleco branco ou uso de alguns fármacos como anti-inflamatórios e anticoncepcionais. Já a hipertensão secundária inclui hiperaldosteronismo primário, feocromocitoma e estenose de artéria renal [4, 31]. Assim, é realizada uma intensiva orientação de aderência ao tratamento farmacológico e não farmacológico [32], bem como

a confirmação de elevados níveis pressóricos em consultório médico e também durante 24 horas realizada pela Monitoração Ambulatorial de Pressão Arterial (MAPA) [33].

O grupo de HAR representa pacientes que têm maior risco cardiovascular devido à persistência da PA elevada [5]. Uma análise epidemiológica de 90 pacientes com diagnóstico de HAR segundo a AHA, divididos em dois grupos de acordo com os níveis pressóricos, os controlados (com, no mínimo 4 fármacos) e os não controlados mostrou que no grupo de não controlados, os níveis pressóricos (pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e pressão de pulso (PP)), o índice de massa corporal (IMC), a atividade de renina plasmática (ARP), a concentração de aldosterona plasmática e a relação aldosterona/renina são significativamente maiores, quando comparados ao grupo de PA controlada [34]. Além disso, os pacientes não controlados apresentaram maior espessura de íntima-média, velocidade de onda de pulso (VOP), HVE [34-35], disfunção endotelial e menor queda noturna dos níveis pressóricos [36].

### 1.2.2 Incidência e Prevalência

A prevalência e incidência desta patologia ainda não está bem estabelecida. Recentemente, estudo demonstrou incidência de 1,9% de HAR em pacientes em seguimento por 18 meses [37].

Em relação à prevalência, o estudo de Framingham mostrou que 51% dos pacientes não atingem o controle adequado de PA [38]. Entretanto, estes altos índices estão acrescidos de má aderência e tratamento inadequado. No estudo ALLHAT, após 5 anos de seguimento, 49% dos indivíduos controlaram a PA com 1 ou 2 drogas, portanto, cerca de 50% necessitaram de 3 ou mais classes de fármacos para o tratamento [39]. Contudo, este valor deve estar superestimado, devido aos regimes terapêuticos restritos permitidos neste

estudo, além das principais associações terapêuticas utilizadas, como diuréticos tiazídicos, inibidores da enzima conversora de aniotensina (ECA) e bloqueadores de canais de cálcio não serem encorajadas [5]. Avaliações semelhantes também ocorreram no estudo ASCOT [40]. Uma análise dos pacientes do *National Health and Nutrition Examination Survey*, entre 2003 e 2008, classificou em hipertensos resistentes 12,8% dos indivíduos hipertensos [41]. Porém, ainda há controvérsias, sendo que estudo nacional demonstrou uma prevalência de apenas 3% da população de hipertensos como verdadeiramente resistentes [7].

Em resumo, embora sua prevalência varie de acordo com a população estudada e as ferramentas diagnósticas e terapêuticas utilizadas, vários estudos sugerem que a HAR é um problema clínico relevante pelo alto risco cardiovascular desses pacientes [8-9].

### 1.2.3 Fatores Associados e Fisiopatologia

A HAR apresenta uma fisiopatologia multifatorial, sendo associada à idade avançada [34] e a obesidade, que está envolvida no insucesso no controle da PA principalmente pelo aumento da atividade simpática e ativação do SRAA [34, 42-43]. Outro fator importante é a retenção hídrica, que ocorre principalmente por níveis elevados de aldosterona plasmática e relação aldosterona/renina [34, 43-45], alta ingestão de sódio [46] e doença renal crônica (DRC) [5, 34]. Adicionalmente, diabetes *mellitus* também dificulta a redução dos níveis pressóricos sanguíneos [5, 34, 47]. Ao final, a administração de outros fármacos, drogas ilícitas, álcool e outras substância exógenas também contribuem para o não controle da PA (Quadro 1) [5, 48].

## Quadro 1: Fatores contribuintes para hipertensão arterial resistente

### Fatores contribuintes

#### Expansão volêmica

Ingestão excessiva de sódio

Retenção hídrica causada por doença renal crônica

Terapia diurética inadequada

#### Obesidade/resistência insulínica

#### Substâncias exógenas

Anti-inflamatórios não-esteroidais

Contraceptivos orais

Álcool

Corticosteróides

Esteróides anabólicos

Agentes simpatomiméticos

Cafeína

Ciclosporina

Eritropoetina

Agentes quimioterápicos

Antidepressivos

Adaptado do Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure [4].

Todos estes fatores contribuintes para a resistência à terapia anti-hipertensiva mostram que a fisiopatologia da HAR deve ser avaliada através de um conjunto de alterações que contribuem para uma doença mais grave.

Portanto, presumivelmente o prognóstico dos pacientes com HAR é menos favorável, apesar de ainda não ter sido intensamente avaliado até o momento. Isso, considerando-se que a elevação dos níveis pressóricos aumenta o risco de complicações cardiovasculares de maneira linear [49] e que estes indivíduos também apresentam diversos

fatores de risco cardiovasculares associados, como idade avançada, obesidade, diabetes e DRC [50], além de LOA [8]. Em estudo prévio, a HAR foi associada a maior risco para eventos cardiovasculares (risco relativo de 1,47) [37].

### 1.2.4 Lesões de órgãos-alvo (LOA)

As LOA apresentam alta relação com a HAR [8] e são divididas em vasculares, cerebrais, cardíacas e renais. As alterações vasculares já podem estar presentes nos estágios iniciais da doença, se associando a maior grau de disfunção endotelial e aumento de biomarcadores séricos inflamatórios, que leva a rigidez vascular [34-35, 51].

Essas lesões causadas pela hipertensão estão associadas com a mortalidade e morbidade. Primariamente, a elevação da PA induz o desenvolvimento de lesão em órgãos alvo por alterações hemodinâmicas [11]. Também, identificou-se que outros fatores afetam a gravidade do efeito hipertensivo nos danos desses órgãos independentemente do nível de PA como por exemplo, a rigidez arterial, que é preditora de morte por AVC em pacientes hipertensos[12-13], o grau de HVE, que é modificado pela atividade SRAA [14] e a ingestão de sódio influencia nas alterações das arteríolas da retina em hipertensos resistentes [52].

Alterações no coração e nos vasos sanguíneos levam aos desfechos cardiovasculares, como acidente vascular encefálico e infarto do miocárdio. Nas grandes artérias, a hipertensão leva à rigidez arterial, o que causa redução da capacidade de amortecer as alterações cíclicas da pressão sanguínea nas paredes das artérias [53] constituindo um importante fator de risco de mortalidade cardiovascular em hipertensos [54].



## 1.2.5 Rigidez Vascular

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 [55]. 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 Ang II, endotelina, estresse oxidativo e óxido nítrico [56-57]. Além do próprio processo de envelhecimento das grandes artérias que resulta em menor complacência [58], patologias como o diabetes [59], hipertensão arterial [60], DRC e o tabagismo [61] participam como aceleradores desse processo.

A rigidez arterial pode ser avaliada de maneira não invasiva pela estimativa da VOP, um método simples e reprodutível [62-63]. 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 [54, 64-65]. 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 [34].

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 [66].

Porém, os mecanismos envolvidos na rigidez arterial não são totalmente explicados. Estudos recentes têm sugerido que existe uma relação entre o sistema imunológico e a hipertensão [16]. Nos vasos, a inflamação aumenta a proliferação de células musculares lisas e participa do remodelamento vascular [18], assim, biomarcadores inflamatórios podem se tornar indicadores para estratificação de risco e LOA, ou até mesmo, alvo para terapêutica.

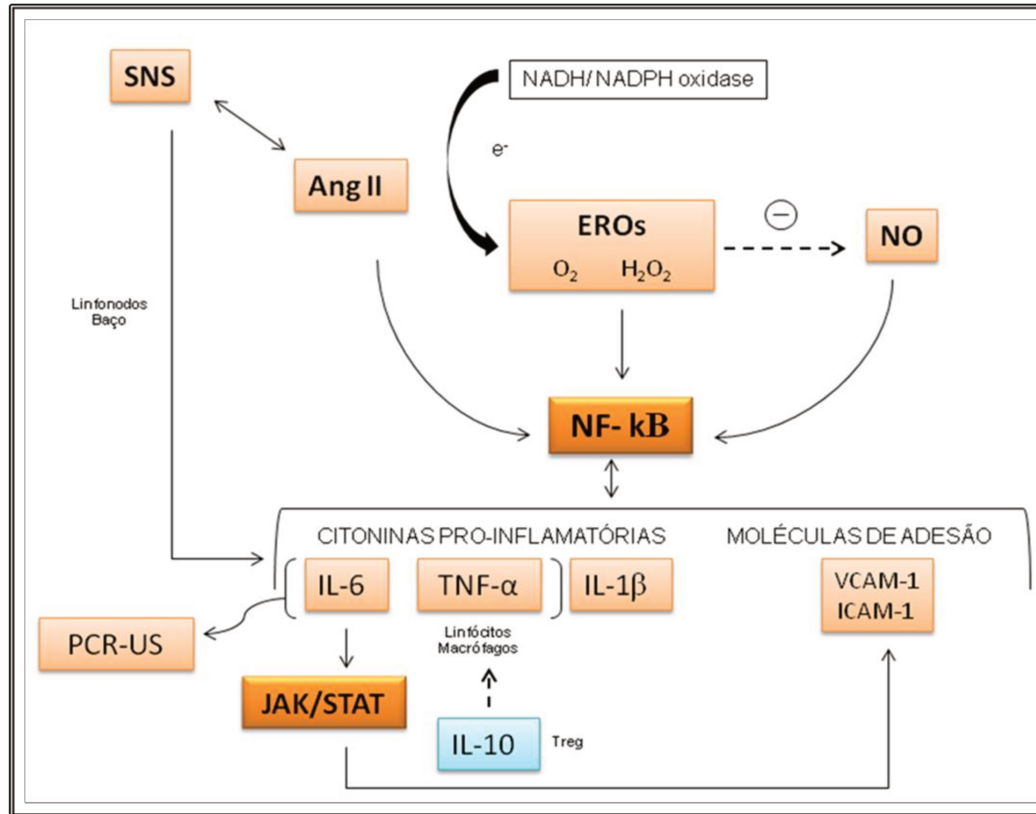
### 1.3 Inflamação na Hipertensão

A patogênese da hipertensão é conhecida como um baixo grau de inflamação. Experimentos em modelos animais de hipertensão sugerem que a hipertensão, assim como LOA decorrentes da doença, envolvem um componente inflamatório [67]. Também, estudos clínicos correlacionaram mediadores inflamatórios com os níveis de PA [68-69].

O envolvimento da inflamação na hipertensão é atribuído a diversos fatores como Ang II, citocinas, aldosterona e alterações mecânicas, que estimulam enzimas como NADPH oxidase e óxido nítrico sintase a produzir espécies reativas de oxigênio (EROs). Por sua vez, as EROs ativam fatores de transcrição, como por exemplo, o fator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), que modula a expressão de moléculas de adesão e quimiocinas as quais levam ao acúmulo de células inflamatórias nos tecidos. Essas células inflamatórias como as células T, macrófagos e monócitos secretam citocinas inflamatórias, e também, podem liberar EROs, amplificando o ambiente inflamatório (Figura 1) [70].

O sistema imune também está relacionado à hipertensão através do Sistema Nervoso Simpático (SNS), já que os linfonodos e o baço possuem inervação simpática, e assim, catecolaminas podem modular a ativação e proliferação de células T [71]. Em estudo com animais, a infusão direta de Ang II no cérebro aumentou a quantidade de linfócitos e o

perfil de citocinas inflamatórias no baço, sendo que quando realizada a desnervação do baço tais alterações desapareciam, sugerindo ser um efeito mediado por estímulo simpático [72].



**Figura 1.** Envolvimento da inflamação na hipertensão. A angiotensina II (Ang II) estimula enzimas como a NADPH oxidase a produzir espécies reativas de oxigênio (EROs), além de ativar o fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB), que modula a expressão de genes que codificam citocinas inflamatórias e moléculas de adesão. Por sua vez, essas citocinas (IL-6, TNF-α e IL-1β) também podem ativar o NF-κB. A IL-6 também regula a expressão de moléculas de adesão celular através da via de transdução JAK/STAT. Por outro lado, a IL-10, produzida por Linfócitos T regulatórios (Treg), é caracterizada por suprimir a proliferação de células T e impedir a liberação das citocinas inflamatórias. O Sistema Nervoso Simpático (SNS) pode modular a atividade e proliferação de células T através da inervação dos linfonodos e baço, ou também por ativar o Sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) desencadeando o ciclo.

Já foi descrito que a expressão e a concentração plasmática de alguns marcadores inflamatórios como PCR-US [19], IL-6, IL-1β, TNF-α, Ang II, entre outros [20-22], estão

envolvidos em doenças cardiovasculares. Por outro lado, há evidências que a IL-10 exerce proteção vascular por sua ação anti-inflamatória [23].

As citocinas são produzidas por diferentes tipos de células e são os maiores componentes na regulação das células inflamatórias. Entre elas, a IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 estão aumentadas em estados inflamatórios e têm sido reconhecidas como potenciais alvos de intervenção terapêutica [73-74].

Os pacientes HAR são um grupo de pacientes que apresenta alto risco cardiovascular e alta prevalência de LOA, portanto, investigar o perfil inflamatório e verificar se há relação dessas citocinas com LOA neste grupo de hipertensos, pode resultar em benefícios clínicos futuros para tratamento da HAR e/ou LOA.

### 1.3.1 Interleucina-6 (IL-6)

A IL-6 é um dos mediadores envolvidos na regulação da resposta imune à lesão e infecção, sendo principalmente secretada por macrófagos e linfócitos [74].

A atividade biológica da IL-6 consiste em sua ligação através de 3 sítios de ligação com o seu receptor. Portanto, a transdução do sinal da IL-6 inicia-se com a ligação da subunidade  $\alpha$  com seu receptor da membrana (IL-6R) ou a uma versão solúvel, que está presente no plasma, o sIL-6R. A associação com o receptor é capaz de desencadear a resposta desta interleucina em células que expressam a glicoproteína gp130, levando principalmente a ativação da via de transdução JAK/STAT, onde a janus quinase (JAK) é fosforilada e assim ativa o transdutor de sinal e ativador de transcrição STAT-3 [75]. Desta maneira, a IL-6 regula a expressão de moléculas de adesão celular como molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1), E-selectina e P-selectina e citocinas que levam a migração de leucócitos para os tecidos [76-

77]. Este recrutamento de leucócitos, principalmente monócitos, macrófagos e células T na parede vascular são características da inflamação vascular, sendo detectada por aumento de IL-6. Em adição, a produção de IL-6 induz a expressão de PCR e angiotensinôgenio pelos hepatócitos, que são relacionados ao risco cardiovascular [78].

A expressão de IL-6 também é regulada através do SRAA, como demonstrado em estudo clínico que através a infusão de aldosterona, a concentração de IL-6 aumentou, enquanto os níveis de IL-1 $\beta$ , IL-10 e TNF- $\alpha$  não se alteraram. Neste mesmo estudo, foi demonstrado que a IL-6 plasmática também aumentou com a infusão de Ang II, porém com a administração de antagonista de receptor mineralocorticoide (espironolactona), não houve alteração nos níveis dessa citocina, corroborando a relação do SRAA com a produção de IL-6 [79].

Em estudos observacionais, os níveis de IL-6 foram positivamente correlacionados com os níveis de PA em indivíduos saudáveis [68] e associados à VOP em pacientes hipertensos [20]. Também foi demonstrado que níveis plasmáticos de IL-6 estão associados com o aumento da prevalência de hipertensão [22]. Por outro lado, não há estudos na literatura na HAR.

### 1.3.2 Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )

O Fator-alfa de Necrose Tumoral (TNF- $\alpha$ ) foi o primeiro membro identificado de uma grande família de citocinas, sabidamente envolvidas em processos inflamatórios. É produzido principalmente por monócitos e, assim como a IL-1 $\beta$ , ativa a via clássica do NF- $\kappa$ B.

De maneira simplificada, para iniciar a sinalização celular, o TNF- $\alpha$  se liga a um receptor específico na superfície celular, chamado receptor 1 de TNF (TNFR1), que induz o

recrutamento de sinalizadores citoplasmáticos e ativam um complexo quinase de multissubunidades, o inibidor de quinase kappa B (IKK), que é composto de 2 subunidades catalíticas (IKK- $\alpha$  e  $\beta$ ) e uma subunidade regulatória (IKK- $\gamma$ ). O IKK ativado fosforila o domínio regulatório N-terminal do complexo I $\kappa$ B $\alpha$ - NF- $\kappa$ B, isto permite a proteólise do I $\kappa$ B $\alpha$ . Deste modo, o NF- $\kappa$ B é liberado e translocado para o núcleo, ativando a transcrição de proteínas, como citocinas e moléculas de adesão (Figura 2) [80].

O TNF- $\alpha$  tem sido amplamente estudado na hipertensão. Por exemplo, estudo demonstrou que o tratamento com o antagonista do TNF- $\alpha$  etanercept preveniu a hipertensão induzida por Ang II em camundongos [81]. Estudo recente de nosso laboratório demonstrou que a neutralização do TNF- $\alpha$  com o anticorpo monoclonal Infliximab preveniu o aumento da PAS e da HVE em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) [82]. Apoiando o papel desta citocina inflamatória na hipertensão, animais knockout para TNF- $\alpha$  apresentaram HVE e PA atenuadas após infusão de Ang II [83].

Portanto, o aumento da produção de TNF- $\alpha$  pode estar envolvido também nas LOA. Outra evidência na literatura demonstrou que em roedores com idade avançada houve acúmulo desta citocina nas artérias carótida, aorta e coronárias, sugerindo que os níveis elevados de TNF- $\alpha$  podem contribuir para disfunção endotelial [84-85].

As concentrações plasmáticas de IL-6 e TNF- $\alpha$  foram correlacionadas com a rigidez arterial em pacientes hipertensos [20], sendo assim potencial alvo de estudo para HAR.

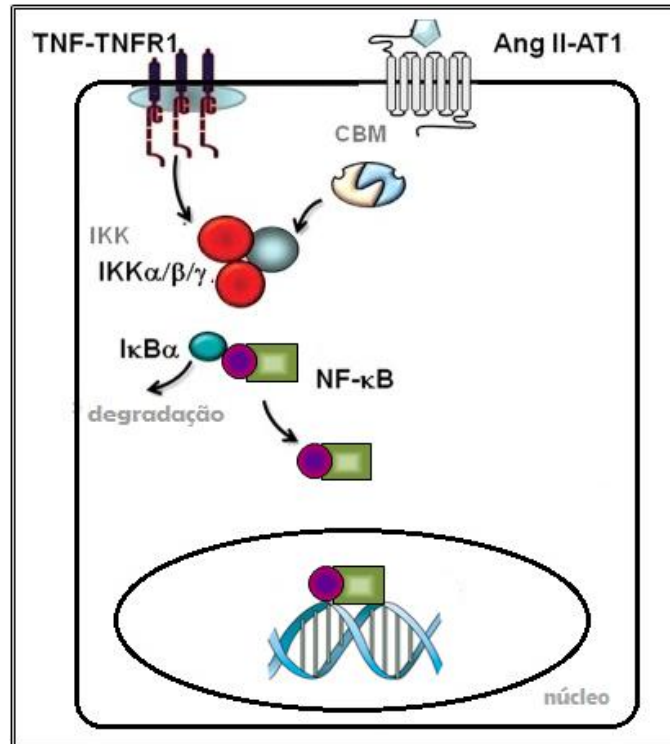
### 1.3.3 Interleucina-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )

A IL-1 $\beta$  é uma citocina pró-inflamatória produzida e secretada por linfócitos T, células dendríticas, endoteliais e epiteliais, embora a maioria dos estudos têm focado na

produção por células imunes como monócitos e macrófagos. É produzida inicialmente como um precursor, o pro-IL-1 $\beta$ , que é clivado em IL-1 $\beta$  pela protease caspase-1[86].

Estudo mostrou que a expressão e liberação de IL-1 $\beta$  em ratos SHR está aumentada devido a ativação de monócitos e células endoteliais [87]. Também, os níveis plasmáticos de IL-1 $\beta$ , assim como de IL-6 foram maiores em animais hipertensos quando comparados aos controles. Após o tratamento com anti-hipertensivos (candesartan ou a combinação de hidralazina, hidroclorotiazida e reserpina) houve a redução de ambas as concentrações destas citocinas. Porém, o grupo tratado com candesartan apresentou menores níveis de IL-1 $\beta$  e IL-6, sugerindo a participação da Ang II, através do receptor 1 de angiotensina II (AT1) na produção destas citocinas [88].

Assim, o principal mecanismo relacionando o aumento da produção de IL-1 $\beta$  na hipertensão é através da Ang II, que por sua afinidade ao receptor AT1, induz o complexo oligomérico “CBM”, que ativa a IKK e ocorre a translocação do NF-kB [80], que modula a expressão de moléculas de adesão e quimiocinas, as quais levam ao acúmulo de células inflamatórias nos tecidos (Figura 2) [80]. Em contrapartida, a IL-1 $\beta$ , juntamente com a Ang II também pode ativar o NF-kB, contribuindo para este processo [89].



**Figura 2.** Via de ativação clássica do NF-κB (Modificado de *Brasier AR*) [80]. Ativação do receptor 1 de TNF (TNFR1) via IKK. A IKK ativada é responsável pela proteólise do IκBα, liberando o NF-κB e ocorrendo sua translocação para o núcleo. Em contraste, a Ang II, via receptor AT1, ativa o complexo CBM que induz a IKK.

Além disso, a infusão de IL-1β induziu respostas vasopressoras com aumento de PA em ratos [90], evidenciando o papel desta citocina no desenvolvimento de hipertensão.

A investigação da IL-1β em humanos possui resultados controversos. Alguns estudos demonstraram que pacientes com HAS possuem maiores níveis de IL-1β [91-92], inclusive, estudo longitudinal com seguimento de 6,5 anos encontrou que as concentrações de IL-1β estão associadas às mudanças na PA e ocorrência de HAS [21]. Já outro trabalho na literatura não encontrou diferença nas concentrações de IL-1β quando comparados indivíduos hipertensos com saudáveis [93]. Portanto, o potencial papel da IL-1β na hipertensão e principalmente na HAR, assim como sua relação com a rigidez arterial ainda não foi estabelecido.

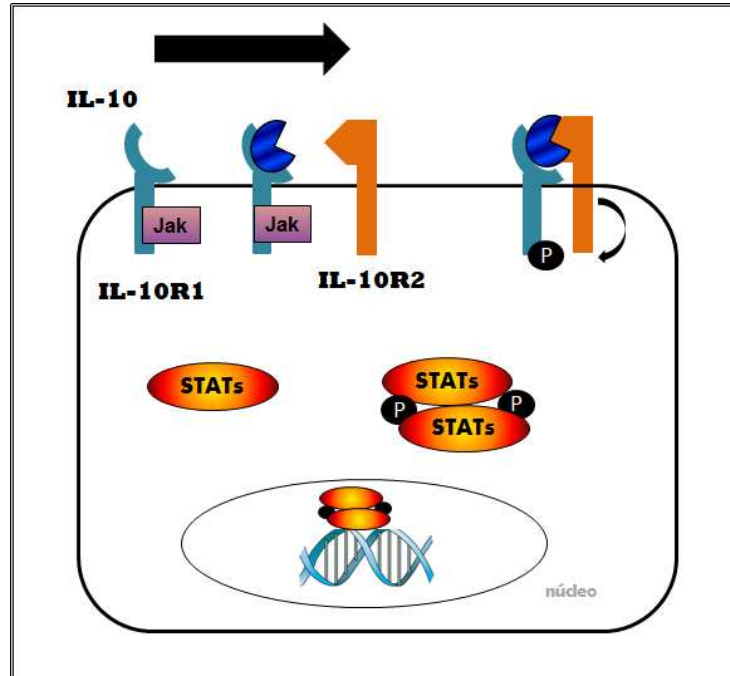


## 1.3.4 Interleucina-10 (IL-10)

Por fim, a IL-10 é uma citocina anti-inflamatória sintetizada primordialmente por linfócitos T regulatórios, através de estímulos exógenos ou endógenos [94].

Esta interleucina suprime a atividade de células imunes como macrófagos e monócitos por inibir ações como a liberação de citocinas, apresentação de antígenos e fagocitose [94]. Supõe-se que a ação da IL-10 ocorra através da via de Janus quinases (JAK) e fatores de transcrição STAT. É descrito que primeiramente a IL-10 se liga ao seu receptor IL-10R1 e essa ligação leva a uma mudança na conformação desta citocina, criando um sítio de ligação para outro receptor, o IL-10R2. Os receptores da IL-10 (IL-10R) são fosforilados pelas JAKs, permitindo a ligação de moléculas STAT, que também são fosforiladas, migram para o núcleo e promovem a transcrição dos seus genes correspondentes (Figura 3). O supressor 3 de sinalização de citocinas (SOCS3) é um dos genes cuja expressão é induzida pela IL-10 [95-96].

Ainda não se sabe ao certo se a ativação do STAT leva aos efeitos inibitórios da IL-10, pois citocinas pró-inflamatórias ativam essa mesma via. Porém, estudos têm descrito que possivelmente a IL-10 induziria a transcrição de fatores que reduziriam a transcrição de genes pelo NF-kB [97-98].



**Figura 3.** Interação da IL-10 com seus receptores (IL-10R). Adaptado de *Sabat. R. et al* [94]. A ligação da IL-10 com o sítio de ligação no receptor IL-10R1 aparentemente leva à mudanças na conformação desta citocina, criando um sítio de ligação para o receptor IL-10R2. A aproximação desses 2 receptores ativa a Janus quinase (JAK) que está associada ao IL-10R1. Após a fosforilação do receptor IL-10R1, moléculas STAT3 se ligam e são fosforiladas pela Jak, migrando para o núcleo e induzindo a transcrição de genes.

Há evidências que a IL-10 exerce proteção vascular, como foi demonstrado em ratos deficientes de IL-10 que na ausência desta citocina, o tratamento com Ang II promoveu alteração na função vascular, demonstrado através da piora no relaxamento da carótida em resposta à acetilcolina. Também foi avaliada a quantidade de EROs após a infusão de Ang II, sendo que os animais deficientes de IL-10 apresentaram o dobro de aumento de EROs quando comparados aos animais controles. Esses resultados sugerem que a IL-10 exerça efeitos protetores através da inibição de estresse oxidativo causado pela Ang II [23].

A IL-10 inibe a liberação de mediadores inflamatórios realizada por macrófagos e monócitos, e assim impede a secreção de IL-6, TNF-  $\alpha$  e IL-1 $\beta$  [24-25]. Em adição, essa

citocina aumenta a liberação de mediadores anti- inflamatórios como receptor antagonista de IL-1 e receptores solúveis de TNF-  $\alpha$  [99].

Embora seja reconhecida a possível influência dessa citocina na HAS, o assunto tem sido escassamente estudado. Tem sido proposto que a IL-10 possa agir como resposta do sistema imune na tentativa de controlar a inflamação causada pela Ang II. A explicação dessa hipótese ocorreu através da observação que os níveis de IL-10 aumentavam com a infusão de Ang II. Porém, após transferência de Linfócitos T regulatórios (Treg) houve a normalização dos níveis plasmáticos de citocinas inflamatórias (entre elas IL-6 e TNF- $\alpha$ ), e também de IL-10, bem como a supressão da infiltração de macrófagos e linfócitos. Esses eventos foram interpretados como um resultado da modulação das citocinas pró-inflamatórias pelo aumento da ação anti-inflamatória da IL-10 [100], ao passo que a produção de IL-10 por Treg já foi estabelecido [94, 101].

Estudo recente mostrou que os níveis de IL-10 eram maiores em pacientes com apneia obstrutiva do sono e hipertensos do que naqueles sem hipertensão [102].

Há estudos na literatura sugerindo a relação desses biomarcadores inflamatórios na LOA e na hipertensão, porém ainda não foi estabelecida a relação dessas citocinas com os diferentes graus de hipertensão (leve a moderada e resistente), nem o impacto da associação dessas citocinas na rigidez arterial.

## **2. OBJETIVOS**

## 2. OBJETIVOS

- 1- Determinar os níveis circulantes dos marcadores inflamatórios IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10 e PCR-US em hipertensos de graus leve e moderado e em hipertensos resistentes.
- 2- Avaliar a rigidez vascular nos diferentes grupos de hipertensos.
- 3- Verificar se há correlação entre os níveis plasmáticos desses biomarcadores com a rigidez vascular.

### **3. CONCLUSÕES**

### 3. CONCLUSÕES

Os biomarcadores inflamatórios podem estar relacionados com o grau de hipertensão e VOP, podendo a IL-1 $\beta$  predizer a rigidez vascular. Ainda, os marcadores inflamatórios elevados em HAR, apesar do uso de múltiplos anti-hipertensivos, indicam que o processo inflamatório é um importante fator envolvido na fisiopatologia da doença e no risco cardiovascular.

# CAPÍTULO I



## 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](mailto:hmoreno@uol.com.br)

Heitor Moreno Jr., MD, PhD

---

27<sup>th</sup> August 2013

**EDITOR-IN-CHIEF**

**MEDIATORS OF INFLAMMATION- HINDAWI PUBLISHING CORPORATION**

Dear editor-in-chief,

Please find enclosed our original manuscript “**INFLAMMATORY MARKERS AND ARTERIAL STIFFNESS 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 the *Mediators of Inflammation* 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 and there are no financial or other relationships that might lead to a conflict of interest.

Yours sincerely,

**Natália Ruggeri Barbaro, PharmD, MSc**

**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](mailto:hmoreno@uol.com.br)**

**Title: INFLAMMATORY MARKERS AND ARTERIAL STIFFNESS IN RESISTANT HYPERTENSION**

**Running title: Inflammatory cytokines in resistant hypertension**

**Keywords:** Resistant hypertension, arterial stiffness, inflammatory cytokines

**Authors:** Natália Ruggeri Barbaro<sup>1</sup>, Vanessa Fontana<sup>1</sup>, Ana Paula de Faria<sup>1</sup>, Rodrigo Modolo<sup>1</sup>, Andrea Rodrigues Sabbatini<sup>1</sup>, Francisco Antônio Helfenstein Fonseca<sup>2</sup>, Gabriel F. Anhô<sup>1</sup>, Heitor Moreno<sup>1</sup>

**Affiliations:**

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

<sup>2</sup> Cardiology Division, Department of Medicine, Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), São Paulo, 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

## ABSTRACT

**Background:** Inflammation is associated with hypertension and target organ damage (TOD). Increased levels of inflammatory biomarkers such as interleukin-6 (IL-6), 10 (IL-10), 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and -high sensitive C protein (hs-CRP) have been described to be involved with arterial stiffness in cardiovascular diseases. Indeed, resistant hypertension (RHTN) leads to unfavorable prognosis attributed to poor blood pressure (BP) control and TOD. However, the potential impact of inflammatory biomarkers on arterial stiffness in RHTN has not been demonstrated yet.

**Methods:** In a cross-sectional study, 32 RHTN, 20 mild to moderate hypertensive patients (HTN) and 20 normotensive (NT) subjects were subjected to office BP and arterial stiffness measurements assessed by pulse wave velocity (PWV). IL-10, IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and hs-CRP were measured in plasma samples. Kruskal-Wallis test compared levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  as well as values of PWV, whereas Chi-square test was used to evaluate IL-10 (<1.0 and >1.0pg/mL) and IL-1 $\beta$  plasma levels (<0.012 and >0.012 pg/mL). Multiple linear regression analysis tested the association of inflammatory biomarkers (IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and hs-CRP) with PWV. **Results:** No differences were observed between the groups with respect to age, gender and BMI. PWV was increased in RHTN ( $10.5 \pm 2.2$ m/s) compared with HTN ( $8.7 \pm 2.1$ m/s) and NT ( $7.2 \pm 1.0$ m/s) ( $p < 0.05$ ). TNF- $\alpha$  levels (mean; (95% CI)) were significantly higher in RHTN (3.3 (2.19 - 4.42pg/mL)) and HTN: (3.09(2.61-3.56)) than NT (NT: 1.94(1.48 - 2.39)) ( $p < 0.05$ ). No differences were observed regarding IL-6. RHTN had higher frequency of subjects with increased levels of IL-10 (78% of IL-10 >1.0 pg/mL) compared with HTN (50%) and NT (20%). Hundred percent of RHTN subjects had increased levels of IL-1 $\beta$  compared to HTN (45%) and NT (25%). Finally, IL-1 $\beta$  was independently associated to PWV ( $p < 0.001$ ;  $R^2 = 0.49$ ;  $\beta = 0.079$ ). **Conclusion:** RHTN subjects presented increased levels of inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$

and IL-10) as well as arterial stiffness and IL-1 $\beta$  levels may predict arterial stiffness. These findings suggest that inflammation plays an important role in pathophysiology of resistant hypertension.

**Keywords:** Resistant hypertension, inflammatory cytokines, arterial stiffness, pulse wave velocity.

## INTRODUCTION

Resistant hypertension (RHTN) is defined as blood pressure (BP) that remains above goals despite of the concurrent use of 3 antihypertensive agents of different classes, including a diuretic, at optimal dose amounts. Also, patients whose blood pressure are controlled but require 4 or more medications are considered resistant [1]. Increased BP leads to organ damage via hemodynamic load, and presumably, RHTN patients have unfavorable prognosis attributed to extended time of poor BP control and other associated cardiovascular risk factors [2-3].

Risk stratification in patients with arterial hypertension depends not only on BP levels but also on additional cardiovascular risk factors as well as identification of target organ damage (TOD) [4]. Arterial stiffness is a strong and independent predictor of all-cause and cardiovascular mortality in hypertensive patients [5]. The relationship between high blood pressure levels and arterial stiffness may be explained, at least in part, by inflammatory pathways [6]. In addition, it has been demonstrated that higher BP stimulates an inflammatory response through mechanical and hormonal stimuli [7].

Inflammatory biomarkers such as interleukin 6 (IL-6), interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) have been associated with hypertension and TOD [6, 8-9]. Furthermore, levels of IL-6, TNF- $\alpha$  and high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) were positively correlated with pulse wave velocity (PWV) in hypertensive subjects [6]. Moreover, hs-CRP levels were associated with left ventricular hypertrophy in RHTN [10]. On the other hand, IL-10, an anti-inflammatory cytokine [11] blunted vascular inflammation induced by angiotensin II in mice [12]. Taken together, these findings pointed out the role of these inflammatory markers on pathophysiology of hypertension.

A potential strategy for reducing TOD in hypertension may be the modulation of inflammatory cytokines. In fact, some studies have demonstrated anti-hypertensive

drugs such as angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor, angiotensin receptor blockers (ARBs) and mineralocorticoid receptor (MR) antagonist could exert beneficial cardiovascular effects due to anti-inflammatory effects [13-16].

This study compared levels of inflammatory biomarkers (IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ) and arterial stiffness between RHTN and mild to moderate hypertension subjects (HTN). Also, we investigated the potential impact of inflammatory cytokines (IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ) on arterial stiffness.

## **METHODS**

### ***Patient population***

A cross-sectional study was performed in the Outpatient Resistant Hypertension Clinic at the University of Campinas Hospital. Thirty-two patients classified as RHTN and 20 mild to moderate (stages I and II) hypertension (HTN) were recruited. In addition, 20 normotensive volunteers matched for age, gender and BMI were enrolled as control group. 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 (identifiable and removable causes of 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, obesity (BMI  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>), pregnancy or oral contraceptive use, history or clinical evidence of recent infection and use anti-inflammatory drugs.

Hypertensive patients were evaluated for adherence to treatment [17] and underwent antihypertensive therapy optimization. Also, non-pharmacologic therapies



were optimized, including salt and caloric restriction. All patients were followed and treated for a period of at least 6 months with regular scheduled appointments before characterized as resistant to treatment. The patients gave the written informed consent form before enrolling in the study approved by Research Ethics Committee at the Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, São Paulo, Brazil (approval no. 222/2011) 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 [1].

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.

### ***Laboratory assessments***

Blood samples were collected at 8:00 hour after overnight fasting. The plasma levels of cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 and TNF- $\alpha$  were determined by ELISA (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA) according to manufacturer's instructions. In addition, serum cholesterol, LDL, HDL, triglycerides, glucose, aldosterone, creatinine were measured.

## ***PWV measurement***

PWV is the “gold standard” method to evaluate arterial stiffness. This method requires little technical expertise and PWV has been employed as a marker of vascular damage in patients with cardiovascular risk factors. 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 [19]. A logarithmic transformation for PWV values was used to achieve normal distribution.

## ***Statistical analysis***

Continuous variables were expressed as means, standard deviations (SD) and 95 percent confidence intervals (95% CI). Kruskal-Wallis test was used to compare 3 groups with pos-hoc analysis done by Dunn’s multiple comparison test. Mann –Whitney test was used to compare 2 groups. IL-1 $\beta$  and IL-10 were categorized according to minimum detectable concentration, thus being <0.012pg/mL or >0.012pg/mL and <1.0pg/mL or >1.0pg/mL respectively. Categorical data were presented in percentages and compared by Chi-square test. The impact of inflammatory biomarkers (IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and hs-CRP) on the PWV was assessed through multiple linear regression analysis adjusted for age and office SBP. The level of significance ( $\alpha$ ) accepted was less than 0.05.



## RESULTS

General patient characteristics are shown in table 1. No statistical differences were observed among the groups regarding age, gender and body mass index (BMI). As expected, highest office SBP and pulse pressure (PP) were found in RHTN compared with HTN and NT subjects, but not in DBP measurements (table 1). In addition, systolic ABPM was higher in RHTN subjects compared with HTN patients. Biochemical parameters showed no differences among the 3 groups, except for glucose levels and hs-CRP, which were higher in both hypertensive groups compared to control (table 2).

RHTN patients were taking a mean of  $4.3 \pm 0.9$  anti-hypertensive drugs while HTN subjects  $2.3 \pm 0.6$  ( $p < 0.001$ ). The drugs distribution in percentage in RHTN group was 100% diuretics, 34% spironolactone, 44% angiotensin converting enzyme inhibitors (ACE inhibitors), 44% angiotensin II receptor blockers (ARBs), 84% calcium channel blocker (CCB), 84%  $\beta$ -blockers, 31% central nervous system acting antihypertensive drugs and 13% others. HTN subjects received 80% diuretics, 5% spironolactone, 40% ACE inhibitors, 30% ARBs, 30% CCB and 45%  $\beta$ -blockers. The frequency of statins use in RHTN and HTN groups were 34% and 35%, respectively ( $p > 0.05$ ).

We found a higher proportion of subjects in RHTN group with elevated IL-10 levels ( $> 1.0$  pg/mL) compared with HTN and NT (78% vs. 50% and 20%) groups. Similarly, RHTN showed higher frequency of IL-1 $\beta$  levels  $> 0.012$  pg/mL compared with HTN and NT (100% vs. 45% and 25%, respectively) (Figure 1). Mean TNF- $\alpha$  levels were significantly higher in RHTN and HTN subjects (3.3 and 3.1 pg/mL, respectively) compared to NT individuals (1.94 pg/mL) (figure 2). However, no differences were observed between the groups with respect IL-6 levels (figure 2).

PWV was higher in RHTN ( $10.5 \pm 2.2$  m/s) compared to HTN ( $8.7 \pm 2.1$  m/s) patients and both groups had higher values compared to NT individuals ( $7.2 \pm 1.0$  m/s) (figure 3). Multiple logistic regression analysis revealed that IL-1 $\beta$ , but not IL-10, TNF- $\alpha$  and hs-CRP, is predictor of PWV in all groups ( $p < 0.001$ ;  $R^2 = 0.49$ ;  $\beta = 0.079$ ) (table 3).

## DISCUSSION

To the best of our knowledge, this is the first study to evaluate the relationship between circulating levels of inflammatory cytokines on arterial stiffness in RHTN patients. We showed higher arterial stiffness (determined by PWV) in the RHTN group compared to HTN and NT groups, and IL-1 $\beta$  levels were independently associated with arterial stiffness. Also, our findings pointed out that IL-1 $\beta$  and IL-10 levels were higher in RHTN compared with mild to moderate HTN patients and NT subjects, despite of the use of multiple anti-hypertensive drugs in the former group. TNF- $\alpha$  levels were higher in both hypertensive groups compared with NT, but no differences were found between RHTN and HTN patients.

Arterial stiffness is a recognized risk factor for heart disease that can precede and thus contribute to hypertension. It occurs as consequences of structural changes in connective tissue proteins within vascular wall [20]. PWV is the “gold standard” method to evaluate arterial stiffness and strong evidences have demonstrated its predictive value for cardiovascular outcomes [19]. Our research group previously demonstrated a close relationship between high BP levels, increased PWV and endothelial dysfunction in RHTN patients when compared to well-controlled hypertensive patients [21]. This association suggests a possible role of arterial stiffness in the pathogenesis of RHTN. Previous studies highlighted that arterial stiffness and RHTN share some associated conditions such as obesity, aging, diabetes, chronic renal disease as well as isolated systolic hypertension [22-23]. We found that despite general characteristics were

similar among the three studied groups, RHTN subjects have increased arterial stiffness, suggesting other mechanisms may be associated with arterial stiffness in RHTN patients. These findings strengthen the importance to investigate other factors that can be involved in arterial stiffness in RHTN patients such as vascular inflammation.

Inflammatory responses contribute in both structural and functional changes in the arterial wall, and have been emerged as a potential determinant of arterial stiffness [6-7, 24-25]. In fact, a positive correlation between IL-6, TNF- $\alpha$  and hs-CRP with PWV in HTN has already demonstrated in essential hypertension [6]. Also, hs-CRP, which is used in clinical practice for risk stratification in cardiovascular diseases [26] was associated with target organ damage in RHTN subjects [10, 27]. Evidences showed that lowering inflammation, demonstrated through hs-CRP levels may decrease vascular events rates [28]. However, this is the first study to investigate the relationship between inflammatory cytokines and arterial stiffness in RHTN patients. Our study demonstrated that hypertensive subjects (RHTN and HTN groups) had higher hs-CRP and RHTN subjects also had increased levels of the cytokines IL-10, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . In addition we found that IL-1 $\beta$  is independently associated with arterial stiffness.

The link between inflammatory cytokines and hypertension has been showed in animal models and in human studies [9, 29-30]. Previous studies reported that TNF- $\alpha$  plasma levels are associated with elevated BP in apparently healthy subjects [8, 31]. In fact, hypertensive subjects had higher levels of TNF- $\alpha$  compared to normotensive volunteers. Supporting the role of this inflammatory cytokine in hypertension, TNF- $\alpha$  knockout mice presented cardiac hypertrophy and BP markedly attenuated after Ang II infusion [29]. In accordance with these observations, we previously demonstrated that neutralization of circulating TNF- $\alpha$  reduces blood pressure in Spontaneously Hypertensive Rats [32]. The renin-angiotensin aldosterone system (RAAS) plays an

important role in regulation of vascular tone. It is well known that Ang II is one of the major mediators of vascular remodeling in hypertension, and has pro-inflammatory properties by inducing the production of cytokines, including TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$  [15, 33]. We found that RHTN group had significantly higher number of subjects with elevated IL-1 $\beta$  levels compared with HTN and NT groups. Similarly, a longitudinal study found that higher levels of IL-1 $\beta$  and interleukin 1 receptor antagonist (IL1-ra) are associated with increases in systolic BP and the development of hypertension in normotensive subjects [9]. It was previously demonstrated that the infusion of IL-1 $\beta$  in rats induced vasopressor responses leading to BP elevation [30]. In our study, the independent association of IL-1 $\beta$  and PWV even after adjust for age and SBP, reflects the importance of this inflammatory marker in arterial stiffness development. In addition, large prospective long-term study demonstrated that IL-1ra levels are strong predictors of aortic stiffness [34]. Further supporting the cause-and-effect relationship between inflammatory pathways in artery stiffness process, an experimental study demonstrated that acute systemic inflammation increases arterial stiffness in healthy individuals [35]. Taken together, these findings provide evidence that pro-inflammation may precede or even contribute to BP elevation and arterial stiffness.

Furthermore, another component of RASS, aldosterone, causes vascular injury through inducing oxidative stress and inflammation by activate mineralocorticoid receptor (MR) [36]. Evidence in humans showed that Ang II or aldosterone infusion increases plasma IL-6 concentrations and that blockade of MR attenuates IL-6 raises during Ang II infusion [15]. We found no difference in IL-6 levels among groups and it might be explained by interference due to the higher proportion of the RHTN patients were using spironolactone, a mineralocorticoid receptor antagonist. Also, an imbalance among IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels is biologically plausible. Increases in IL-6 levels, after an induced systemic inflammatory response in healthy volunteers, were followed by unchanged levels of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  [37]. Indeed, it has been suggested that IL-6

may mediate the synthesis and release of IL-1 and TNF antagonists, counter-regulating TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels [38].

On the other hand, RHTN patients showed highest levels of an anti-inflammatory cytokine, IL-10, followed by HTN and NT subjects. The anti-inflammatory properties of IL-10 have been proposed as a systemic immune response to counteract Ang II-induced inflammation [12]. This is supported by the observation that IL-10 levels increase with the infusion of Ang II. Also, Ang II-induced hypertension was prevented and IL-10 levels were normalized after adoptive transfer of T regulatory cells in mice lacking T cells [12]. However it was demonstrated that, Ang II infusion leads to endothelial dysfunction in IL10 knockout animals, but not in controls [39]. An inverse association of IL-10 with diastolic blood pressure, endothelial dysfunction was reported in obese hypertensive subjects [40]. Our findings can be interpreted as a counter-regulation mechanism in response to the vascular inflammation in RHTN patients.

Antihypertensive agents, including angiotensin ACE inhibitors and ARBs antagonist or their combination with statins could exert beneficial anti-inflammatory effects [13-14, 16]. Nevertheless, in the present study, RHTN subjects, even taking several anti-hypertensive drugs, had higher levels of IL-1 $\beta$  and IL-10 compared to HTN, suggesting that the increased level of inflammation was not been counteracted by medications, which may be contribute to the increased cardiovascular risk in RHTN patients. In addition, our findings showed no differences between the RHTN and HTN groups with respect to TNF- $\alpha$  levels, but both groups had higher TNF- $\alpha$  levels compared to apparently healthy volunteers. Our findings suggest that these inflammatory biomarkers may be related to the degree of hypertension.

The disruption in inflammatory cytokines levels might be related to target organ damage and cardiovascular risk in resistant hypertensive patients and may be a possible therapeutic target to this condition. The importance of identifying those at risk for cardiovascular disease in order to prevent new events is emerging.



The limitations of the present study are the small number of patients enrolled and the lack of standard in the use of anti-hypertensive drugs, due to individualized care. Indeed, we cannot exclude the interference of drugs taken by the patients in inflammatory cytokines analyzed. However, the withdrawn of such medications is not feasible due to ethical concerns. Despite this limitation, RHTN patients, even on multiple antihypertensive agents, had elevated cytokine levels and higher arterial stiffness.

In summary, our study demonstrates that RHTN patients, despite of multiple anti-hypertensive therapy have increased cytokines levels compared with mild to moderate HTN and NT subjects. In addition, higher levels of IL-1 $\beta$  are associated with increased arterial stiffness and may contribute to increased cardiovascular risk. The findings of this current study need to be confirmed in prospective clinical studies using larger RHTN population.

## References

1. Calhoun, D.A., D. Jones, S. Textor, D.C. Goff, T.P. Murphy, R.D. Toto, A. White, W.C.ushman, W. White, D. Sica, K. Ferdinand, T.D. Giles, B. Falkner, and R.M. Carey, *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): p. 1403-19.
2. Martins, L.C., V.N. Figueiredo, T. Quinaglia, L. Boer-Martins, J.C. Yugar-Toledo, J.F. Martin, C. Demacq, E. Pimenta, D.A. Calhoun, and H. Moreno, Jr., *Characteristics of resistant hypertension: ageing, body mass index, hyperaldosteronism, cardiac hypertrophy and vascular stiffness*. J Hum Hypertens, 2011. **25**(9): p. 532-8.
3. Acelajado, M.C., R. Pisoni, T. Dudenbostel, L.J. Dell'Italia, F. Cartmill, B. Zhang, S.S. Cofield, S. Oparil, and D.A. Calhoun, *Refractory hypertension: definition, prevalence, and patient characteristics*. J Clin Hypertens (Greenwich), 2012. **14**(1): p. 7-12.
4. Mancia, G., S. Laurent, E. Agabiti-Rosei, E. Ambrosioni, M. Burnier, M.J. Caulfield, R. Cifkova, D. Clement, A. Coca, A. Dominiczak, S. Erdine, R. Fagard, C. Farsang, G. Grassi, H. Haller, A. Heagerty, S.E. Kjeldsen, W. Kiowski, J.M. Mallion, A. Manolis, K. Narkiewicz, P. Nilsson, M.H. Olsen, K.H. Rahn, J. Redon, J. Rodicio, L. Ruilope, R.E. Schmieder, H.A. Struijker-Boudier, P.A. van Zwieten, M. Viigimaa, and A. Zanchetti, *Reappraisal of European guidelines on hypertension management: a European Society of Hypertension Task Force document*. J Hypertens, 2009. **27**(11): p. 2121-58.
5. Laurent, S., P. Boutouyrie, R. Asmar, I. Gautier, B. Laloux, L. Guize, P. Ducimetiere, and A. Benetos, *Aortic stiffness is an independent predictor of all-cause and cardiovascular mortality in hypertensive patients*. Hypertension, 2001. **37**(5): p. 1236-41.
6. Mahmud, A. and J. Feely, *Arterial stiffness is related to systemic inflammation in essential hypertension*. Hypertension, 2005. **46**(5): p. 1118-22.
7. Chappell, D.C., S.E. Varner, R.M. Nerem, R.M. Medford, and R.W. Alexander, *Oscillatory shear stress stimulates adhesion molecule expression in cultured human endothelium*. Circ Res, 1998. **82**(5): p. 532-9.
8. Bautista, L.E., L.M. Vera, I.A. Arenas, and G. Gamarra, *Independent association between inflammatory markers (C-reactive protein, interleukin-6, and TNF-alpha) and essential hypertension*. J Hum Hypertens, 2005. **19**(2): p. 149-54.
9. Mauno, V., K. Hannu, and K. Esko, *Proinflammation and hypertension: a population-based study*. Mediators Inflamm, 2008. **2008**: p. 619704.
10. Salles, G.F., R. Fiszman, C.R. Cardoso, and E.S. Muxfeldt, *Relation of left ventricular hypertrophy with systemic inflammation and endothelial damage in resistant hypertension*. Hypertension, 2007. **50**(4): p. 723-8.
11. Leon, L.R., W. Kozak, and M.J. Kluger, *Role of IL-10 in inflammation. Studies using cytokine knockout mice*. Ann N Y Acad Sci, 1998. **856**: p. 69-75.
12. Barhoumi, T., D.A. Kasal, M.W. Li, L. Shbat, P. Laurant, M.F. Neves, P. Paradis, and E.L. Schiffrin, *T regulatory lymphocytes prevent angiotensin II-induced hypertension and vascular injury*. Hypertension, 2011. **57**(3): p. 469-76.
13. Brili, S., D. Tousoulis, C. Antoniades, C. Vasiliadou, M. Karali, N. Papageorgiou, N. Ioakeimidis, K. Marinou, E. Stefanadi, and C. Stefanadis, *Effects of ramipril on endothelial function and the expression of proinflammatory cytokines and adhesion molecules in young normotensive subjects with successfully repaired coarctation of aorta: a randomized cross-over study*. J Am Coll Cardiol, 2008. **51**(7): p. 742-9.
14. Tousoulis, D., P. Kourtelaris, C. Antoniades, C. Vasiliadou, N. Papageorgiou, C. Tentolouris, G. Siasos, E. Stefanadi, and C. Stefanadis, *Effects of irbesartan and*

- perindopril on forearm reactive hyperemia and inflammatory process, in normotensive patients with coronary artery disease.* Int J Cardiol, 2008. **124**(1): p. 127-9.
15. Luther, J.M., J.V. Gainer, L.J. Murphey, C. Yu, D.E. Vaughan, J.D. Morrow, and N.J. Brown, *Angiotensin II induces interleukin-6 in humans through a mineralocorticoid receptor-dependent mechanism.* Hypertension, 2006. **48**(6): p. 1050-7.
  16. Takagi, H., Y. Mizuno, H. Yamamoto, S.N. Goto, and T. Umemoto, *Effects of telmisartan therapy on interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha levels: a meta-analysis of randomized controlled trials.* Hypertens Res, 2012.
  17. de Souza, W.A., J.C. Yugar-Toledo, G. Bergsten-Mendes, M. Sabha, and H. Moreno, 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): p. 1955-61.
  18. GropPELLI, A., S. OmBoni, G. Parati, and G. Mancia, *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. Van Bortel, L.M., S. Laurent, P. Boutouyrie, P. Chowienczyk, J.K. Cruickshank, T. De Backer, J. Filipovsky, S. Huybrechts, F.U. Mattace-Raso, A.D. Protogerou, G. Schillaci, P. Segers, S. Vermeersch, and T. Weber, *Expert consensus document on the measurement of aortic stiffness in daily practice using carotid-femoral pulse wave velocity.* J Hypertens, 2012. **30**(3): p. 445-8.
  20. Duprez, D.A. and J.N. Cohn, *Arterial stiffness as a risk factor for coronary atherosclerosis.* Curr Atheroscler Rep, 2007. **9**(2): p. 139-44.
  21. Figueiredo, V.N., J.C. Yugar-Toledo, L.C. Martins, L.B. Martins, A.P. de Faria, C. de Haro Moraes, C. Sierra, A. Coca, and H. Moreno, *Vascular stiffness and endothelial dysfunction: Correlations at different levels of blood pressure.* Blood Press, 2012. **21**(1): p. 31-8.
  22. Pabuccu, T., N. Baris, E. Ozpelit, B. Akdeniz, and S. Guneri, *The relationship between resistant hypertension and arterial stiffness.* Clin Exp Hypertens, 2012. **34**(1): p. 57-62.
  23. Protogerou, A., J. Blacher, G.S. Stergiou, A. Achimastos, and M.E. Safar, *Blood pressure response under chronic antihypertensive drug therapy: the role of aortic stiffness in the REASON (Preterax in Regression of Arterial Stiffness in a Controlled Double-Blind) study.* J Am Coll Cardiol, 2009. **53**(5): p. 445-51.
  24. Pietri, P., G. Vyssoulis, C. Vlachopoulos, A. Zervoudaki, T. Gialernios, K. Aznaouridis, and C. Stefanadis, *Relationship between low-grade inflammation and arterial stiffness in patients with essential hypertension.* J Hypertens, 2006. **24**(11): p. 2231-8.
  25. Mattace-Raso, F.U., T.J. van der Cammen, I.M. van der Meer, M.A. Schalekamp, R. Asmar, A. Hofman, and J.C. Witteman, *C-reactive protein and arterial stiffness in older adults: the Rotterdam Study.* Atherosclerosis, 2004. **176**(1): p. 111-6.
  26. Kaptoge, S., E. Di Angelantonio, L. Pennells, A.M. Wood, I.R. White, P. Gao, M. Walker, A. Thompson, N. Sarwar, M. Caslake, A.S. Butterworth, P. Amouyel, G. Assmann, S.J. Bakker, E.L. Barr, E. Barrett-Connor, E.J. Benjamin, C. Bjorkelund, H. Brenner, E. Brunner, R. Clarke, J.A. Cooper, P. Cremer, M. Cushman, G.R. Dagenais, R.B. D'Agostino, Sr., R. Dankner, G. Davey-Smith, D. Deeg, J.M. Dekker, G. Engstrom, A.R. Folsom, F.G. Fowkes, J. Gallacher, J.M. Gaziano, S. Giampaoli, R.F. Gillum, A. Hofman, B.V. Howard, E. Ingelsson, H. Iso, T. Jorgensen, S. Kiechl, A. Kitamura, Y. Kiyohara, W. Koenig, D. Kromhout, L.H. Kuller, D.A. Lawlor, T.W. Meade, A. Nissinen, B.G. Nordestgaard, A. Onat, D.B. Panagiotakos, B.M. Psaty, B. Rodriguez, A. Rosengren, V. Salomaa, J. Kauhanen, J.T. Salonen, J.A. Shaffer, S. Shea, I. Ford, C.D. Stehouwer, T.E. Strandberg, R.W. Tipping, A. Tosetto, S. Wassertheil-Smoller, P. Wennberg, R.G.



- Westendorp, P.H. Whincup, L. Wilhelmsen, M. Woodward, G.D. Lowe, N.J. Wareham, K.T. Khaw, N. Sattar, C.J. Packard, V. Gudnason, P.M. Ridker, M.B. Pepys, S.G. Thompson, and J. Danesh, *C-reactive protein, fibrinogen, and cardiovascular disease prediction*. *N Engl J Med*, 2012. **367**(14): p. 1310-20.
27. Magen, E., J. Mishal, J. Paskin, Z. Glick, C. Yosefy, M. Kidon, and M. Schlesinger, *Resistant arterial hypertension is associated with higher blood levels of complement C3 and C-reactive protein*. *J Clin Hypertens (Greenwich)*, 2008. **10**(9): p. 677-83.
  28. Ridker, P.M., E. Danielson, F.A. Fonseca, J. Genest, A.M. Gotto, Jr., J.J. Kastelein, W. Koenig, P. Libby, A.J. Lorenzatti, J.G. MacFadyen, B.G. Nordestgaard, J. Shepherd, J.T. Willerson, and R.J. Glynn, *Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein*. *N Engl J Med*, 2008. **359**(21): p. 2195-207.
  29. Sriramula, S., M. Haque, D.S. Majid, and J. Francis, *Involvement of tumor necrosis factor-alpha in angiotensin II-mediated effects on salt appetite, hypertension, and cardiac hypertrophy*. *Hypertension*, 2008. **51**(5): p. 1345-51.
  30. Takahashi, H., M. Nishimura, M. Sakamoto, I. Ikegaki, T. Nakanishi, and M. Yoshimura, *Effects of interleukin-1 beta on blood pressure, sympathetic nerve activity, and pituitary endocrine functions in anesthetized rats*. *Am J Hypertens*, 1992. **5**(4 Pt 1): p. 224-9.
  31. Ito, H., A. Ohshima, M. Tsuzuki, N. Ohto, K. Takao, C. Hijii, M. Yanagawa, M. Ogasawara, and K. Nishioka, *Association of serum tumour necrosis factor-alpha with serum low-density lipoprotein-cholesterol and blood pressure in apparently healthy Japanese women*. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2001. **28**(3): p. 188-92.
  32. Filho, A.G., A. Kinote, D.J. Pereira, A. Renno, R.C. dos Santos, S.E. Ferreira-Melo, L.A. Velloso, S. Bordin, G.F. Anhe, and H. Moreno Junior, *Infliximab prevents increased systolic blood pressure and upregulates the AKT/eNOS pathway in the aorta of spontaneously hypertensive rats*. *Eur J Pharmacol*, 2013. **700**(1-3): p. 201-9.
  33. Rosa, A.C., L. Rattazzi, G. Miglio, M. Collino, and R. Fantozzi, *Angiotensin II induces tumor necrosis factor-alpha expression and release from cultured human podocytes*. *Inflamm Res*, 2012. **61**(4): p. 311-7.
  34. Johansen, N.B., D. Vistisen, E.J. Brunner, A.G. Tabak, M.J. Shipley, I.B. Wilkinson, C.M. McEniery, M. Roden, C. Herder, M. Kivimaki, and D.R. Witte, *Determinants of aortic stiffness: 16-year follow-up of the Whitehall II study*. *PLoS One*, 2012. **7**(5): p. e37165.
  35. Vlachopoulos, C., I. Dima, K. Aznaouridis, C. Vasiliadou, N. Ioakeimidis, C. Aggeli, M. Toutouza, and C. Stefanadis, *Acute systemic inflammation increases arterial stiffness and decreases wave reflections in healthy individuals*. *Circulation*, 2005. **112**(14): p. 2193-200.
  36. Briet, M. and E.L. Schiffrin, *Vascular Actions of Aldosterone*. *J Vasc Res*, 2012. **50**(2): p. 89-99.
  37. Hingorani, A.D., J. Cross, R.K. Kharbanda, M.J. Mullen, K. Bhagat, M. Taylor, A.E. Donald, M. Palacios, G.E. Griffin, J.E. Deanfield, R.J. MacAllister, and P. Vallance, *Acute systemic inflammation impairs endothelium-dependent dilatation in humans*. *Circulation*, 2000. **102**(9): p. 994-9.
  38. Tilg, H., E. Trehu, M.B. Atkins, C.A. Dinarello, and J.W. Mier, *Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55*. *Blood*, 1994. **83**(1): p. 113-8.
  39. Didion, S.P., D.A. Kinzenbaw, L.I. Schrader, Y. Chu, and F.M. Faraci, *Endogenous interleukin-10 inhibits angiotensin II-induced vascular dysfunction*. *Hypertension*, 2009. **54**(3): p. 619-24.

40. Fonseca, H.A., F.A. Fonseca, A.M. Monteiro, H.T. Bianco, P. Boschcov, S.A. Brandao, L. Juliano, M. Gidlund, and M.C. Izar, *Obesity Modulates the Immune Response to Oxidized LDL in Hypertensive Patients*. Cell Biochem Biophys, 2013.

Table 1: General characteristics of normotensive, mild to moderate hypertensive and resistant hypertensive subjects.

	RHTN (n=32)	HTN (n=20)	NT (n=20)	p- value
Age (years)	57.4 ± 12.9	55.1 ± 12.0	51.7 ± 5.0	0.075
Gender(F/M)	19/13	13/7	9/11	0.413
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26.3 ± 2.9	26.9 ± 2.2	25.1 ± 2.3	0.103
Office SBP (mmHg)	146 ± 16 * #	131 ± 8	121 ± 14	<0.001
Office DBP (mmHg)	86 ± 14	80 ± 7	78 ± 8	0.198
Office PP (mmHg)	61 ± 13 * #	51 ± 8	43 ± 9	<0.001
ABPM SBP (mmHg)	131 ± 13 #	123 ± 1	-	0.014
ABPM DBP mmHg)	81 ± 12	76 ± 7	-	0.165
ABPM PP (mmHg)	51 ± 10	47 ± 8	-	0.156
PWV (m/s)	10.5 ± 2.2 * #	8.7 ± 2.1*	7.2 ± 1.0	<0.001

Values are expressed as mean ± standard deviation.

NT: normotensive subjects; HTN: mild to moderate hypertension; RHTN: resistant hypertension; F: female; M: male; BMI: body mass index; SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure; PP: pulse pressure; PWV: pulse wave velocity; ABPM: ambulatory BP measurement

\* vs. NT; # vs. HTN

Table 2: Biochemical parameters of normotensive, mild to moderate hypertensive and resistant hypertensive subjects.

	RHTN (n=32)	HTN (n=20)	NT (N=20)	p- value
Glucose (mg.dL <sup>-1</sup> )	94.3 ± 11.3 *	95.0 ± 10.5 *	83.2 ± 7.9	<0.001
Cholesterol (mg.dL <sup>-1</sup> )	194.8 ± 50.3	204.1 ± 36.3	207.2 ± 37.2	0.882
HDL-c (mg.dL <sup>-1</sup> )	49.8 ± 10.7	45.3 ± 13.6	46.8 ± 10.0	0.359
LDL-c (mg.dL <sup>-1</sup> )	123.9 ± 30.1	125.1 ± 28.3	120.8 ± 37.0	0.725
Triglycerides (mg.dL <sup>-1</sup> )	141.6 ± 77.1	162.9 ± 86.3	129.0 ± 45.2	0.437
Creatinine (mg.dL <sup>-1</sup> )	1.1 ± 0.3	0.9 ± 0.3	0.9 ± 0.1	0.102
Creatinine clearance (ml per min per 1.73m <sup>2</sup> )	83.2 ± 40.9	89.8 ± 31.4	90.5 ± 15.5	0.182
Urine sodium excretion (mEq/24hrs)	199.5 ± 79.7	183.9 ± 58.9	197.5 ± 37.8	0.467
hs-CRP (mg/L)	3.58 ± 4.26 *	3.55 ± 2.69 *	1.42 ± 2.2	<0.001
Aldosterone (ng/dL)	10.3 ± 8.4	10.0 ± 9.2	6.6 ± 2.0	0.911
PRA (ng.mL <sup>-1</sup> per h)	8.1 ± 8.5	16.4 ± 25.2 *	2.9 ± 1.3	0.015
ARR (ng.dL <sup>-1</sup> per ng.mL <sup>-1</sup> per h)	2.7 ± 3.6	1.9 ± 1.8	2.7 ± 1.4	0.114

Values are expressed as mean ± standard deviation.

NT: normotensive subjects ; HTN: mild to moderate hypertension; RHTN: resistant hypertension; LDL and HDL: low- and high-density lipoproteins, respectively; hs-CRP: high sensitivity; PRA: plasma renin activity; ARR: aldosterone–renin ratio.

\* vs. NT; # vs. HTN

Table 3: Multivariate linear regression analysis for the associations between inflammatory biomarkers (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and hs-CRP) and arterial stiffness of normotensive, mild to moderate hypertensive and resistant hypertensive subjects.

	$\beta$	SE	P-value
IL-1 $\beta$	0.079	0.022	<0.001*
IL-10	0.012	0.020	0.554
TNF- $\alpha$	0.002	0.004	0.640
hs-CRP	0.036	0.027	0.186
Age (years)	0.003	0.0008	<0.001*
Office SBP	0.001	0.0005	0.033*

R=0.7; R<sup>2</sup>= 0.49; adjusted R<sup>2</sup> = 0.45;  $\beta$ : beta coefficient; SE: standard error; SBP: systolic blood pressure, n=72.

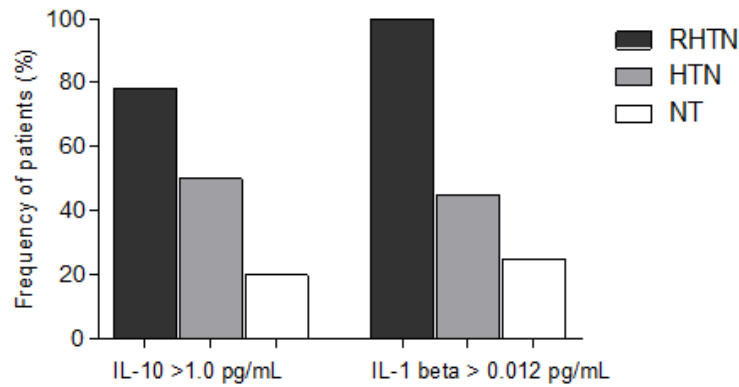


Figure 1: Frequency of patients according IL-1 $\beta$  and IL-10 levels in normotensive, mild to moderate hypertensive and resistant hypertensive subjects. (NT: normotensive; HTN: mild to moderate hypertension and RHTN: resistant hypertension).

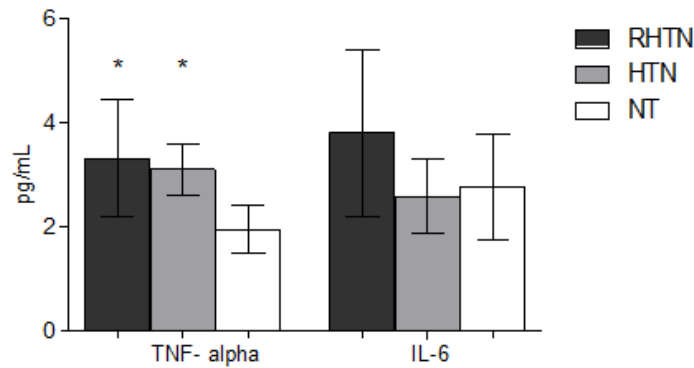


Figure 2: Comparison between TNF- $\alpha$  and IL-6 levels in normotensive, mild to moderate hypertensive and resistant hypertensive subjects. (mean (95%CI)

NT: normotensive; HTN: mild to moderate hypertension and RHTN: resistant hypertension).

$p < 0.05$ . \* vs. NT

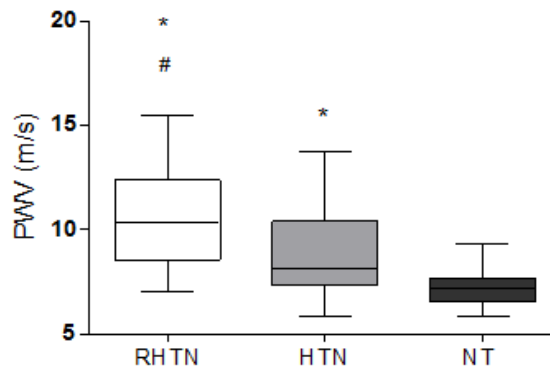


Figure 3: Arterial stiffness (PWV) in normotensive (NT), mild to moderate hypertensive (HTN) and resistant hypertensive subjects (RHTN).

$p < 0.05$ . \* vs. NT; # vs. HTN

## REFERÊNCIAS



## REFERÊNCIAS

1. Brandão AA, R.C., Consolim-Colombo F, Plavnik FL, Malachias MVB, Kohlmann Junior O, et al. , [III Guidelines of Sociedade Brasileira de Cardiologia on the exercise test]. Arq Bras Cardiol, 2010. **95**(5 Suppl 1): p. 1-26.
2. V Diretrizes Brasileiras de Hipertensao Arterial. Arq Bras Cardiol, 2007. **89**(3): p. e24-79.
3. Burt, V.L., et al., *Trends in the prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in the adult US population. Data from the health examination surveys, 1960 to 1991.* Hypertension, 1995. **26**(1): p. 60-9.
4. Chobanian, A.V., et al., *Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure.* Hypertension, 2003. **42**(6): p. 1206-52.
5. 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.* Hypertension, 2008. **51**(6): p. 1403-19.
6. Epstein, M., *Resistant hypertension: prevalence and evolving concepts.* J Clin Hypertens (Greenwich), 2007. **9**(1 Suppl 1): p. 2-6.
7. Massierer, D., et al., *Prevalence of resistant hypertension in non-elderly adults: prospective study in a clinical setting.* Arq Bras Cardiol, 2012. **99**(1): p. 630-5.
8. Cuspidi, C., et al., *High prevalence of cardiac and extracardiac target organ damage in refractory hypertension.* J Hypertens, 2001. **19**(11): p. 2063-70.
9. Sarafidis, P.A., *Epidemiology of resistant hypertension.* J Clin Hypertens (Greenwich), 2011. **13**(7): p. 523-8.
10. Roberie, D.R. and W.J. Elliott, *What is the prevalence of resistant hypertension in the United States?* Curr Opin Cardiol, 2012. **27**(4): p. 386-91.
11. Lopez, A.D., et al., *Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data.* Lancet, 2006. **367**(9524): p. 1747-57.
12. Laurent, S., et al., *Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications.* Eur Heart J, 2006. **27**(21): p. 2588-605.
13. Vlachopoulos, C., K. Aznaouridis, and C. Stefanadis, *Prediction of cardiovascular events and all-cause mortality with arterial stiffness: a systematic review and meta-analysis.* J Am Coll Cardiol, 2010. **55**(13): p. 1318-27.
14. Schmieder, R.E., *The role of non-haemodynamic factors of the genesis of LVH.* Nephrol Dial Transplant, 2005. **20**(12): p. 2610-2.
15. Duprez, D.A. and J.N. Cohn, *Arterial stiffness as a risk factor for coronary atherosclerosis.* Curr Atheroscler Rep, 2007. **9**(2): p. 139-44.
16. Libby, P., P.M. Ridker, and A. Maseri, *Inflammation and atherosclerosis.* Circulation, 2002. **105**(9): p. 1135-43.
17. Salles, G.F., et al., *Relation of left ventricular hypertrophy with systemic inflammation and endothelial damage in resistant hypertension.* Hypertension, 2007. **50**(4): p. 723-8.
18. Virdis, A. and E.L. Schiffrin, *Vascular inflammation: a role in vascular disease in hypertension?* Curr Opin Nephrol Hypertens, 2003. **12**(2): p. 181-7.
19. Blake, G.J. and P.M. Ridker, *Novel clinical markers of vascular wall inflammation.* Circ Res, 2001. **89**(9): p. 763-71.

20. Mahmud, A. and J. Feely, *Arterial stiffness is related to systemic inflammation in essential hypertension*. Hypertension, 2005. **46**(5): p. 1118-22.
21. Mauno, V., K. Hannu, and K. Esko, *Proinflammation and hypertension: a population-based study*. Mediators Inflamm, 2008. **2008**: p. 619704.
22. Bautista, L.E., et al., *Independent association between inflammatory markers (C-reactive protein, interleukin-6, and TNF-alpha) and essential hypertension*. J Hum Hypertens, 2005. **19**(2): p. 149-54.
23. Didion, S.P., et al., *Endogenous interleukin-10 inhibits angiotensin II-induced vascular dysfunction*. Hypertension, 2009. **54**(3): p. 619-24.
24. de Waal Malefyt, R., et al., *Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes*. J Exp Med, 1991. **174**(5): p. 1209-20.
25. Fiorentino, D.F., et al., *IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages*. J Immunol, 1991. **147**(11): p. 3815-22.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. de Souza, W.A., et al., *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): p. 1955-61.
30. Mancia, G., et al., *2007 Guidelines for the Management of Arterial Hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC)*. J Hypertens, 2007. **25**(6): p. 1105-87.
31. Pimenta, E., D.A. Calhoun, and S. Oparil, *Mechanisms and treatment of resistant hypertension*. Arq Bras Cardiol, 2007. **88**(6): p. 683-92.
32. de Souza, W.A., et al., *Intensive monitoring of adherence to treatment helps to identify "true" resistant hypertension*. J Clin Hypertens (Greenwich), 2009. **11**(4): p. 183-91.
33. White, W.B., *Ambulatory blood pressure monitoring as an investigative tool for characterizing resistant hypertension and its rational treatment*. J Clin Hypertens (Greenwich), 2007. **9**(1 Suppl 1): p. 25-30.
34. 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.
35. 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.
36. Quinaglia, T., et al., *Non-dipping pattern relates to endothelial dysfunction in patients with uncontrolled resistant hypertension*. J Hum Hypertens, 2011. **25**(11): p. 656-64.
37. Daugherty, S.L., et al., *Incidence and prognosis of resistant hypertension in hypertensive patients*. Circulation, 2012. **125**(13): p. 1635-42.
38. Lloyd-Jones, D.M., et al., *Differential control of systolic and diastolic blood pressure : factors associated with lack of blood pressure control in the community*. Hypertension, 2000. **36**(4): p. 594-9.

39. Cushman, W.C., et al., *Blood pressure control by drug group in the Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial (ALLHAT)*. J Clin Hypertens (Greenwich), 2008. **10**(10): p. 751-60.
40. Gupta, A.K., et al., *Baseline predictors of resistant hypertension in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcome Trial (ASCOT): a risk score to identify those at high-risk*. J Hypertens, 2011. **29**(10): p. 2004-13.
41. Persell, S.D., *Prevalence of resistant hypertension in the United States, 2003-2008*. Hypertension, 2011. **57**(6): p. 1076-80.
42. Hall, J.E., *The kidney, hypertension, and obesity*. Hypertension, 2003. **41**(3 Pt 2): p. 625-33.
43. Ubaid-Girioli, S., et al., *Aldosterone excess or escape: Treating resistant hypertension*. J Clin Hypertens (Greenwich), 2009. **11**(5): p. 245-52.
44. Nishizaka, M.K., et al., *Validity of plasma aldosterone-to-renin activity ratio in African American and white subjects with resistant hypertension*. Am J Hypertens, 2005. **18**(6): p. 805-12.
45. Gaddam, K., et al., *Rapid reversal of left ventricular hypertrophy and intracardiac volume overload in patients with resistant hypertension and hyperaldosteronism: a prospective clinical study*. Hypertension, 2010. **55**(5): p. 1137-42.
46. Pimenta, E., et al., *Effects of dietary sodium reduction on blood pressure in subjects with resistant hypertension: results from a randomized trial*. Hypertension, 2009. **54**(3): p. 475-81.
47. de la Sierra, A., et al., *Clinical differences between resistant hypertensives and patients treated and controlled with three or less drugs*. J Hypertens, 2012. **30**(6): p. 1211-6.
48. Pimenta, E., K.K. Gaddam, and S. Oparil, *Mechanisms and treatment of resistant hypertension*. J Clin Hypertens (Greenwich), 2008. **10**(3): p. 239-44.
49. *VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão*. Arq Bras Cardiol, 2010. **95**(1 Suppl): p. 1-51.
50. Sarafidis, P.A., P. Georgianos, and G.L. Bakris, *Resistant hypertension-its identification and epidemiology*. Nat Rev Nephrol, 2012. **9**(1): p. 51-8.
51. de La Sierra, A., et al., *Abnormalities of vascular function in resistant hypertension*. Blood Press, 2012. **21**(2): p. 104-9.
52. Raff, U., et al., *Salt intake determines retinal arteriolar structure in treatment resistant hypertension independent of blood pressure*. Atherosclerosis, 2012. **222**(1): p. 235-40.
53. Lemarie, C.A., P.L. Tharoux, and S. Lehoux, *Extracellular matrix alterations in hypertensive vascular remodeling*. J Mol Cell Cardiol, 2010. **48**(3): p. 433-9.
54. 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.
55. 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.
56. 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.
57. 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.
58. 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.
59. 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.

60. 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.
61. Sigrist, M., et al., *Vascular calcification and cardiovascular function in chronic kidney disease.* Nephrol Dial Transplant, 2006. **21**(3): p. 707-14.
62. Asmar, R.G., et al., *Arterial distensibility and ambulatory blood pressure monitoring in essential hypertension.* Am J Cardiol, 1988. **61**(13): p. 1066-70.
63. 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.
64. Laurent, S., et al., *Aortic stiffness is an independent predictor of fatal stroke in essential hypertension.* Stroke, 2003. **34**(5): p. 1203-6.
65. Blacher, J., et al., *Impact of aortic stiffness on survival in end-stage renal disease.* Circulation, 1999. **99**(18): p. 2434-9.
66. 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.
67. Muller, D.N., H. Kvakan, and F.C. Luft, *Immune-related effects in hypertension and target-organ damage.* Curr Opin Nephrol Hypertens, 2011. **20**(2): p. 113-7.
68. Chae, C.U., et al., *Blood pressure and inflammation in apparently healthy men.* Hypertension, 2001. **38**(3): p. 399-403.
69. King, D.E., et al., *Elevation of C-reactive protein in people with prehypertension.* J Clin Hypertens (Greenwich), 2004. **6**(10): p. 562-8.
70. Harrison, D.G., et al., *Inflammation, immunity, and hypertension.* Hypertension, 2011. **57**(2): p. 132-40.
71. Ganta, C.K., et al., *Central angiotensin II-enhanced splenic cytokine gene expression is mediated by the sympathetic nervous system.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **289**(4): p. H1683-91.
72. Swanson, M.A., W.T. Lee, and V.M. Sanders, *IFN-gamma production by Th1 cells generated from naive CD4+ T cells exposed to norepinephrine.* J Immunol, 2001. **166**(1): p. 232-40.
73. Scheller, J., et al., *The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6.* Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(5): p. 878-88.
74. Rincon, M., *Interleukin-6: from an inflammatory marker to a target for inflammatory diseases.* Trends Immunol, 2012. **33**(11): p. 571-7.
75. Heinrich, P.C., et al., *Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation.* Biochem J, 2003. **374**(Pt 1): p. 1-20.
76. Chen, Q., et al., *Central role of IL-6 receptor signal-transducing chain gp130 in activation of L-selectin adhesion by fever-range thermal stress.* Immunity, 2004. **20**(1): p. 59-70.
77. Kaplanski, G., et al., *IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation.* Trends Immunol, 2003. **24**(1): p. 25-9.
78. Brasier, A.R., A. Recinos, 3rd, and M.S. Eledrisi, *Vascular inflammation and the renin-angiotensin system.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(8): p. 1257-66.
79. Luther, J.M., et al., *Angiotensin II induces interleukin-6 in humans through a mineralocorticoid receptor-dependent mechanism.* Hypertension, 2006. **48**(6): p. 1050-7.
80. Brasier, A.R., *The nuclear factor-kappaB-interleukin-6 signalling pathway mediating vascular inflammation.* Cardiovasc Res, 2010. **86**(2): p. 211-8.
81. Guzik, T.J., et al., *Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction.* J Exp Med, 2007. **204**(10): p. 2449-60.

82. Filho, A.G., et al., *Infliximab prevents increased systolic blood pressure and upregulates the AKT/eNOS pathway in the aorta of spontaneously hypertensive rats*. Eur J Pharmacol, 2013. **700**(1-3): p. 201-9.
83. Sriramula, S., et al., *Involvement of tumor necrosis factor-alpha in angiotensin II-mediated effects on salt appetite, hypertension, and cardiac hypertrophy*. Hypertension, 2008. **51**(5): p. 1345-51.
84. Belmin, J., et al., *Increased production of tumor necrosis factor and interleukin-6 by arterial wall of aged rats*. Am J Physiol, 1995. **268**(6 Pt 2): p. H2288-93.
85. Csiszar, A., et al., *Proinflammatory phenotype of coronary arteries promotes endothelial apoptosis in aging*. Physiol Genomics, 2004. **17**(1): p. 21-30.
86. Lopez-Castejon, G. and D. Brough, *Understanding the mechanism of IL-1beta secretion*. Cytokine Growth Factor Rev, 2011. **22**(4): p. 189-95.
87. Liu, Y., et al., *Evidence for activation of endothelium and monocytes in hypertensive rats*. Am J Physiol, 1996. **270**(6 Pt 2): p. H2125-31.
88. Sanz-Rosa, D., et al., *Effect of AT1 receptor antagonism on vascular and circulating inflammatory mediators in SHR: role of NF-kappaB/IkappaB system*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **288**(1): p. H111-5.
89. Jiang, B., et al., *Angiotensin II differentially regulates interleukin-1-beta-inducible NO synthase (iNOS) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression: role of p38 MAPK*. J Biol Chem, 2004. **279**(19): p. 20363-8.
90. Takahashi, H., et al., *Effects of interleukin-1 beta on blood pressure, sympathetic nerve activity, and pituitary endocrine functions in anesthetized rats*. Am J Hypertens, 1992. **5**(4 Pt 1): p. 224-9.
91. Dalekos, G.N., et al., *Elevated interleukin-1 beta in the circulation of patients with essential hypertension before any drug therapy: a pilot study*. Eur J Clin Invest, 1996. **26**(10): p. 936-9.
92. Dalekos, G.N., et al., *Increased serum levels of interleukin-1beta in the systemic circulation of patients with essential hypertension: additional risk factor for atherogenesis in hypertensive patients?* J Lab Clin Med, 1997. **129**(3): p. 300-8.
93. Peeters, A.C., et al., *Pro-inflammatory cytokines in patients with essential hypertension*. Eur J Clin Invest, 2001. **31**(1): p. 31-6.
94. Sabat, R., et al., *Biology of interleukin-10*. Cytokine Growth Factor Rev, 2010. **21**(5): p. 331-44.
95. Ito, S., et al., *Interleukin-10 inhibits expression of both interferon alpha- and interferon gamma- induced genes by suppressing tyrosine phosphorylation of STAT1*. Blood, 1999. **93**(5): p. 1456-63.
96. Piessevaux, J., et al., *The many faces of the SOCS box*. Cytokine Growth Factor Rev, 2008. **19**(5-6): p. 371-81.
97. Driessler, F., et al., *Molecular mechanisms of interleukin-10-mediated inhibition of NF-kappaB activity: a role for p50*. Clin Exp Immunol, 2004. **135**(1): p. 64-73.
98. Gough, D.J., et al., *IFNgamma signaling-does it mean JAK-STAT?* Cytokine Growth Factor Rev, 2008. **19**(5-6): p. 383-94.
99. Hart, P.H., et al., *Regulation of surface and soluble TNF receptor expression on human monocytes and synovial fluid macrophages by IL-4 and IL-10*. J Immunol, 1996. **157**(8): p. 3672-80.
100. Barhoumi, T., et al., *T regulatory lymphocytes prevent angiotensin II-induced hypertension and vascular injury*. Hypertension, 2011. **57**(3): p. 469-76.

## REFERÊNCIAS

---

101. Maynard, C.L., et al., *Regulatory T cells expressing interleukin 10 develop from Foxp3+ and Foxp3- precursor cells in the absence of interleukin 10*. Nat Immunol, 2007. **8**(9): p. 931-41.
102. Qian, X., et al., *High levels of inflammation and insulin resistance in obstructive sleep apnea patients with hypertension*. Inflammation, 2012. **35**(4): p. 1507-11.