

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde:
Cardiologia e Ciências Cardiovasculares

**Avaliação da Função Endotelial Através de Ultrassom Braquial
no Choque Séptico**

Autor: Dr. Leandro Quintana Becker

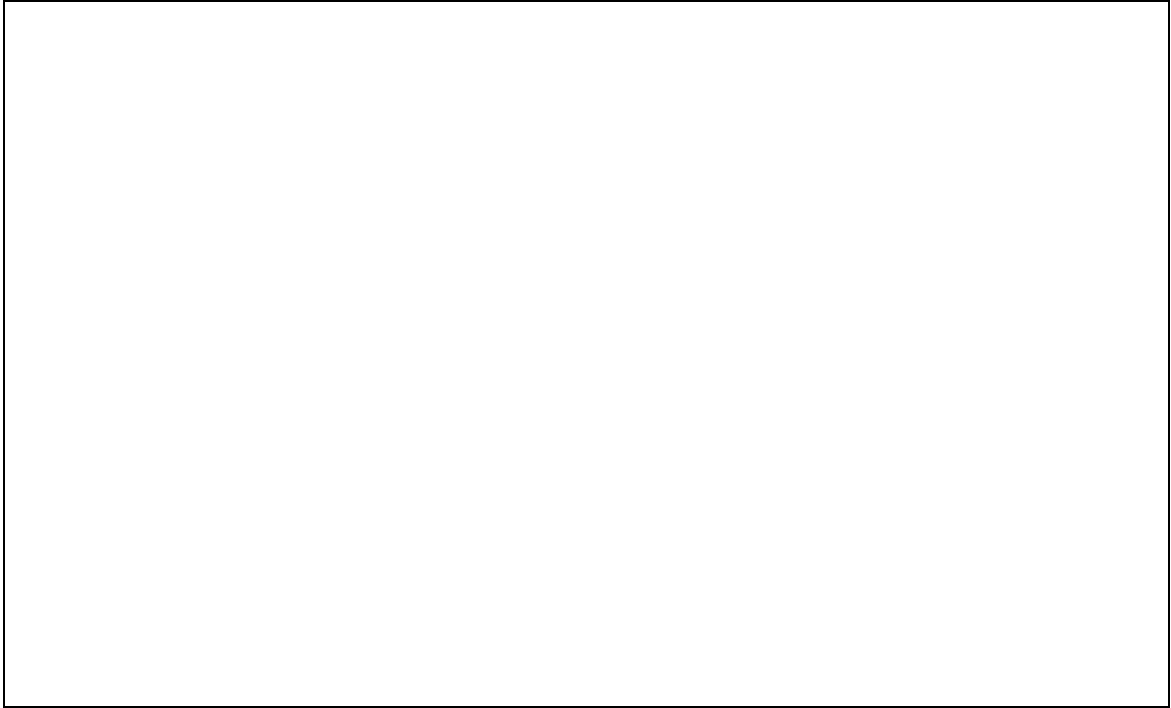
Orientador: Prof. Dr. Luis Eduardo Rohde

Co-orientador: Prof. Dr. Murilo Foppa

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre, setembro de 2009

FICHA CATALOGRÁFICA
(será preenchida após a Defesa)



Este trabalho foi desenvolvido na Unidade de Métodos Não Invasivos do Serviço de Cardiologia e na Unidade de Medicina Intensiva do Serviço de Medicina Intensiva. Hospital de Clínicas de Porto Alegre e Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com o auxílio financeiro do CNPq e FIPE-HCPA.

AGRADECIMENTOS

Ao iniciar minha vida acadêmica jamais havia pensado que um dia faria pós-graduação, ainda mais em uma escola tão importante quanto a Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Meu primeiro sonho foi realizado ao entrar na residência de Clínica Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Nestes dois anos pude ter o primeiro contato com bons professores. Ao continuar minha formação na residência em cardiologia deste mesmo hospital, conheci então grandes mestres, dentre eles o professor doutor Luis Eduardo Paim Rohde. A simples convivência com esta pessoa me mostrou que não há limites para o conhecimento. Pessoa de ótimo relacionamento pessoal, professor de fato e merecedor deste título, aprendi com ele a realmente gostar de cardiologia, pois vi nele o prazer e a dedicação em ensinar. Seu exemplo foi o maior incentivo para adentrar na pós-graduação e o agradeço muito por isso. Outra grande pessoa a quem agradeço muito é o professor doutor Murilo Foppa, dono de um exímio questionamento científico e incansável na missão de ensinar-me a prática da ecocardiografia. Sua paciência, assim como seus ensinamentos ficarão sempre na minha lembrança. Sou grato também à professora doutora Nadine Clausell e ao professor doutor Flávio Fuchs pelo incentivo constante a pesquisa.

Sou ainda imensamente grato a diversas pessoas sem as quais este trabalho não teria sido feito, dentre elas:

Doutoras Karen Prado e Cynthia Aguiar cuja parceria na realização do estudo foi perfeita. Doutor Thiago Quedi Furian, amigo antes de tudo e professor em muitas situações.

Professor Doutor Sérgio Pinto Ribeiro, chefe do Serviço de Medicina Intensiva do HCPA pelo suporte na realização do estudo. Estendo este agradecimento à equipe médica e de enfermagem deste setor do hospital.

Pacientes que aceitaram participar da pesquisa, oferecendo-se para contribuir na construção do conhecimento.

Aos meus pais, base da minha formação como pessoa e como profissional e cuja dedicação aos meus estudos serei eternamente grato.

E finalmente, à minha esposa Elisiane, cujo amor a mim não tem palavras.

SUMÁRIO

1. Resumo Geral.....	6
2. Marco Teórico.....	8
2.1. Seps e choque séptico.....	8
2.2. Fisiopatologia da seps.....	9
2.3. Endotélio e seps.....	12
2.4. Formas de avaliação da função endotelial.....	14
3. Justificativa do Estudo.....	20
4. Objetivos.....	22
5. Referências.....	23
6. Artigo Original.....	29
6.1 Resumo.....	30
6.2 Introdução.....	32
6.3 Métodos.....	33
6.4 Resultados.....	36
6.5 Discussão.....	38
6.6 Referências.....	42
6.6 Legenda das Figuras.....	45
6.7 Tabelas e Figuras.....	46
7. Artigo Original em Inglês.....	52
8. Anexos.....	73

1. RESUMO GERAL

A despeito da evolução do conhecimento médico e dos tratamentos antibióticos, as infecções ainda representam uma grande causa de morbi-mortalidade. Dados do sistema único de saúde do Brasil mostram que a taxa de mortalidade por sepse encontra-se em torno de 40%. Em condições normais, frente à invasão por qualquer micro-organismo, o hospedeiro desenvolve a reação inflamatória adequada à eliminação deste organismo. Na sepse, por outro lado, esta resposta é claramente exacerbada e potencialmente deletéria ao próprio indivíduo. O sistema cardiovascular em especial é afetado nesta síndrome e o endotélio - como peça fundamental neste sistema – é o foco principal de nosso estudo. O fenótipo da disfunção endotelial na sepse grave é caracterizado por uma superfície celular pró-coagulante e pró-adesiva, desregulação do tônus vasomotor e comprometimento da função de barreira.

O uso do ultrassom da artéria braquial como marcador de disfunção endotelial foi primeiramente descrito na década de 90 e baseia-se no princípio da vasodilatação fluxo-mediada (VFM). O aumento do fluxo sanguíneo em uma artéria periférica leva a um maior atrito das células circulantes sobre o endotélio (“shear-stress”) e este estímulo físico por sua vez determina a liberação local de óxido nítrico e, assim, vasodilatação. O índice da função vasomotora endotelial é então descrito como o aumento percentual do diâmetro do vaso pós-hiperemia reativa em relação ao basal. Os valores de normalidade encontram-se em torno de 7-10%. Diversos estudos já comprovaram a utilidade deste método para avaliação da biodisponibilidade de óxido nítrico e assim da integridade endotelial, porém apenas no contexto da aterosclerose e mais recentemente das inflamações crônicas. Em relação à sepse apenas um estudo

foi publicado. Em 2008, um grupo de pesquisadores italianos demonstrou pela primeira vez disfunção vasomotora endotelial medida por esta técnica em um grupo de pacientes com sepse por gram-negativo. A VFM média encontrada na chegada ao hospital foi de $8,7 \pm 3,6\%$ no grupo séptico versus $9,9 \pm 1,1\%$ nos controles ($p < 0,05$). O subgrupo de pacientes sépticos com valores em $< 7,5\%$ na chegada apresentou pior escore SOFA e pior VFM em reavaliação de 3 dias em comparação com aqueles com valores $> 7,5\%$ na chegada. Os autores concluíram que a disfunção vasomotora endotelial antecipou uma disfunção de múltiplos órgãos associada à sepse. Em nosso estudo pesquisamos a utilidade da VFM por ultrassom braquial em 42 pacientes adultos (idade média 51 ± 19 anos, 16 homens) que internaram na Unidade de Tratamento Intensivo do Hospital de Clínicas de Porto Alegre com diagnóstico de sepse grave ou choque séptico, com até 24h de evolução. Parâmetros clínicos, laboratoriais e a vasodilatação VFM foram medidos na admissão e após 24 e 72h e comparada com um grupo de indivíduos aparentemente saudáveis pareados para sexo e grupo etário. Os pacientes foram acompanhados até a alta hospitalar ou morte. A VFM encontrada em pacientes sépticos foi significativamente menor do que nos controles saudáveis ($1,5 \pm 7\%$ contra $6 \pm 4\%$; $p < 0,001$). Após 72h a VMF foi significativamente menor nos pacientes que evoluíram para óbito em relação àqueles que sobreviveram ($5,2 \pm 4\%$ contra $-3,3 \pm 10\%$; $p < 0,05$). A conclusão do estudo foi que a VFM braquial encontra-se precocemente alterada em pacientes sépticos com instabilidade hemodinâmica, estando a piora da disfunção endotelial após 72h do início do quadro associada a mortalidade intra-hospitalar.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Seps e choque séptico

Definição. A seps é uma síndrome clínica decorrente de uma infecção grave. Caracteriza-se por uma reação inflamatória sistêmica e disfunção de órgãos em grau variado. Pacientes com seps geralmente manifestam febre, taquicardia, taquipnéia, leucocitose, e um sítio de infecção localizado (1). As definições mais recentes (2) estabelecem seu diagnóstico a partir de duas ou mais das seguintes condições: [1] temperatura maior que 38 ou menor que 36 graus Celsius, [2] frequência cardíaca maior que 90 batimentos por minuto, [3] frequência respiratória maior que 20 por minuto ou PaCO₂ menor que 32 mmHg e [4] contagem de leucócitos maior que 12000 ou menor que 4000 células por mm³ ou mais que 10% de células jovens. Considera-se seps grave quando há disfunção orgânica associada, hipoperfusão ou hipotensão e choque séptico quando a hipotensão persiste apesar de adequada ressuscitação volêmica.

Epidemiologia. A incidência da seps tem aumentando progressivamente, com elevação de quase 9% ao ano a partir da década de 80 (3). Diversos fatores explicam este fato, dentre eles [1] o aumento do uso de dispositivos médicos invasivos, tais como cateteres intravenosos, [2] o uso difundido de drogas citotóxicas e imunossupressoras para pacientes com câncer e transplantados, [3] o envelhecimento populacional e [4] o aumento das infecções por germes resistentes a antibióticos. Segundo dados do DATASUS (4), as internações por seps no sistema único de saúde representaram 0,5% do total de internações em 2007, com taxa de mortalidade de 41,78%. Nos Estados Unidos da América a taxa de mortalidade intra-hospitalar por seps reduziu para níveis atuais de

18%, apesar de o número total de mortes continuar a aumentar. Um claro efeito cumulativo na mortalidade é encontrado conforme o grau de falência orgânica, alcançando níveis de até 70% quando há hipotensão grave (choque séptico).

Etiologia. Bactérias gram-negativas e gram-positivas, assim como fungos, podem causar sepse. Certos vírus e rickettsiae podem produzir uma síndrome semelhante. Tradicionalmente os germes gram-negativos eram os organismos predominantemente causadores de sepse, porém dados norte-americanos mostram que no ano de 2000 os germes gram-positivos já eram responsáveis por 52% dos casos contra 37% dos gram-negativos (3). Outro dado importante é o aumento das infecções por fungos (atualmente responsável por 4,6% dos casos).

2.2 Fisiopatologia da sepse

A sepse inicia-se com a invasão do hospedeiro por um micro-organismo. A proliferação de micro-organismos pode ocorrer localmente ou mesmo atingir a corrente sanguínea, resultando em culturas de sangue positivas (1). A primeira linha de defesa consiste no sistema inato, que possui elementos solúveis (via alternativa do complemento, proteínas de fase aguda e citocinas) e elementos celulares (monócitos, macrófagos e neutrófilos) os quais agem de maneira não específica. Após, o sistema imune específico atua através dos anticorpos e células imunocompetentes.

O reconhecimento inicial da invasão é feito através de receptores expressos nas células imunológicas. Genericamente, tais receptores reconhecem estruturas moleculares dos micro-organismos e ao se ligarem a

eles, ativam vias de sinalização intracelular que controlam a expressão de genes da resposta imune e a liberação de moléculas efetoras, tais como as citocinas. Diversos antígenos podem iniciar a cascata inflamatória. Certos micro-organismos (como o *Staphylococcus aureus* e a *Pseudomonas aeruginosa*) sintetizam e liberam exotoxinas. Mais frequentemente, entretanto, componentes da estrutura do patógeno iniciam o processo inflamatório, tais como o lipopolissacarídeo (LPS) - presente na membrana celular das bactérias gram-negativas e exemplo clássico de iniciação do choque séptico. O LPS é acoplado à proteína ligadora de LPS e então ao receptor CD-14. Este é uma proteína ancorada na superfície externa da membrana do monócito e presente também de forma solúvel no plasma (auxiliando na apresentação do antígeno a células CD-14 negativas, tais como as células endoteliais). Entretanto este receptor não apresenta conexões intracelulares e, portanto, não possui capacidade de ativação celular isoladamente. Investigações recentes descobriram a presença da família dos co-receptores "Toll-like" (TLR), que estruturalmente adentram ao interior do monócito, de fato participando da sinalização celular. Atualmente dez TLR já foram identificados e com uma ampla especificidade de ligação. Como exemplo temos o TLR 4 (presente também nas células endoteliais) que é responsável pela ligação ao LPS e o TLR 2 que reconhece estruturas da parede das bactérias gram-positivas. Pesquisas têm sido feitas correlacionando-se a presença de polimorfismos genéticos nos TLR e outros receptores celulares e a resposta individual do hospedeiro a determinado micro-organismo invasor.

Após a apresentação do micro-organismo ao hospedeiro, ocorre a ampliação do sinal e ativação do sistema inato de defesa. A orquestração é feita primordialmente com a liberação pelos monócitos ativados de diversos

mediadores pró-inflamatórios, dentre eles a interleucina 1, 2 e 6 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF alfa). Localmente eles auxiliam no recrutamento de células fagocitárias para eliminação do patógeno invasor. Porém sistemicamente têm efeitos potencialmente deletérios, principalmente a IL-1 e o TNF alfa, fundamentais no desenvolvimento do choque séptico. O sistema cardiovascular é especialmente afetado por esse “pool” de elementos inflamatórios. A resistência vascular sistêmica cai e há extravasamento de líquidos para o espaço extravascular, culminando com hipotensão. Pode ocorrer depressão miocárdica e o débito cardíaco se mantém às custas de taquicardia e dilatação ventricular (estado hiperdinâmico). Em nível microcirculatório (arteríola, capilar e vênula) observa-se redução do fluxo sanguíneo que em última instância causa hipóxia celular e consequente disfunção de múltiplos órgãos. Neste processo, outros mecanismos estão envolvidos em graus variáveis: [1] formação de microtrombos decorrentes da ativação da cascata inflamatória, [2] edema intersticial com decorrente compressão de vênulas, [3] redução da deformabilidade de hemácias e leucócitos e [4] vasoconstrição microvascular pelo aumento dos níveis de endotelina.

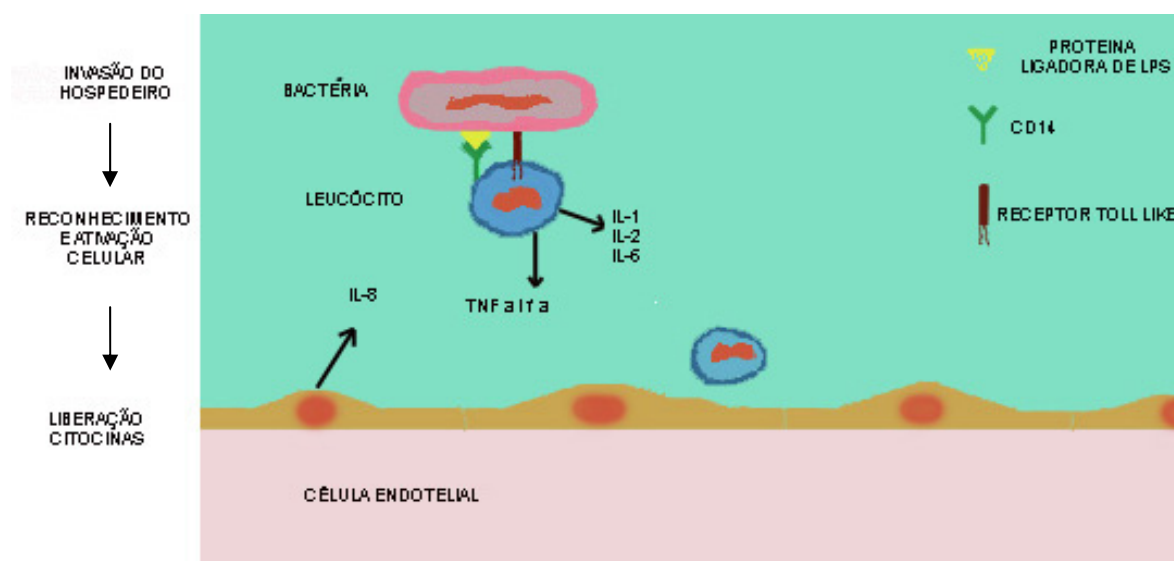


Figura 1. Representação esquemática da resposta inflamatória, desde o reconhecimento do organismo invasor pelo hospedeiro até a ativação celular e liberação de citocinas pelas células de defesa e pelo endotélio. As células endoteliais também expressam receptores CD14 e TLR.

2.3 Endotélio e sepse

O corpo humano contém aproximadamente 10^{13} células endoteliais, pesando 1kg e cobrindo uma área de 4000-7000 m² (5). Intimamente ligadas, revestem os vasos sanguíneos e linfáticos em todos os órgãos. Porém, mais do que um simples divisor anatômico entre o interior dos vasos e os tecidos, o endotélio é considerado hoje um órgão em si com funções específicas e fundamentais na homeostase vascular. Entre suas funções está [1] a regulação do tônus motor, [2] o controle do tráfego celular e de nutrientes, [3] a manutenção da fluidez sanguínea (efeito anticoagulante relativo), [4] a formação de novos vasos (angiogênese), [5] a manutenção do equilíbrio entre os fatores pró e anti-inflamatórios. Cada uma destas funções é feita a partir da síntese e liberação de substâncias vasoativas em resposta a estímulos humorais, neurais e físicos (6). De forma importante, sabe-se que a atividade da célula endotelial

difere conforme o local onde se encontra - um fenômeno chamado de heterogeneidade fenotípica do endotélio (7).

Em situação normal, o endotélio apresenta tendência à vasodilatação, anticoagulação e impermeabilidade celular. Estas funções encontram-se em constante regulação, variando dentro de um espectro de resposta a estímulos fisiológicos. O termo disfunção endotelial, por outro lado, é reservado aos casos em que a atuação endotelial é nitidamente excessiva, sustentada e generalizada, cruzando a barreira adaptativa (8). O fenótipo da disfunção é caracterizado por uma superfície celular pró-coagulante e pró-adesiva, desregulação do tônus vasomotor e comprometimento da função de barreira. A sepse grave e o choque séptico demonstram claramente este comportamento errático.

Disfunção vasomotora endotelial. Dentre as inúmeras funções do endotélio, o controle do tônus vasomotor se destaca. As células endoteliais produzem moléculas vasoativas que contribuem para o controle da pressão arterial. Aqui incluem-se moléculas vasodilatadoras [óxido nítrico (NO) e prostaciclina] e vasoconstritoras (endotelina, tromboxano A2 e fator de ativação plaquetário). O sistema do NO em especial é de grande importância na fisiopatologia da sepse. O NO é uma pequena molécula gasosa, produzida a partir do aminoácido L-arginina com o auxílio da enzima NO sintase (NOS). A NOS é agrupada em duas categorias: a NOS constitutiva (c-NOS) e a NOS induzível (i-NOS). Elas diferem quanto ao peso molecular, à forma de ativação e à capacidade de síntese de NO. A isoforma constitutiva compreende a NOS neuronal (n-NOS), presente normalmente nos neurônios, e a NOS endotelial (e-NOS), presente nas

células endoteliais vasculares e nas plaquetas. A i-NOS por sua vez não é expressa sob condições normais, e é induzida por citocinas e/ou endotoxinas em uma variedade de células incluindo macrófagos, linfócitos T, neutrófilos e plaquetas (9).

O NO produzido pelas células endoteliais tem papel fundamental no controle do tônus vascular. Em condições fisiológicas ele é produzido em pequena quantidade a partir da ativação da e-NOS por estímulos solúveis (incluindo acetilcolina, bradicinina, serotonina) ou físicos (atrito exercido pelas células circulantes sobre a camada endotelial – “*shear-stress*”). Por outro lado, durante um processo infeccioso grave, a expressão da e-NOS se reduz drasticamente (10) - caracterizando disfunção endotelial. Neste novo contexto a isoforma i-NOS (ativada a partir de moléculas inflamatórias) é responsável pela produção agora excessiva, desproporcional e sustentada de NO, contribuindo para a hipotensão, cardiodepressão e hipoperfusão vistas no choque séptico (11). A expressão heterogênea da i-NOS em diferentes órgãos e leitos vasculares resulta em desvios patológicos de fluxo (“*shunts*”), piorando ainda mais a perfusão celular (12).

2.4 Formas de avaliação da função endotelial

2.4.1 Avaliação invasiva da função endotelial. Diversos marcadores, mediadores e parâmetros de coagulação (derivados das células endoteliais ou associados com disfunção endotelial) podem ser medidos no sangue após ativação do endotélio. Abaixo estão relacionados aqueles de maior interesse clínico atualmente (13).

Moléculas de adesão. A exposição das células endoteliais à endotoxina ou citocinas pró-inflamatórias (tais como TNF alfa, IL-1, IL-6, IL-8) resulta na ativação endotelial e aumento significativo na expressão em sua superfície de selectina-E, molécula de adesão intercelular (ICAM)-1 e molécula de adesão vascular (VCAM)-1. As selectinas são glicoproteínas que mediam o passo inicial de aderência dos leucócitos ao endotélio ativado. Os níveis de selectina-E solúveis têm relação dose-dependente com a endotoxina, sendo, portanto, de interesse como marcador quantitativo do grau de ativação do endotélio frente ao processo inflamatório (14). A ICAM-1 e a VCAM-1 também mediam a adesão entre leucócitos e células endoteliais, porém, ao contrário da selectina-E (que é expressa apenas nas células endoteliais), elas são encontradas também em leucócitos e outras células. Diversos estudos demonstraram que os níveis plasmáticos destas substâncias estão elevados em pacientes com sepse e apresentam correlação com a gravidade da doença (15-18). A concentração tanto de selectina-E quanto de ICAM-1 sobem rapidamente após o início da sepse (entre 6-12h) e permanecem elevadas por 3-4 dias, especialmente em pacientes que evoluem de forma desfavorável.

Proteína C. Estudos têm demonstrado que a sepse está associada com uma diminuição na formação e/ou aumento no consumo de fatores da coagulação e subsequente desbalanço entre coagulação e fibrinólise. A proteína C tem papel fundamental na manutenção desta homeostase. Ela é uma glicoproteína dependente da vitamina K que circula no plasma de forma inativa. Sua ativação depende das células endoteliais e das plaquetas, com auxílio de um cofator (proteína S). A proteína C então ativada, apresenta propriedades anti-trombóticas, pró-fibrinolíticas e anti-inflamatórias. Durante a sepse os níveis de

proteína C são geralmente baixos e sua correlação com a gravidade da infecção e mortalidade já foi documentada (19-20). O potencial terapêutico da proteína C ativada foi documentado pela primeira vez com o ensaio clínico PROWESS (*PRotein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis*) na qual a administração de proteína C ativada humana recombinada (drotrecogina alfa) em pacientes com sepse grave resultou em uma redução relativa da mortalidade de 19.4% (21).

Interleucina 6. A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória produzida por vários tipos celulares, incluindo macrófagos, monócitos, adipócitos e células endoteliais. A produção e secreção de IL-6 pode ser induzida por uma variedade de estímulos, incluindo bactérias, vírus, lipopolissacarídeos, TNF-alfa, interferon-gama e fator de crescimento derivado das plaquetas. Ela é necessária para a iniciação da resposta inflamatória. Contudo, sua produção excessiva se associa com disfunção de múltiplos órgãos e gravidade da doença. (22). Reinhart et al (23), por exemplo, demonstraram que uma concentração de IL-6 > 1000 pg/ml foi altamente preditiva de risco aumentado de morte por sepse. Entretanto, como a concentração total de IL-6 é derivada de sua liberação tanto por células endoteliais como outros tipos celulares, torna-se difícil saber até que ponto sua elevação reflete dano endotelial direto.

Endotelina-1. A endotelina-1 é um potente vasoconstritor produzido pelas células endoteliais e liberado em resposta a estímulos físicos e químicos. Na sepse em particular, seus níveis plasmáticos elevam-se consideravelmente e nas fases iniciais da infecção tem um efeito benéfico na manutenção da pressão arterial e perfusão dos órgãos. Entretanto, a manutenção de concentrações elevadas no sangue desencadeia profunda vasoconstrição e hipoperfusão tecidual, o que por sua vez é prejudicial (11). Brauner JS et al (24)

demonstraram que precocemente (6 horas) após o início do choque séptico os níveis de endotelina-1 estão elevados, com aumento progressivo nas primeiras 24h, apresentando correlação com gravidade da doença e mortalidade intra-hospitalar. Outros estudos mostraram resultados semelhantes no mesmo contexto clínico (25, 26).

2.4.2 Avaliação não-invasiva da função endotelial

Laser Doppler. A técnica de laser Doppler é utilizada para monitorar mudanças no fluxo sanguíneo da pele e de outros tecidos (27). Consiste em dirigir uma luz infravermelha de um laser de baixa potência através de uma fibra ótica em direção ao tecido estudado. A luz refletida pelas hemácias em movimento é então capturada por outra(s) fibra(s) óptica(s) e analisada. A velocidade destas células é calculada então a partir do grau de desvio da frequência Doppler encontrado. Na sepse, alguns estudos já foram realizados utilizando este método. Young et al (28) mediram o fluxo sanguíneo na pele do antebraço ao repouso e após 2 minutos de oclusão arterial com torniquete em 11 pacientes com sepse e 19 pacientes em pós-operatório de cirurgia de revascularização miocárdica (controles não-sépticos). Observaram que o fluxo sanguíneo após a liberação do torniquete (hiperemia reativa) foi significativamente menor no grupo séptico que no controle (19% versus 23%, $p < 0,05$), demonstrando disfunção vasomotora endotelial. Em outro estudo, porém, não foi encontrada diferença no grau de aumento do fluxo sanguíneo à ação tópica de acetilcolina (absorvida por iantoforese) na pele do antebraço de pacientes sépticos e não sépticos (29).

Pletismografia. A pletismografia mede de forma não invasiva as variações absolutas de volume sanguíneo de uma determinada região do corpo. O aparelho consiste em um manguito que envolve toda a extensão do membro a ser avaliado (antebraço ou perna). Ele é inflado com ar automaticamente até exercer uma pequena pressão de contato, estando conectado a um transdutor de pressão, amplificador e registrador gráfico. A leitura do exame é feita em uma curva de gráfico que registra o volume no eixo da ordenada e o tempo no eixo da abscissa. O equipamento é calibrado para medir com precisão pequenas variações de volume sanguíneo (na ordem de mililitros) decorrentes do enchimento das veias após um determinado estímulo físico ou químico. No contexto da sepse esta metodologia já foi utilizada para avaliar a função vasomotora endotelial. Kirschenbaum et al (30), por exemplo, observaram que a resposta à hiperemia reativa é atenuada em pacientes com choque séptico em comparação com controles, como visto pelo aumento relativo no fluxo sanguíneo do antebraço em relação ao repouso ($50 \pm 11\%$ versus $145 \pm 20\%$; $p < 0,01$). Outro estudo, ao comparar pacientes com sepse grave e controles não sépticos (pós-operatório de cirurgia de revascularização miocárdica) demonstrou que a reperfusão do membro superior após isquemia de 20 minutos é retardada naqueles com quadro infeccioso, demonstrando disfunção vascular (31).

Vídeo microscópio. A observação direta e não invasiva da microcirculação foi introduzida em 1999 (32) e validada em 2001 (33). Utilizando um vídeo microscópio com imagem espectral ortogonal polarizada – uma nova tecnologia de processamento da imagem – permitiu-se a visualização do fluxo sanguíneo em pequenos vasos. Uma luz verde ilumina a profundidade de um tecido (até

3mm) sendo esta absorvida pela hemoglobina das hemácias contidas nos vasos sanguíneos, fornecendo então uma imagem altamente contrastada da microcirculação. Esta técnica foi utilizada para avaliar a microcirculação da região sublingual de pacientes com sepse grave e comparada com controles sadios (34). A densidade de vasos encontrada foi significativamente menor naqueles com sepse grave (4,5 versus 5,4/mm; $p < 0,01$), comprovando a alteração de fluxo nesta patologia. Recentemente, grupo de especialistas propôs um escore para descrição da microcirculação utilizando este método (35).

Ultrassom da artéria braquial. A avaliação da função endotelial através da ultrassonografia baseia-se no princípio da vasodilatação fluxo-mediada (VFM). O aumento do fluxo sanguíneo em uma artéria periférica leva a um maior atrito das células circulantes sobre o endotélio (“*shear-stress*”) e este estímulo físico por sua vez determina a liberação local de óxido nítrico e, assim, vasodilatação (36,37). Nesta técnica, um transdutor de alta frequência (7,5-10 MHz) é utilizado para obter imagens longitudinais das paredes da artéria braquial. As imagens são obtidas simultaneamente com o traçado eletrocardiográfico. Para minimizar erros operacionais, tanto o transdutor quanto o braço são posicionados e mantidos na mesma posição durante o procedimento. Imagens basais são gravadas, incluindo a medida do diâmetro transversal da artéria braquial e a velocidade do fluxo sanguíneo. Após, um manguito de pressão é colocado no antebraço e inflado até 230-250 mm Hg por 5 minutos. A VFM máxima ocorre após 45-60 segundos da liberação do fluxo arterial. O índice da função vasomotora endotelial é então descrito como o aumento percentual do diâmetro do vaso pós-hiperemia reativa em relação ao basal. Os valores de normalidade

encontram-se em torno de 7-10% (37). Diversos estudos já comprovaram a utilidade deste método para avaliação da biodisponibilidade de óxido nítrico e assim da integridade endotelial, porém apenas no contexto da aterosclerose (38-42) e mais recentemente das inflamações crônicas (43,44).

Em relação à sepse, apenas um estudo avaliando o ultrassom de artéria braquial em pacientes com quadros de sepse foi publicado. Em 2008, um grupo de pesquisadores italianos demonstrou pela primeira vez a aplicação desta técnica na sepse. A VFM foi medida na admissão (T0) e após 3 dias de hospitalização (T1) em 45 pacientes sépticos (bactéria gram-negativa) e comparada com controles saudáveis. A VFM média na chegada ao hospital foi de $8,7 \pm 3,6\%$ no grupo séptico versus $9,9 \pm 1,1\%$ nos controles ($p < 0,05$). O subgrupo de pacientes sépticos com valores em T0 $< 7,5\%$ apresentou pior escore SOFA (*“Sequential Organ Failure Assessment”*) e pior VFM em T1 em comparação com aqueles com valores $> 7,5\%$ na chegada, demonstrando que a avaliação da função endotelial por ultrassom da artéria braquial foi útil na detecção precoce de disfunção de múltiplos órgãos associada a quadros sépticos (45).

3. Justificativa do Estudo

A sepse é uma entidade clínica ainda com alta taxa de mortalidade. O desenvolvimento progressivo de disfunção de múltiplos órgãos define um prognóstico potencialmente ruim ao paciente e o acometimento do sistema cardiovascular e da microcirculação é o ponto central no desenvolvimento de disfunção orgânica. Uma ferramenta que possa detectar de forma precoce este problema e assim prever com segurança um desfecho desfavorável seria

extremamente útil. A avaliação da vasodilatação fluxo-mediada mensurada por ecografia da artéria braquial já demonstrou excelente capacidade de avaliar a disponibilidade endotelial de óxido nítrico em diversos cenários. No contexto de pacientes com quadros sépticos foi muito pouco validada. O único estudo clínico em humanos que mensurou a VFM arrolou apenas pacientes hemodinamicamente estáveis, com quadro clínico menos grave e de prognóstico favorável. No presente estudo prospectivo, avaliamos o papel da avaliação do VFM da artéria braquial avaliado por ultrassom de alta resolução em pacientes sépticos, em fase inicial, porém com instabilidade hemodinâmica definida, cenário no qual o prognóstico pode ser desfavorável e uma melhor estratificação de risco se faz necessária.

4. Objetivos

Objetivos principais

1. Determinar se pacientes com sepse grave ou choque séptico apresentam disfunção endotelial aferida pela técnica de ultrassom de alta resolução da artéria braquial, em comparação a grupo de indivíduos controles.
2. Determinar se disfunção endotelial avaliada pela técnica de ultrassom de alta resolução da artéria braquial é preditora de evolução intra-hospitalar desfavorável.

Objetivo secundário

1. Determinar a evolução temporal da disfunção endotelial aferida pela técnica de ultrassom de alta resolução da artéria braquial em pacientes com sepse grave ou choque séptico.
2. Determinar preditores clínicos de disfunção endotelial aferida pela técnica de ultrassom de alta resolução, baseado em características clínicas de pacientes com sepse grave ou choque séptico.

5. Referências

- (1) Cecil RL, Goldman L, Ausiello D. Cecil Textbook of Medicine 22nd edition.
- (2) American College of Chest Physician Society of critical care medicine Consensus conference. Definition for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. Crit Care Med 1992;20:864-74.
- (3) Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The Epidemiology of Sepsis in the United States from 1979 through 2000. N Engl J Med 2003;348:1546-54.
- (4) Datasus 2007. Departamento de informação e informática do Sistema Único de Saúde. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/miuf.def> Acessado em 09/2009.
- (5) Vallet B. Bench-to-bedside review: endothelial cell dysfunction in severe sepsis: a role in organ dysfunction? Critical Care 2003; 7:130-138.
- (6) Behrendt D, Ganz P. Endothelial Function: From Vascular Biology to Clinical Application. Am J Cardiol 2002;90 (suppl):40L-48L.
- (7) Aird WC. Phenotypic Heterogeneity of the Endothelium: II Representative Vascular Beds. Circ Res 2007; 100:174-190.
- (8) Aird WC. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. Blood 2003; 101:3765-3777.
- (9) Disse LMS, Vieira LM, Carvalho MG. Revisão sobre óxido nítrico. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial 2003; 39:343-350.
- (10) Matsuda N, Hayashi Y, Takahashi Y, Hattori Y. Phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase is diminished in mesenteric arteries from septic rabbits depending on the altered phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway: reversal effect of fluvastatin therapy. J Pharmacol Exp Ther 2006; 319:1348-1354.

- (11) Iskit AB, Guc O. Effects of endothelin and nitric oxide on organ injury, mesenteric ischemia, and survival in experimental models of septic shock. *Acta Pharmacol Sin* 2003; 24: 953-957.
- (12). Matsuda N, Hattori Y. Vascular biology in sepsis: pathophysiological and therapeutic significance of vascular dysfunction. *J Smooth Muscle Res* 2007; 43:117-137.
- (13) Reinhardt K, Bayer O, Brunkhorst F, Meisner M. Markers of endothelial damage in organ dysfunction and sepsis. *Critical Care Med* 2002; 30 [Suppl.]:S302-S312.
- (14) Kuhns DB, Alvord G, Gallin J. Increased circulating cytokines, cytokine antagonists, and E-selectin after intravenous administration of endotoxina in humans. *J Infect Dis* 1995; 171:145-152.
- (15) Boldt J, Muller M, Kuhn D, Linke LC, Hempelmann G. Circulating adhesion molecules in the critically ill: A comparison between trauma and sepsis patients. *Intensive Care Med* 1996;22:122-128.
- (16) Kayal S, Jaïs JP, Aguiní N, Chaudière J, Labrousse J. Elevated circulating E-selectin, intercellular adhesion molecule 1, and von Willebrand factor in patients with severe infection. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:776-784.
- (17) Cowley HC, Heney D, Gearing AJ, Hemingway I, Webster NR. Increased circulating adhesion molecule concentrations in patients with the systemic inflammatory response syndrome: A prospective cohort study. *Crit Care Med* 1994; 22:651-657.
- (18) Sessler CN, Windsor AC, Schwartz M, Watson L, Fisher BJ, Sugerman HJ, Fowler AA 3rd. Circulating ICAM-1 is increased in septic shock. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151:1420-1427.

- (19) Yan SB, Helterbrand JD, Hartman DL, Wright TJ, Bernard GR. Low levels of protein C are associated with poor outcome in severe sepsis. *Chest* 2001; 120:915-922.
- (20) Fisher CJ, Yan SB. Protein C levels as a prognostic indicator of outcome in sepsis and related diseases. *Crit Care Med* 2000; 28(Suppl):S49-S56.
- (21) Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, Steingrub JS, Garber GE, Helterbrand JD, Ely EW, Fisher CJ Jr; Recombinant human protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis (PROWESS) study group. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 2001; 344:699-709.
- (22) Hack CE, De Groot ER, Felt-Bersma RJ, Nuijens JH, Strack Van Schijndel RJ, Eerenberg-Belmer AJ, Thijs LG, Aarden LA. Increased plasma levels of interleukin-6 in sepsis. *Blood* 1989; 74:1704-1710.
- (23) Reinhart K, Menges T, Gardlund B, Harm Zwaveling J, Smithes M, Vincent JL, Tellado JM, Salgado-Remigio A, Zimlichman R, Withington S, Tschaikowsky K, Brase R, Damas P, Kupper H, Kempeni J, Eiselstein J, Kaul M. Randomized, placebo-controlled trial of the anti-tumor necrosis factor antibody fragment afelimomab in hyperinflammatory response during severe sepsis: The RAMSES Study. *Crit Care Med* 2001; 29:765-769.
- (24) Brauner JS, Rohde LE, Clausell N. Circulating endothelin-1 and tumor necrosis factor-alpha: early predictors of mortality in patients with septic shock. *Intensive Care Med* 2000; 26:305-313.
- (25) Schuetz P, Christ-Crain M, Morgenthaler NG, Struck J, Bergmann A, Müller B. Circulating precursor levels of endothelin-1 and adrenomedullin, two

endothelium-derived, counteracting substances, in sepsis. *Endothelium* 2007; 14:345-351.

(26) Schuetz P, Stolz D, Mueller B, Morgenthaler NG, Struck J, Mueller C, Bingisser R, Tamm M, Christ-Crain M. Endothelin-1 precursor peptides correlate with severity of disease and outcome in patients with community acquired pneumonia. *BMC Infect Dis* 2008; 8:22.

(27) Vongsavan N, Matthews B. Some aspects of the use of laser Doppler flow meters for recording tissue blood flow. *Experimental physiology* 1993; 78:1-14.

(28) Young JD, Camrecon EM. Dynamics of skin blood flow in human sepsis. *Intensive Care Med* 1995; 21:669-74.

(29) Kubli S, Boëgli Y, Ave AD, Liaudet L, Revelly JP, Golay S, Broccard A, Waeber B, Schaller MD, Feihl F. Endothelium-dependent vasodilation in the skin microcirculation of patients with septic shock. *Shock* 2003; 19:274-280.

(30) Kirschenbaum LA, Astiz ME, Rackow EC, Saha DC, Lin R. Microvascular response in patients with cardiogenic shock. *Crit Care Med* 2000; 28:1290-1294.

(31) Sair M, Etherington PJ, Winlove C, Evans TW. Tissue oxygenation and perfusion in patients with systemic sepsis. *Crit Care Med* 2001; 29:1343-1349.

(32) Groner W, Winkelmann JW, Harris AG, Ince C, Bouma GJ, Messmer K, Nadeau RG. Orthogonal polarization spectral imaging: a new method for study of the microcirculation. *Nat Med* 1999; 5:1209-1212.

(33) Mathura KR, Vollebregt KC, Boer K, De Graaff JC, Ubbink DT, Ince C. Comparison of OPS imaging to intravital capillaroscopy of nail fold microcirculation. *J Appl Physiol* 2001; 91:74-78.

- (34) De Backer D, Creteur J, Preiser JC, Dubois MJ, Vincent JL. Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166:98-104.
- (35) De Backer D, Hollenberg S, Boerma C, Goedhart P, Büchele G, Ospina-Tascon G, Dobbe I, Ince C. How to evaluate the microcirculation: report of a round table conference. *Critical Care* 2007; 11: R101.
- (36) Tousoulis D, Antoniades C, Stefanadis C. Evaluating endothelial function in humans: a guide to invasive and non-invasive techniques. *Heart* 2005; 91:553-558.
- (37) Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, Deanfield J, Drexler H, Gerhard-Herman M, Herrington D, Vallance P, Vita J, Vogel R; International Brachial Artery Reactivity Task Force. Guidelines for the Ultrasound Assessment of Endothelial-Dependent Flow-Mediated Vasodilation of the Brachial Artery. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39:257-65.
- (38) Quyyumi AA. Prognostic Value of Endothelial Function. *Am J Cardiol* 2003;91 (suppl.):19H-24H.
- (39) Perrone-Filardi P, Cuocolo A, Brevetti G, Silvestro A, Storto G, Dellegrottaglie S, Corrado L, Cafiero M, Camerino R, Polimeno M, Zarrilli A, Caiazzo G, Maglione A, Petretta A, Chiariello M. Relation of Brachial Artery Flow-Mediated Vasodilation to Significant Coronary Artery Disease in Patients With Peripheral Arterial Disease. *Am J Cardiol* 2005;96:1337–1341.
- (40) Wu WC, Sharma SC, Choudhary G, Coulter L, Coccio E, Eaton CB. Flow-mediated vasodilation predicts the presence and extent of coronary artery disease assessed by stress thallium imaging. *J Nucl Cardiol* 2005;12:538-44.

- (41) Meyer B, Mörtl D, Strecker K, Hülsmann M, Kulemann V, Neunteufl T, Pacher R, Berger R. Flow-Mediated Vasodilation Predicts Outcome in Patients With Chronic Heart Failure Comparison With B-Type Natriuretic Peptide. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:1011– 8.
- (42) Witte DR, Westerink J, de Koning EJ, van der Graaf Y, Grobbee DE, Bots ML. Is the Association Between Flow-Mediated Dilation and Cardiovascular Risk Limited to Low-Risk Populations? *J Am Coll Cardiol* 2005;45:1987–93.
- (43) Vaudo G, Marchesi S, Gerli R, Allegrucci R, Giordano A, Siepi D, Pirro M, Shoenfeld Y, Schillaci G, Mannarino E. Endothelial dysfunction in young patients with rheumatoid arthritis and low disease activity. *Ann Rheum Dis* 2004; 63:31-35.
- (44) Johnson SR, Harvey PJ, Floras JS, Iwanochko M, Ibanez D, Gladman DD, Urowitz M. Impaired brachial artery endothelium dependent flow mediated dilation in systemic lupus erythematosus: preliminary observations. *Lupus* 2004; 13:590-593.
- (45) Vaudo G, Marchesi S, Siepi D, Brozzetti M, Lombardini R, Pirro M, Alaeddin A, Roscini AR, Lupattelli G, Mannarino E. Human endothelial impairment in sepsis. *Atherosclerosis* 2008; 197:747-752.

6. Artigo Original

Disfunção Endotelial Avaliada Por Ultrassom Braquial é Preditora de Mortalidade no Choque Séptico

**Leandro Becker, Karen Prado, Murilo Foppa, Cynthia Aguiar, Tiago Furian,
Nadine Clausell e Luis Eduardo Rohde**

**Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde: Cardiologia e
Ciências Cardiovasculares, Faculdade de Medicina,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul e
Unidade de Métodos Não Invasivos, Serviço de Cardiologia,
Hospital de Clínicas de Porto Alegre**

Endereço para Correspondência:

Hospital de Clinicas de Porto Alegre

Serviço de Cardiologia – Unidade de Métodos Não Invasivos

Rua Ramiro Barcelos 2350

Porto Alegre – RS - Brasil

RESUMO

Introdução. A resposta vasomotora do endotélio tem papel fundamental na fisiopatologia da sepse. A avaliação não invasiva da função endotelial pode representar uma janela na avaliação da homeostase do endotélio na sepse. No presente estudo prospectivo, buscamos estudar qual o impacto da resposta vasodilatadora mediada por fluxo medida por ultrassom na artéria braquial no prognóstico intra-hospitalar de pacientes em sepse grave e choque séptico.

Métodos. Foram incluídos consecutivamente 42 pacientes adultos (idade média 51 ± 19 anos, 16 homens) que internaram na Unidade de Tratamento Intensivo do Hospital de Clínicas de Porto Alegre com diagnóstico de sepse grave ou choque séptico, com até 24h de evolução. Parâmetros clínicos, laboratoriais e a vasodilatação fluxo-mediada (VFM) na artéria braquial foram medidas na admissão e após 24 e 72h e comparada com um grupo de indivíduos aparentemente saudáveis pareados para sexo e grupo etário. As medidas foram feitas na posição supina, com transdutor linear de alta frequência (7,5-10 MHz), de acordo com protocolo internacionalmente aceito. Os pacientes foram acompanhados até a alta hospitalar ou morte.

Resultados. Setenta e cinco por cento dos casos de sepse foram de origem abdominal ou respiratória. O uso de vasopressor foi necessário em 79% dos pacientes. O escore de risco APACHE II foi de 23 ± 7 , sendo a taxa de mortalidade intra-hospitalar de 33%. A VFM encontrada em pacientes sépticos foi significativamente menor do que nos controles saudáveis ($1,5 \pm 7\%$ contra $6 \pm 4\%$; $p < 0,001$). Após 72h a VFM foi significativamente menor nos pacientes que evoluíram para óbito em relação àqueles que sobreviveram ($5,2 \pm 4\%$ contra $-3,3 \pm 10\%$; $p < 0,05$).

Conclusões. A VFM braquial encontra-se precocemente alterada em pacientes sépticos com instabilidade hemodinâmica. A piora da disfunção endotelial após 72h do início do quadro mostrou forte associação com mortalidade intra-hospitalar.

INTRODUÇÃO

A sepse é uma síndrome clínica decorrente de uma infecção grave que se caracteriza por uma reação inflamatória sistêmica com disfunção de órgãos em grau variado (1). Sua incidência vem aumentando progressivamente com o envelhecimento da população, com taxas de morte ainda elevadas a despeito da evolução do conhecimento médico. Um claro efeito cumulativo na mortalidade é encontrado conforme o grau de falência orgânica, podendo alcançar níveis de até 70% quando há hipotensão grave (choque séptico) (2). Na fisiopatologia da sepse o endotélio desempenha papel fundamental, principalmente no que diz respeito a sua função vasomotora, mediado pelo equilíbrio entre a oferta de óxido nítrico (vasodilatador) e da endotelina (vasoconstritor) à corrente sanguínea. Na fase inicial da sepse grave (também chamada hiperdinâmica ou quente) o débito cardíaco está elevado e a resistência vascular sistêmica baixa – indicando predomínio de efeito do óxido nítrico. Por outro lado na fase tardia (hipodinâmica ou fria) ocorre o oposto, com predomínio de ação vasoconstritora (3).

A disfunção endotelial pode ser avaliada de forma indireta pela detecção de diversos mediadores inflamatórios, liberados pelo endotélio vascular, mensurados no plasma ou soro (4). A avaliação não invasiva da atividade vasomotora endotelial também pode ser realizada pela análise dos diâmetros de uma artéria periférica por ultrassom, explorando a resposta vasodilatadora fluxo-mediada – um indicador da biodisponibilidade de óxido nítrico endotelial (5). Em humanos esta técnica já mostrou correlação com desfechos cardiovasculares em pacientes com fatores de risco ou comprovada aterosclerose (6-14). A aplicação desta técnica de avaliação do endotélio foi

pouco explorada no contexto de pacientes sépticos até o momento, possivelmente por se tratar de ambiente com intensa volatilidade vasomotora e pelo uso frequente de drogas vasoconstritoras. Recentemente, Vaudo et al publicaram estudo demonstrando a presença de alterações da vasodilatação fluxo-mediada na fase inicial da infecção, avaliadas por ultrassom de artéria braquial (15). Além disto, nos pacientes sépticos com disfunção endotelial, observou-se redução do número de leucócitos e escore de gravidade de sepse (SOFA) elevado.

No presente estudo prospectivo, avaliamos a função endotelial pela técnica de ultrassom de artéria braquial em pacientes em choque séptico, buscando estudar qual impacto deste marcador no prognóstico intra-hospitalar dos pacientes.

MÉTODOS

Pacientes e Delineamento. Foram incluídos consecutivamente pacientes adultos que internaram na Unidade de Tratamento Intensivo do Hospital de Clínicas de Porto Alegre com diagnóstico de sepse grave ou choque séptico conforme definição de Consenso Internacional (1) com até 24h de diagnóstico. Sepse foi definida como evidência clínica de infecção e 2 ou mais dos seguintes critérios: [1] febre (temperatura $>38^{\circ}\text{C}$) ou hipotermia (temperatura $<36^{\circ}\text{C}$); [2] taquicardia (frequência cardíaca > 90 batimentos/minuto); [3] taquipnéia (> 20 respirações/minuto) ou necessidade de ventilação mecânica; [4] leucocitose (>12000 células/ mm^3) ou leucopenia (<4000 células/ mm^3), ou mais de 10% de formas jovens. Sepse grave foi definida como quadro de sepse associada à disfunção orgânica, alterações de perfusão ou hipotensão.

Choque séptico foi definido como sepse com hipotensão, apesar de tentativa de reposição volêmica. Os critérios de exclusão foram os seguintes: [1] idade maior que 80 anos; [2] insuficiência cardíaca; [3] insuficiência hepática (Child classe C); [4] aplasia de medula óssea (leucócitos < 500/ μ l); [5] imunossupressão (HIV+, uso de imunossupressores incluindo corticosteróides [equivalente a prednisona >5mg/Kg/dia], ou câncer); [6] endocardite infecciosa.

Controles. Avaliação da função endotelial dependente de fluxo na artéria braquial também foi realizada em indivíduos controles aparentemente saudáveis (n = 38), pareados para grupo etário e sexo. Indivíduos controles foram selecionados por conveniência, sendo a maioria profissional da área da saúde, sem história de doença cardiovascular e sem fatores de risco para doença aterosclerótica.

Logística do Estudo. No momento da admissão foram coletados características clínicas e dados laboratoriais dos pacientes, incluindo cálculo do escore APACHE II, hemoglobina e leucócitos, proteína C reativa e dosagem de lactato sérico. Neste momento, foi realizada a avaliação da vasodilatação mediada por fluxo da artéria braquial por ultrassom. Estes parâmetros foram reavaliados nos sobreviventes em 24 horas, 72 horas e 7 dias após a inclusão. O consentimento informado foi assinado por todos os pacientes ou seus responsáveis, antes da inclusão no estudo. O estudo foi aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa de nossa instituição.

Avaliação da Função Endotelial Braquial. A vasodilatação fluxo-mediada (VFM) foi avaliada na artéria braquial. As medidas foram feitas na posição supina e no braço sem acesso venoso ou arterial. Um transdutor de alta frequência (7,5-10 MHz) foi utilizado para obter imagens longitudinais das

paredes da artéria braquial, usando ecógrafo comercialmente disponível (Philips Envisor, Andover, MA, Estados Unidos). As imagens foram obtidas simultaneamente com o traçado eletrocardiográfico e gravadas digitalmente. Para minimizar erros operacionais, tanto o transdutor quanto o braço eram mantidos na mesma posição durante o procedimento. Imagens basais foram gravadas e a mensuração do diâmetro ântero-posterior da artéria braquial foi realizado na diástole, em três segmentos adjacentes, sempre quando a visualização da camada íntima-média fosse considerada ótima (Figura 1). Este procedimento foi repetido em três batimentos consecutivos. Posteriormente, um manguito de pressão foi colocado no antebraço e inflado até 230-250 mm Hg por 5 minutos. O diâmetro da artéria braquial era novamente medido após 45-60 segundos da súbita deflação do manguito, seguindo o protocolo acima descrito (5). A média de nove medidas do diâmetro basal e pós-hiperemia foi utilizada para análise estatística. A VFM foi expressa como variação relativa do diâmetro braquial na fase de hiperemia e definido como $100 \times [(diâmetro \text{ pós-hiperemia} - diâmetro \text{ basal}) / diâmetro \text{ basal}]$. Dessa forma, valores percentuais positivos representam vasodilatação e valores percentuais negativos representam constrição.

Análise Estatística. Os valores quantitativos estão apresentados como média \pm desvio padrão ou mediana e intervalos interquartis; variáveis categóricas estão expressas como números absolutos e percentuais. Variáveis sem distribuição normal sofreram transformação logarítmica. As comparações entre os grupos foram realizadas com teste *t* de Student, qui-quadrado ou teste exato de Fischer, de acordo com a variável em estudo. A comparação do perfil de resposta vasomotora dependente de fluxo da artéria braquial no decorrer do

tempo foi avaliado por análise de variância de dupla entrada para medidas repetidas, usando GLM (*general linear models; The SAS Software 8.0, NC, Estados Unidos*). Valores de p bicaudal $< 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS

Característica da Amostra em Estudo. Foram estudados 42 pacientes, a maioria do sexo feminino (62%), com idade de 51 ± 19 anos e choque séptico de origem predominante abdominal e respiratória (75%). O tempo médio de permanência na UTI foi de 8 dias (mediana de 6 dias, intervalo interquartil de 3 a 13 dias), sendo necessário uso de terapia com drogas vasoativas em 79% dos casos. Durante a internação hospitalar ocorreram 14 (33%) óbitos, todos relacionados ao quadro séptico. As características basais foram semelhantes entre os pacientes vivos e aqueles que morreram durante o acompanhamento, exceto pelo uso de noradrenalina e pelos níveis basais de lactato, que foram mais elevados entre aqueles de pior prognóstico (Tabela 1).

Avaliamos a função endotelial de 38 indivíduos aparentemente saudáveis, sem fatores de risco para doença cardiovascular, a maioria do sexo feminino (57%) e com idade de 47 ± 14 anos ($p = 0.18$ para comparação com pacientes sépticos).

Resposta Vasomotora Mediada pelo Fluxo. Na comparação entre pacientes com choque séptico (avaliação basal) e indivíduos controle, observamos que a resposta de vasomodulação dependente do fluxo foi significativamente diferente, sendo quatro vezes inferior nos pacientes sépticos ($p < 0,001$; Figura 2). Na avaliação inicial da resposta vasomotora dos

pacientes, observamos que aqueles pacientes que estavam em uso de medicação vasopressora intravenosa não apresentaram resposta mediada por fluxo estatisticamente diferente daqueles pacientes sem uso de vasopressores ($p=0,56$; Figura 3).

A Tabela 2 nos mostra a capacidade em avaliar a evolução intrahospitalar da resposta vasomotora fluxo-mediada nos pacientes em choque séptico, de acordo com diversos pontos de corte. Embora tenhamos observado tendência de mortalidade mais elevada naqueles pacientes com VFM menor que 7% (ponto de corte internacionalmente aceito) e em pacientes com VFM menor que 5,7% (mediana de nossa amostra) na avaliação inicial, estas diferenças não foram estatisticamente significativas. De forma interessante, 86% dos pacientes que morreram apresentaram piora da função endotelial nas análises seqüências de VFM (comparação entre medida basal e após 24 ou 72 horas), enquanto que apenas 43% dos pacientes sobreviventes tiveram redução da VFM ($p = 0,01$; Tabela 2).

A Figura 4 ilustra a evolução temporal da função endotelial estratificada entre pacientes que sobreviveram e aqueles que evoluíram para óbito intrahospitalar. Podemos observar que pacientes que tiveram prognóstico favorável apresentaram melhora gradativa da VFM, culminando com diferença absoluta de mais de 8% de VFM na análise realizada 72 horas após início do quadro séptico, comparando-se pacientes vivos e mortos (p para interação tempo-grupo = 0,03; comparação nas 72 horas: $p < 0,05$).

Não observamos associação significativa entre a VFM e número de leucócitos ($p = 0,89$). Entretanto, em análise conjunta de todas as avaliações de função endotelial realizadas durante o protocolo, identificamos correlação

negativa fraca, porém estatisticamente significativa entre VFM e níveis plasmáticos de lactato ($r = - 0,26$, $p = 0,007$; $n = 104$).

DISCUSSÃO

Neste estudo prospectivo, demonstramos que pacientes com sepse grave e choque séptico apresentam disfunção vasomotora endotelial aferida por ultrassom braquial, achado presente precocemente na evolução clínica. Também detectamos que os pacientes que faleceram apresentaram piora progressiva da VFM contrariamente aos sobreviventes, achado estatisticamente significativo na avaliação da função endotelial 72h após inclusão no protocolo.

O interesse na avaliação da função endotelial durante a sepse tem sido grande na última década. A maioria dos estudos publicados, entretanto, utilizou marcadores séricos associados direta ou indiretamente com o processo infeccioso e com a ativação das células endoteliais. A concentração de interleucina (IL)-6, por exemplo, mostrou ter correlação com a gravidade da doença. Reinhart et al (16) demonstraram que níveis plasmáticos desta citocina acima de 1000 pg/ml foram altamente preditivos de risco aumentado de morte por sepse. A IL-6, no entanto, é marcador inespecífico de ativação inflamatória, e sua elevação não pode ser atribuída exclusivamente a alterações da função endotelial. Outra molécula estudada no contexto da sepse foi a endotelina-1. A endotelina-1 é um potente vasoconstritor produzido pelas células endoteliais e liberado em resposta a estímulos físicos e químicos. Na sepse em particular, seus níveis plasmáticos se elevam consideravelmente e nas fases iniciais da infecção tem um efeito benéfico na manutenção da pressão arterial e perfusão

dos órgãos. Entretanto, a permanência de concentrações elevadas no sangue desencadeia profunda vasoconstrição e hipoperfusão tecidual, alterações prejudiciais para a homeostase corpórea (3). Brauner et al (17) demonstraram que no choque séptico os níveis de endotelina-1 elevam-se precocemente (em 6h) com aumento progressivo nas primeiras 24h, sendo significativamente maior naqueles que evoluíram para morte intra-hospitalar. De forma não invasiva uma técnica recente de visualização da microcirculação foi desenvolvida (vídeo microscópio), possibilitando a observação de pequenos vasos sanguíneos na profundidade (18). De Backer et al (19) utilizaram-na para avaliar a microcirculação da região sublingual de pacientes com sepse grave e controles sadios. A densidade de vasos encontrada foi significativamente menor naqueles com sepse grave (4,5 versus 5,4mm; $p < 0,01$), comprovando a alteração de fluxo nesta patologia.

O uso do ultrassom braquial como marcador de disfunção endotelial na sepse foi primeiramente descrito em estudo recentemente publicado. Vaudo et al observaram a vasodilatação fluxo medida em 45 pacientes com sepse por gram-negativos. Parâmetros clínicos, laboratoriais e a VFM foram medidos na chegada e após 3 dias, sendo utilizado o ponto de corte de VFM $> 7,5\%$ como normal. Neste estudo, apenas um terço dos pacientes apresentava disfunção endotelial na chegada (VFM $< 7,5\%$). Este subgrupo de indivíduos mostrou piora da VFM após 3 dias, assim como piora no escore SOFA. O único paciente que evoluiu para óbito apresentava VFM anormal. Os autores concluíram que a redução da vasodilatação fluxo-mediada da artéria braquial antecipou uma progressão na falência de órgãos associada à sepse. Em nosso estudo, encontramos também redução na VFM nos pacientes com sepse,

porém em valores médios significativamente menores que aqueles medidos pelo grupo italiano; de fato, 81% de nossa amostra apresentou VFM inferior a 7% na avaliação inicial. Este achado tem explicação provável na gravidade dos pacientes alocados nos estudos. Enquanto no estudo italiano nenhum paciente apresentava disfunção orgânica inicialmente (e portanto enquadravam-se na definição de sepse isolada), em nosso estudo o critério de entrada foi sepse grave e choque séptico. Além disso, a mortalidade intra-hospitalar de nosso estudo foi de 33% contra apenas 4% do estudo italiano. A reavaliação da VFM em 72h mostrou que a disfunção endotelial foi significativamente maior naqueles que evoluíram para óbito, demonstrando potencial papel da função endotelial na avaliação de risco em pacientes com sepse.

O presente estudo apresenta algumas limitações. Primeiramente o número de pacientes estudados foi pequeno e a amostra foi calculada para demonstrar diferença na VFM em relação a controles sadios. Além disso, não foi utilizado o escore SOFA, que seria útil na estratificação da gravidade da sepse. Também não dosamos marcadores séricos associados à disfunção endotelial na sepse, o que poderia balizar de forma mais consistente a avaliação não invasiva por ultrassom. Por fim, devido à instabilidade hemodinâmica, não foi testado a vasodilatação independente do endotélio com uso do nitrato sublingual.

Ante o exposto, concluímos que a dilatação arterial mediada por fluxo encontra-se precocemente alterada em pacientes sépticos com instabilidade hemodinâmica e piora progressivamente nas primeiras 72h naqueles com prognóstico desfavorável. Entretanto, estudo com maior número de pacientes

se faz necessário para confirmar sua potencial utilidade na estratificação de risco precoce na sepse grave.

REFERÊNCIAS

- (1) American College of Chest Physician Society of critical care medicine Consensus conference. Definition for sepsis and organ failure and guidelines for the use os innovative therapies in sepsis. Crit Care Med 1992;20:864-74.
- (2) Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The Epidemiology of Sepsis in the United States from 1979 through 2000. N Engl J Med 2003;348:1546-54.
- (3) Iskit AB, Guc O. Acta Pharmacol Sin 2003; 24: 953-957. Effects of endothelin and nitric oxide on organ injury, mesenteric ischemia, and survival in experimental models of septic shock.
- (4) Reinhardt K, Bayer O, Brunkhorst F, Meisner M. Markers of endothelial damage in organ dysfunction and sepsis. Critical Care Med 2002; 30 [Suppl.]:S302-S312.
- (5) Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, Deanfield J, Drexler H, Gerhard-Herman M, Herrington D, Vallance P, Vita J, Vogel R; International Brachial Artery Reactivity Task Force. Guidelines for the Ultrasound Assessment of Endothelial-Dependent Flow-Mediated Vasodilation of the Brachial Artery. J Am Coll Cardiol 2002; 39:257-65.
- (6) Quyyumi AA. Prognostic Value of Endothelial Function. Am J Cardiol 2003;91 (suppl.):19H-24H.
- (7) Perrone-Filardi P, Cuocolo A, Brevetti G, Silvestro A, Storto G, Dellegrottaglie S, Corrado L, Cafiero M, Camerino R, Polimeno M, Zarrilli A, Caiazzo G, Maglione A, Petretta A, Chiariello M. Relation of Brachial Artery Flow-Mediated Vasodilation to Significant Coronary Artery Disease in Patients With Peripheral Arterial Disease. Am J Cardiol 2005;96:1337–1341.

- (8) Wu WC, Sharma SC, Choudhary G, Coulter L, Coccio E, Eaton CB. Flow-mediated vasodilation predicts the presence and extent of coronary artery disease assessed by stress thallium imaging. *J Nucl Cardiol* 2005;12:538-44.
- (9) Meyer B, Mörtl D, Strecker K, Hülsmann M, Kulemann V, Neunteufl T, Pacher R, Berger R. Flow-Mediated Vasodilation Predicts Outcome in Patients With Chronic Heart Failure Comparison With B-Type Natriuretic Peptide. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:1011– 8.
- (10) Witte DR, Westerink J, de Koning EJ, van der Graaf Y, Grobbee DE, Bots ML. Is the Association Between Flow-Mediated Dilation and Cardiovascular Risk Limited to Low-Risk Populations? *J Am Coll Cardiol* 2005;45:1987–93.
- (11) Gokce N, Keaney JF Jr, Hunter LM, Watkins MT, Nedeljkovic ZS, Menzoian JO, Vita JA. Predictive value of noninvasively determined endothelial dysfunction for long-term cardiovascular events in patients with peripheral vascular disease. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41:1769-1775.
- (12) Huang AL, Silver AE, Shvenke E, Schopfer DW, Jahangir E, Titas MA, Shpilman A, Menzoian JO, Watkins MT, Raffetto JD, Gibbons G, Woodson J, Shaw PM, Dhady M, Eberhardt RT, Keaney JF Jr, Gokce N, Vita JA. Predictive value of reactive hyperemia for cardiovascular events in patients with peripheral arterial disease undergoing vascular surgery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:2113-2119.
- (13) Akcakoyun M, Kargin R, Tanalp AC, Pala S, Ozveren O, Akcay M, Barutcu I, Kirma C. Predictive value of noninvasively determined endothelial dysfunction for long-term cardiovascular events and restenosis in patients undergoing coronary stent implantation: a prospective study. *Coron Artery Dis*. 2008;19:337-343.

- (14) Corrado E, Rizzo M, Coppola G, Muratori I, Carella M, Novo S. Endothelial dysfunction and carotid lesions are strong predictors of clinical events in patients with early stages of atherosclerosis: a 24-month follow-up study. *Coron Artery Dis.* 2008;19:139-144.
- (15) Vaudo G, Marchesi S, Siepi D, Brozzetti M, Lombardini R, Pirro M, Alaeddin A, Roscini AR, Lupattelli G, Mannarino E. Human endothelial impairment in sepsis. *Atherosclerosis* 2008; 197:747-752.
- (16) Reinhart K, Menges T, Gardlund B, Harm Zwaveling J, Smithes M, Vincent JL, Tellado JM, Salgado-Remigio A, Zimlichman R, Withington S, Tschaikowsky K, Brase R, Damas P, Kupper H, Kempeni J, Eiselstein J, Kaul M. Randomized, placebo-controlled trial of the anti-tumor necrosis factor antibody fragment afelimomab in hyperinflammatory response during severe sepsis: The RAMSES Study. *Crit Care Med* 2001; 29:765-769.
- (17) Brauner JS, Rohde LE, Clausell N. Circulating endothelin-1 and tumor necrosis factor-alpha: early predictors of mortality in patients with septic shock. *Intensive Care Med* 2000; 26:305-313.
- (18) Mathura KR, Vollebregt KC, Boer K, De Graaff JC, Ubbink DT, Ince C. Comparison of OPS imaging to intravital capillaroscopy of nail fold microcirculation. *J Appl Physiol* 2001; 91:74-78.
- (19) De Backer D, Creteur J, Preiser JC, Dubois MJ, Vincent JL. Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166:98-104.

LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1. Exemplo ilustrativo da VFM de pacientes sépticos 72 horas após a inclusão no protocolo em paciente que evolui para óbito. O valor negativo da VFM significa que houve vasoconstrição de cerca de 5% em relação ao diâmetro basal do vaso.

Figura 2. Comparação da VFM basal entre controles saudáveis e pacientes com choque séptico.

Figura 3. Comparação da VFM entre pacientes com choque séptico em uso ou não de drogas vasoativas na avaliação inicial.

Figura 4. Evolução temporal da VFM em pacientes com choque séptico estratificada pela evolução intra-hospitalar.

Tabela 1. Características Clínicas dos Pacientes Estudados

	Todos (n = 42)	Vivos (n = 28)	Mortos (n = 14)	Valor de p
Idade (anos)	51 ± 19	48 ± 20	57 ± 15	0,15
Sexo Masculino	16 (38)	11 (39)	5 (36)	0,82
Causa da Sepses				0,15
Abdominal	19(45)	11(58)	8(42)	
Respiratória	12(30)	11(92)	1(8)	
Urinária	6(14)	3(50)	3(50)	
Outra	5 (11)	3(60)	2(40)	
Tempo de Choque (horas)	16 ± 6	17 ± 6	16 ± 5	0,64
Escore APACHE II	23 ± 7	22 ± 6	25 ± 8	0,29
Uso de noradrenalina	33 (79)	19 (68)	14 (100)	0,01
Dias em UTI	8 ± 7	8 ± 7	9 ± 7	0,71
Leucócitos	16089 ± 12089	16694 ± 12267	14880 ± 12087	0,65
Log Lactato	0,9 ± 0,8	0,7 ± 0,7	1,3 ± 1,0	0,02
PCR (mg/dL)	217 ± 129	198 ± 117	262 ± 149	0,15

Dados expressos como média ± desvio padrão, mediana (percentil 25 e 75) ou número absoluto (%). UTI – unidade de tratamento intensivo; Log – logaritmo natural; PCR – proteína C reativa.

Tabela 2. Diferentes pontos de corte de vasodilatação fluxo-mediada e mortalidade intra-hospitalar.

	Todos (n = 42)	Vivos (n = 28)	Mortos (n = 14)	Valor de P*
VFM < 7%	34 (81)	21 (75)	13 (93)	0.23
VFM < 5.7% †	32 (76)	19 (68)	13 (93)	0.12
Piora VFM ‡	24 (57)	12 (43)	12 (86)	0.01

* teste exato de Fisher; † ponto de corte = mediana da amostra; ‡ refere-se a pacientes que tiveram redução da VFM 24 ou 72 horas após a análise inicial.

Figura 1.

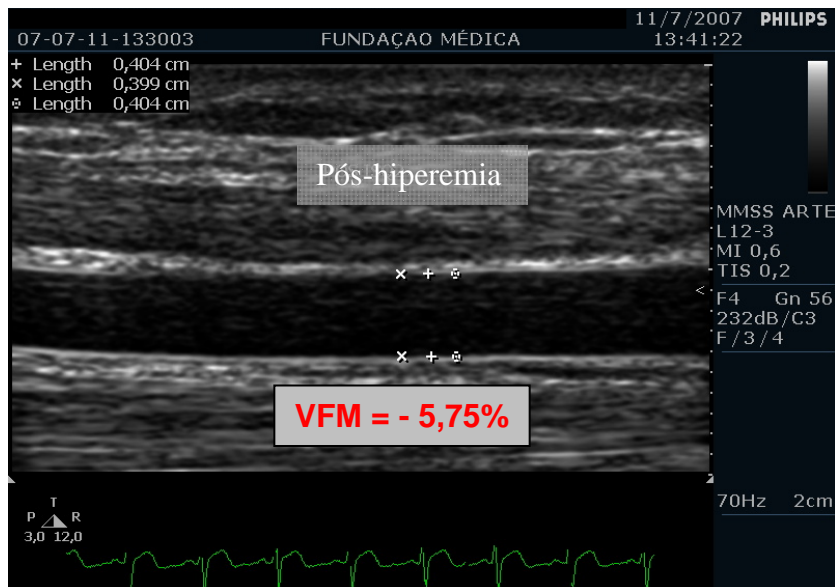
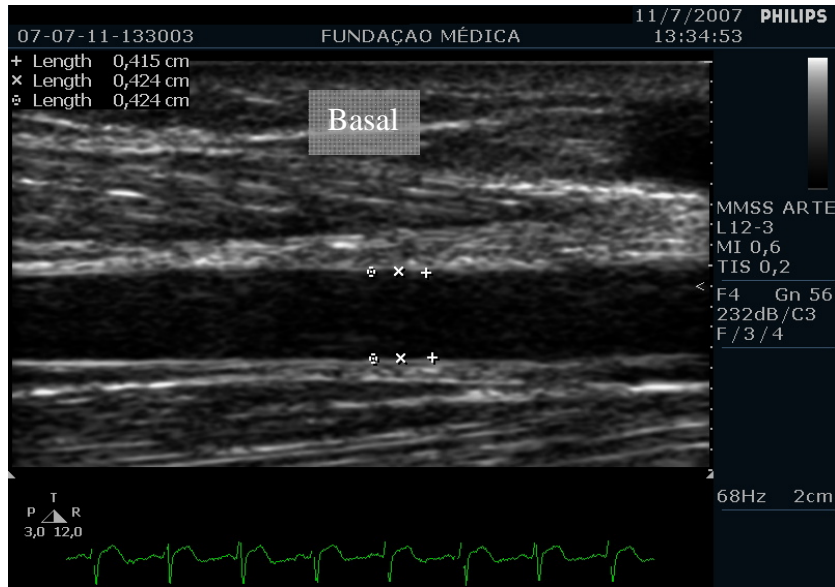


Figura 2.

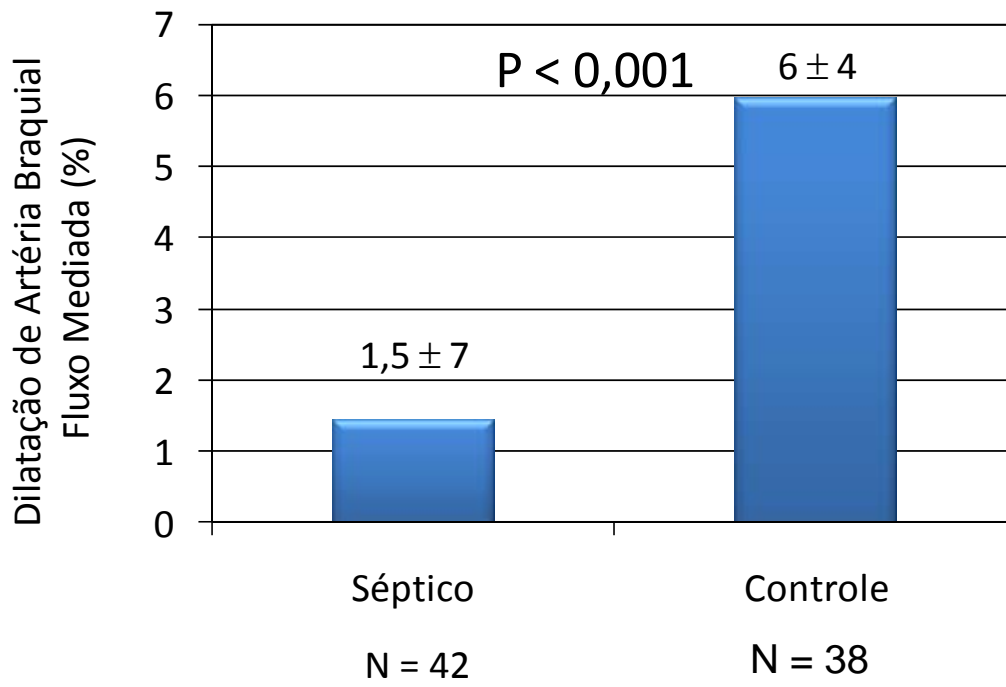


Figura 3.

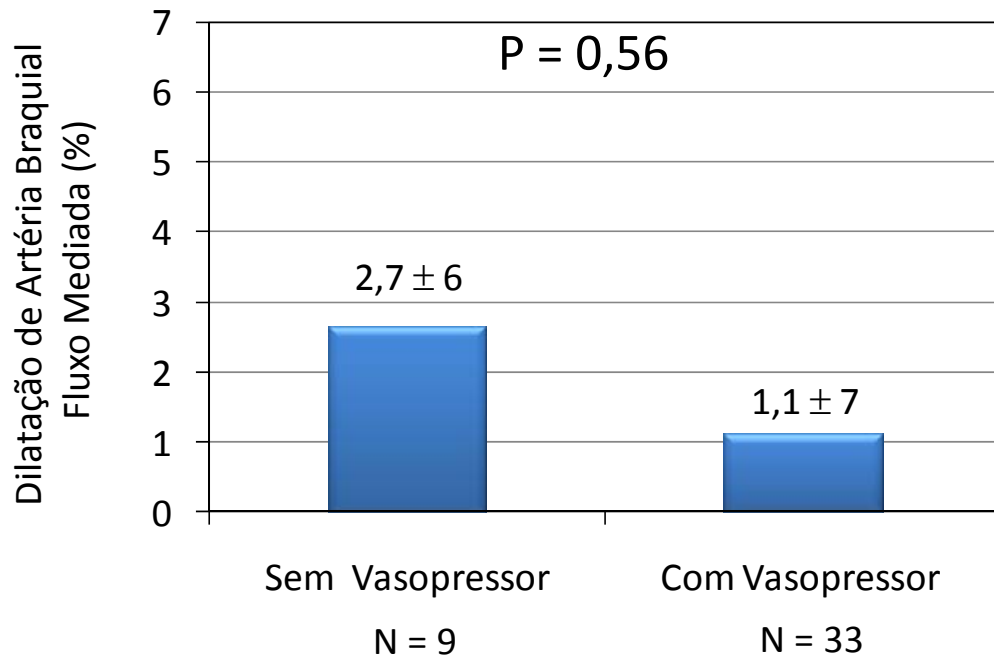
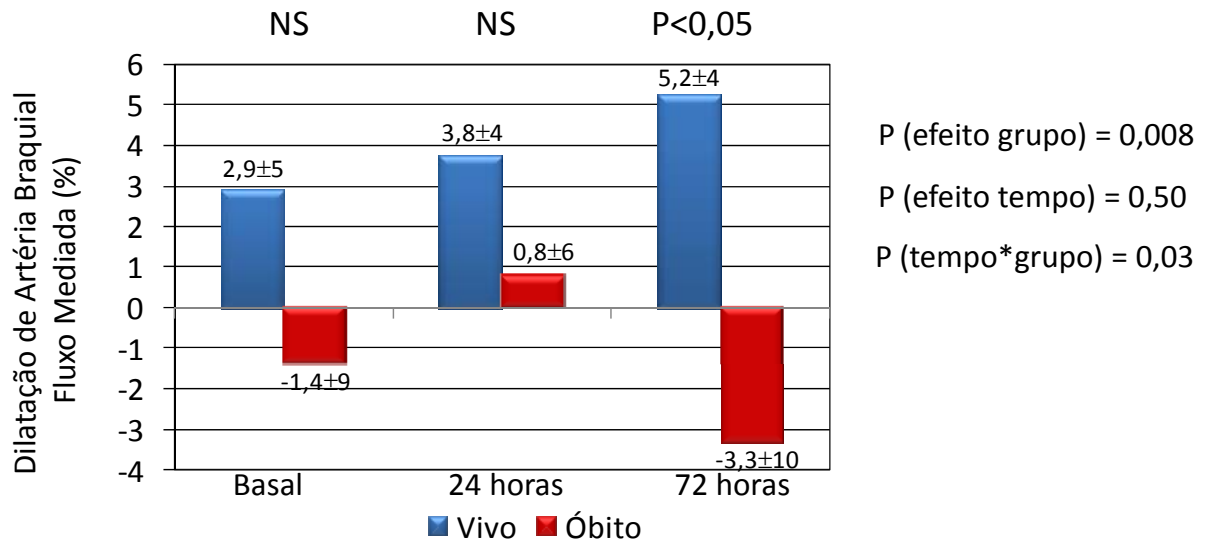


Figura 4.



7. Artigo Original em Inglês

Predictive value of endothelial dysfunction assessed by brachial artery ultrasound in septic shock

**Leandro Becker, Karen Prado, Murilo Foppa, Cynthia Aguiar, Tiago Furian,
Nadine Clausell, Luis Eduardo Rohde**

**Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde: Cardiologia e
Ciências Cardiovasculares, Faculdade de Medicina,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul e
Unidade de Métodos Não Invasivos, Serviço de Cardiologia,
Hospital de Clínicas de Porto Alegre**

Correspondence:

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Serviço de Cardiologia – Unidade de Métodos Não Invasivos

Rua Ramiro Barcelos 2350

Porto Alegre – RS – Brasil

ABSTRACT

Introduction. Endothelial vasomotor response plays a central role in the pathophysiology of sepsis. Non-invasive assessment of endothelial function may be a window to the assessment of endothelial homeostasis in sepsis. This prospective study aims to investigate the impact of ultrasound assessment of flow-mediated dilation (FMD) of the brachial artery on intrahospital prognosis of patients with severe sepsis and septic shock.

Methods. Forty-two adult patients (mean age 51 ± 19 years, 16 male) admitted to the Intensive Care Unit of *Hospital de Clínicas de Porto Alegre* with a diagnosis of severe sepsis or septic shock with less than 24 hours since the onset were consecutively included. Clinical and laboratory parameters and FMD of the brachial artery were measured upon admission and after 24 and 72 hours, and compared to a group of apparently healthy controls paired for sex and age group. Measurements were taken in supine position, with a high-frequency linear transducer (7.5- 10 MHz), according to an internationally accepted protocol. Patients were followed up to discharge or death.

Results. Seventy-five per cent of sepsis cases were of abdominal or respiratory source. The use of vasopressor medication was required for 79% of patients. The APACHE II risk score was 23 ± 7 , and intrahospital mortality rate was 33%. FMD in septic patients was significantly lower than that observed in healthy controls ($1.5 \pm 7\%$ versus $6 \pm 4\%$; $p < 0.001$). After 72h, FMD was significantly lower in nonsurvivors, compared to that of survivors ($5.2 \pm 4\%$ versus $-3.3 \pm 10\%$; $p < 0.05$).

Conclusions. Brachial FMD suffers early alterations in septic patients with hemodynamic instability. Decline in endothelial dysfunction 72h after the onset of sepsis has shown a strong association with intrahospital mortality.

INTRODUCTION

Sepsis is a clinical syndrome caused by severe infection and characterized by a systemic inflammatory reaction with varying degrees of organ dysfunction (1). The incidence of sepsis has increased with the ageing of the population, being associated with progressively higher mortality rates despite the evolution of medical knowledge. Organ failure has a cumulative effect on sepsis-related mortality, which may reach 70% in cases with severe hypotension (2). The endothelium plays a central role in the pathophysiology of sepsis, especially in terms of vasomotor function, which is mediated by the balance between the release of nitric oxide (vasodilation) and endothelin (vasoconstriction) into the bloodstream. In the early stage of severe sepsis (also referred to as hyperdynamic sepsis), cardiac output is high and systemic vascular resistance is low, thus indicating predominance of nitric oxide-induced vasodilation. On the other hand, the opposite is true in the later stage (hypodynamic), in which predominance of vasoconstriction is observed (3).

Endothelial dysfunction can be indirectly assessed by detection of various inflammatory markers released by the vascular endothelium, measured in plasma or serum (4). Non-invasive assessment of endothelial vasomotor function can also be achieved via ultrasound measurement of peripheral artery diameters, exploring flow-mediated dilation (FMD) – an indicator of endothelial nitric oxide bioavailability (5). In humans, this technique has shown correlation with cardiovascular outcomes in patients with risk factors or proven atherosclerosis (6-14). Application of this endothelial evaluation technique in septic patients has not been fully explored so far, possibly because this environment is marked by intense vasomotor fluctuations and frequent use of

vasoconstrictors. Vaudo et al. have recently described the presence of alterations in the assessment of brachial FMD in early stages of infection (15). In septic patients with endothelial dysfunction, a reduction in the number of leukocytes and high sequential organ failure (SOFA) score was also observed.

In this prospective study, we evaluated the predictive value of brachial artery ultrasound to assess FMD in patients with septic shock.

METHODS

Patients and study design. The study included 42 consecutive adult patients admitted to the Intensive Care Unit at *Hospital de Clínicas de Porto Alegre* within 24 hours of diagnosis of severe sepsis or septic shock according to the international consensus definition (1). Sepsis was defined based on clinical evidence of infection and 2 or more of the following: [1] fever axial temperature $> 38^{\circ}\text{C}$) or hypothermia (axial temperature $<36^{\circ}\text{C}$); [2] tachycardia (heart rate > 90 beats /minute); [3] tachypnea (> 20 breaths/minute) or need for mechanical ventilation; [4] leukocytosis (> 12000 cells/ mm^3) or leucopenia(< 4000 cells/ mm^3), or a ratio of $> 10\%$ band cells to polymorphonuclear cells. Severe sepsis was defined as clinical signs of sepsis associated with organ dysfunction, alterations in perfusion, or hypotension. Septic shock was defined as sepsis with hypotension even in the presence of plasma transfusion. Exclusion criteria were as follows: [1] age > 80 years; [2] heart failure; [3] liver failure (Child-Pugh class C); [4] bone marrow failure (leukocytes $< 500/\mu\text{l}$); [5] immunosuppression (HIV+, use of immunosuppressants, including corticosteroids [prednisone $>5\text{mg/Kg/day}$], or cancer); [6] infective endocarditis.

Controls. Assessment of endothelial-dependent flow-mediated dilation of the brachial artery was carried out in a convenience sample of apparently healthy control subjects (n = 38), matched by age and sex. Most control subjects were healthcare professionals, with no history of cardiovascular disease and no risk factors for atherosclerotic disease.

Study protocol. Clinical features and laboratory data of patients were collected at admission, including APACHE II score, hemoglobin and leukocytes, C-reactive protein and serum lactate levels. Brachial artery ultrasound to determine FMD was also carried out at admission. These parameters were reassessed in survivors after 24 hours, 72 hours, and 7 days. Informed consent was signed by all patients or guardians prior to inclusion in the study. The study was approved by the institution's Research Ethics Committee.

Brachial artery ultrasound to determine flow-mediated dilation. FMD was assessed in the brachial artery. Measurements were obtained with the patient in the supine position, in the arm without venous or arterial access. Brachial artery images were obtained using a high-frequency transducer (7.5-10 MHz) and a commercially available ultrasound system (Philips EnVisor, Andover, MA, USA). Images were obtained simultaneously with electrocardiographic (ECG) tracing and digitally recorded. In order to minimize operational errors, both the transducer and the arm were maintained in the same position during the entire procedure. Baseline images were recorded and brachial artery posteroanterior diameter was measured in diastole, in three adjacent segments, at the optimal angle of interrogation to determine intima-media thickness (Figure 1). This procedure was repeated for three consecutive beats. A pressure cuff was then placed on the forearm and inflated to 230-250

mmHg for 5 minutes. Brachial artery diameter was measured again 45-60 seconds after sudden cuff deflation, following the study protocol (5). The mean of nine measurements of baseline and post-hyperemia diameter was used for statistical analysis. FMD was expressed as relative change in brachial artery diameter during hyperemia and defined as $100 \times [(post\text{-}hyperemia\ diameter - baseline\ diameter)/baseline\ diameter]$. Therefore, positive percentage values indicate vasodilation whereas negative percentage values indicate constriction.

Statistical Analysis. Quantitative variables are presented as mean \pm standard deviation or median and interquartile range; categoric variables are expressed as absolute numbers and percentages. Variables without normal distribution underwent logarithmic transformation. Student's *t* test, chi-square or Fisher's exact test were used for comparisons between the groups. To study the profile of brachial artery FMD over time, two-way analysis of variance (ANOVA) for repeated measures were employed using general linear models (GLM; SAS Software 8.0, NC, USA). Two-tailed *p* values < 0.05 were considered as statistically significant.

RESULTS

Characteristics of the studied sample. Of the 42 patients studied, 62% were female and mean age was 51 ± 19 years. In 75% of the cases, septic shock was of abdominal and respiratory source. Mean length of stay in the intensive care unit (ICU) was 8 days (median = 6 days, 3 to 13 days). In 79% of cases, vasoactive drug therapy was required. During hospitalization, 14 (33%) patients died due to sepsis. The baseline characteristics of survivors were similar to those of the patients who died during follow-up, except for the use of

noradrenalin and for baseline lactate levels, which were higher in nonsurvivors (Table 1).

In the control group including 38 apparently healthy individuals without risk factors for cardiovascular disease, 57% were female. Mean age was 47 ± 14 years ($p = 0.18$ for comparison with septic patients).

FMD response. When comparing patients with septic shock (baseline evaluation) with controls, we observed that endothelium-dependent FMD response was four times lower in septic patients ($p < 0.001$; Figure 2). FMD response was similar in patients with or without intravenous vasopressors at baseline ($p=0.56$; Figure 3).

Table 2 shows the prognostic value of FMD response for intrahospital mortality in patients with septic shock. Although we observed a trend toward increased mortality rates in patients with baseline FMD $< 7\%$ (internationally accepted cutoff point) and in patients with baseline FMD $< 5.7\%$ (study median), statistical significance was not achieved for the comparison between survivors and nonsurvivors considering the FMD cutoff points. Interestingly, 86% of nonsurvivors showed a decrease in endothelial function in FMD sequential analyses (comparison between baseline measurement and measurements after 24 or 72 hours), whereas only 43% of survivors showed reduced FMD ($p = 0.01$; Table 2).

Figure 4 illustrates the temporal evolution of stratified endothelial function in survivors and nonsurvivors. We observed that patients with a favorable outcome depicted a gradual improvement of FMD, reaching an absolute difference in FMD higher than 8% 72 hours after the onset of sepsis (p for time-group interaction = 0.03; comparison at 72 hours: $p < 0.05$).

No significant association was observed between FMD and the number of leukocytes ($p = 0.89$). However, a comprehensive analysis of all the assessments performed revealed a weak but statistically significant negative correlation between FMD and plasma lactate levels ($r = -0.26$, $p = 0.007$; $n = 104$).

DISCUSSION

In this prospective study, we showed that patients with severe sepsis and septic shock presented vasomotor endothelial dysfunction evaluated by brachial artery ultrasound early in the development of sepsis. We also observed that nonsurvivors had a progressive decline in FMD, a finding that was statistically significant 72 hours after inclusion in the protocol.

Over the past decade, there has been great interest in the assessment of endothelial function during sepsis. Most published studies, however, have used serum markers directly or indirectly associated with the infectious process and with the activation of endothelial cells. The concentration of interleukin (IL)-6, for instance, has been shown to be correlated with severity of the disease. Reinhart et al (16) have shown that IL-6 plasma levels > 1000 pg/ml were highly predictive of increased risk of death by sepsis. IL-6, however, is a non-specific inflammatory marker, and increased levels of this cytokine may reflect changes that might not be related to endothelial function. Endothelin-1 (ET1), a powerful vasoconstrictor produced by endothelial cells and released in response to physical and chemical stimuli, has also been studied in the context of sepsis. In the early stages of infection, ET1 plasma levels increase considerably and this increase has a beneficial effect on arterial pressure and organ perfusion.

However, long-lasting increments of ET1 concentration in the blood trigger a deep vasoconstriction and hypoperfusion of tissues, alterations that are harmful to tissue and hemodynamic homeostasis (3). Brauner et al. (17) have shown increased levels of E1 in septic shock as early as 6h, with progressive increase over the first 24 hours; a finding that was associated to septic-related mortality. A non-invasive technique for viewing the microcirculation has been recently developed (video microscope), thus enabling in-depth observation of small blood vessels (18). De Backer et al. (19) used this technique to assess microvascular blood flow in the sublingual region of patients with severe sepsis and of healthy controls. Vessel density was found to be significantly lower in patients with severe sepsis (4.5 versus 5.4mm; $p < 0.01$).

The use of brachial artery ultrasound as a marker of endothelial dysfunction in sepsis was first described in a recently published study. Vaudo et al have analyzed FMD in 45 patients with gram-negative sepsis. Clinical and laboratory parameters and FMD were measured at admission and after 3 days. FMD $> 7.5\%$ was defined as normal. In that study, only one third of patients had endothelial dysfunction at admission. This subset of individuals showed decline in FMD and SOFA score after 3 days, but the only patient who died had preserved FMD. The authors concluded that reduction in brachial artery FMD predicted sepsis-associated organ failure. In our study, we also observed decreased FMD in septic patients, but our mean values were significantly lower than those measured by the Italian group; 81% of our sample had FMD $< 7\%$ at baseline. This finding is probably explained by the severity of sepsis in our subjects. In the Italian study, all patients had “isolated” sepsis without evidence of organ failure at study entry, whereas severe sepsis and septic shock were

both inclusion criteria in our study. Additionally, intrahospital mortality was 33% in our group versus only 4% in the Italian study. VMD reassessment at 72 hours showed that endothelial dysfunction was significantly more pronounced in nonsurvivors, thus showing a potential role of endothelial function in the risk assessment of septic patients.

Some aspects of our study design deserve consideration. Our sample size was relatively limited and was calculated to detect differences in FMD between septic patients and healthy controls. Also, serum markers of endothelial dysfunction in sepsis, which could serve as a reference for the ultrasound assessment, were not dosed. Finally, due to hemodynamic instability, endothelium-independent dilation was not tested with the use of sublingual nitrate.

In summary, we conclude that changes in FMD occur early on in septic patients with hemodynamic instability, with progressive FMD decline over the first 72 hours representing poor prognosis. However, further studies with larger samples are required to confirm the predictive value of endothelial dysfunction assessed by brachial artery ultrasound for risk assessment in severe sepsis.

REFERENCES

- (1) American College of Chest Physician Society of critical care medicine Consensus conference. Definition for sepsis and organ failure and guidelines for the use os innovative therapies in sepsis. Crit Care Med 1992;20:864-74.
- (2) Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The Epidemiology of Sepsis in the United States from 1979 through 2000. N Engl J Med 2003;348:1546-54.
- (3) Iskit AB, Guc O. Acta Pharmacol Sin 2003; 24: 953-957. Effects of endothelin and nitric oxide on organ injury, mesenteric ischemia, and survival in experimental models of septic shock.
- (4) Reinhardt K, Bayer O, Brunkhorst F, Meisner M. Markers of endothelial damage in organ dysfunction and sepsis. Critical Care Med 2002; 30 [Suppl.]:S302-S312.
- (5) Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, Deanfield J, Drexler H, Gerhard-Herman M, Herrington D, Vallance P, Vita J, Vogel R; International Brachial Artery Reactivity Task Force. Guidelines for the Ultrasound Assessment of Endothelial-Dependent Flow-Mediated Vasodilation of the Brachial Artery. J Am Coll Cardiol 2002; 39:257-65.
- (6) Quyyumi AA. Prognostic Value of Endothelial Function. Am J Cardiol 2003;91 (suppl.):19H-24H.
- (7) Perrone-Filardi P, Cuocolo A, Brevetti G, Silvestro A, Storto G, Dellegrottaglie S, Corrado L, Cafiero M, Camerino R, Polimeno M, Zarrilli A, Caiazza G, Maglione A, Petretta A, Chiariello M. Relation of Brachial Artery Flow-Mediated Vasodilation to Significant Coronary Artery Disease in Patients With Peripheral Arterial Disease. Am J Cardiol 2005;96:1337–1341.

- (8) Wu WC, Sharma SC, Choudhary G, Coulter L, Coccio E, Eaton CB. Flow-mediated vasodilation predicts the presence and extent of coronary artery disease assessed by stress thallium imaging. *J Nucl Cardiol* 2005;12:538-44.
- (9) Meyer B, Mörtl D, Strecker K, Hülsmann M, Kulemann V, Neunteufl T, Pacher R, Berger R. Flow-Mediated Vasodilation Predicts Outcome in Patients With Chronic Heart Failure Comparison With B-Type Natriuretic Peptide. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:1011– 8.
- (10) Witte DR, Westerink J, de Koning EJ, van der Graaf Y, Grobbee DE, Bots ML. Is the Association Between Flow-Mediated Dilation and Cardiovascular Risk Limited to Low-Risk Populations? *J Am Coll Cardiol* 2005;45:1987–93.
- (11) Gokce N, Keaney JF Jr, Hunter LM, Watkins MT, Nedeljkovic ZS, Menzoian JO, Vita JA. Predictive value of noninvasively determined endothelial dysfunction for long-term cardiovascular events in patients with peripheral vascular disease. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41:1769-1775.
- (12) Huang AL, Silver AE, Shvenke E, Schopfer DW, Jahangir E, Titas MA, Shpilman A, Menzoian JO, Watkins MT, Raffetto JD, Gibbons G, Woodson J, Shaw PM, Dhady M, Eberhardt RT, Keaney JF Jr, Gokce N, Vita JA. Predictive value of reactive hyperemia for cardiovascular events in patients with peripheral arterial disease undergoing vascular surgery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:2113-2119.
- (13) Akcakoyun M, Kargin R, Tanalp AC, Pala S, Ozveren O, Akcay M, Barutcu I, Kirma C. Predictive value of noninvasively determined endothelial dysfunction for long-term cardiovascular events and restenosis in patients undergoing coronary stent implantation: a prospective study. *Coron Artery Dis*. 2008;19:337-343.

- (14) Corrado E, Rizzo M, Coppola G, Muratori I, Carella M, Novo S. Endothelial dysfunction and carotid lesions are strong predictors of clinical events in patients with early stages of atherosclerosis: a 24-month follow-up study. *Coron Artery Dis.* 2008;19:139-144.
- (15) Vaudo G, Marchesi S, Siepi D, Brozzetti M, Lombardini R, Pirro M, Alaeddin A, Roscini AR, Lupattelli G, Mannarino E. Human endothelial impairment in sepsis. *Atherosclerosis* 2008; 197:747-752.
- (16) Reinhart K, Menges T, Gardlund B, Harm Zwaveling J, Smithes M, Vincent JL, Tellado JM, Salgado-Remigio A, Zimlichman R, Withington S, Tschaikowsky K, Brase R, Damas P, Kupper H, Kempeni J, Eiselstein J, Kaul M. Randomized, placebo-controlled trial of the anti-tumor necrosis factor antibody fragment afelimomab in hyperinflammatory response during severe sepsis: The RAMSES Study. *Crit Care Med* 2001; 29:765-769.
- (17) Brauner JS, Rohde LE, Clausell N. Circulating endothelin-1 and tumor necrosis factor-alpha: early predictors of mortality in patients with septic shock. *Intensive Care Med* 2000; 26:305-313.
- (18) Mathura KR, Vollebregt KC, Boer K, De Graaff JC, Ubbink DT, Ince C. Comparison of OPS imaging to intravital capillaroscopy of nail fold microcirculation. *J Appl Physiol* 2001; 91:74-78.
- (19) De Backer D, Creteur J, Preiser JC, Dubois MJ, Vincent JL. Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166:98-104.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. FMD 72 hours after inclusion in the protocol in a patient who subsequently died. The negative FMD value means approximately 5% vasoconstriction in relation to baseline diameter.

Figure 2. Comparison of FMD in healthy controls and patients with septic shock.

Figure 3. Comparison of FMD in patients with septic shock with or without vasoactive drugs at baseline.

Figure 4. Temporal variation of FMD in patients with septic shock stratified by intrahospital evolution.

Table 1. Clinical characteristics of studied patients

	Overall (n = 42)	Survivors (n = 28)	Nonsurvivors (n = 14)	p value
Age (years)	51 ± 19	48 ± 20	57 ± 15	0.15
Male	16 (38)	11 (39)	5 (36)	0.82
Source of sepsis				0.15
Abdominal	19(45)	11(58)	8(42)	
Respiratory	12(30)	11(92)	1(8)	
Urinary	6(14)	3(50)	3(50)	
Other	5 (11)	3(60)	2(40)	
Time in shock (hours)	16 ± 6	17 ± 6	16 ± 5	0.64
APACHE II score	23 ± 7	22 ± 6	25 ± 8	0.29
Use of noradrenalin	33 (79)	19 (68)	14 (100)	0.01
Days in ICU	8 ± 7	8 ± 7	9 ± 7	0.71
Leukocytes	16089 ± 12089	16694 ± 12267	14880 ± 12087	0.65
Lactate log	0.9 ± 0.8	0.7 ± 0.7	1.3 ± 1.0	0.02
CRP (mg/dL)	217 ± 129	198 ± 117	262 ± 149	0.15

Data expressed as mean± standard deviation, median (25-75 interquartile range) or absolute number (%). ICU– intensive care unit; Log – natural logarithm; CRP – C-reactive protein.

Table 2. Different cutoff points of flow-mediated dilation and intrahospital mortality

	Overall (n = 42)	Survivors (n = 28)	Nonsurvivors (n = 14)	P* value
FMD < 7%	34 (81)	21 (75)	13 (93)	0.23
FMD < 5.7% †	32 (76)	19 (68)	13 (93)	0.12
Decline in FMD ‡	24 (57)	12 (43)	12 (86)	0.01

* Fisher's exact test; † cutoff point = sample median; ‡ refers to patients who presented FMD reduction 24 or 72 hours after initial assessment.

Figure 1.

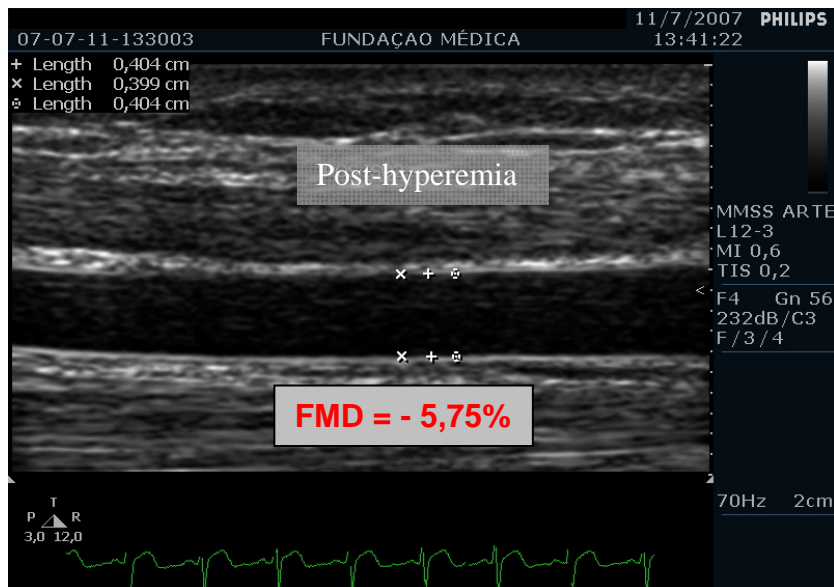
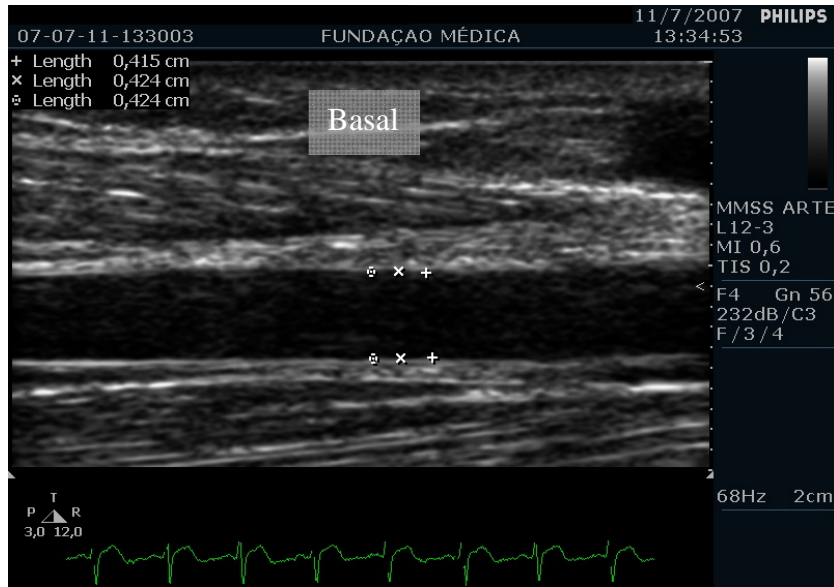


Figure 2.

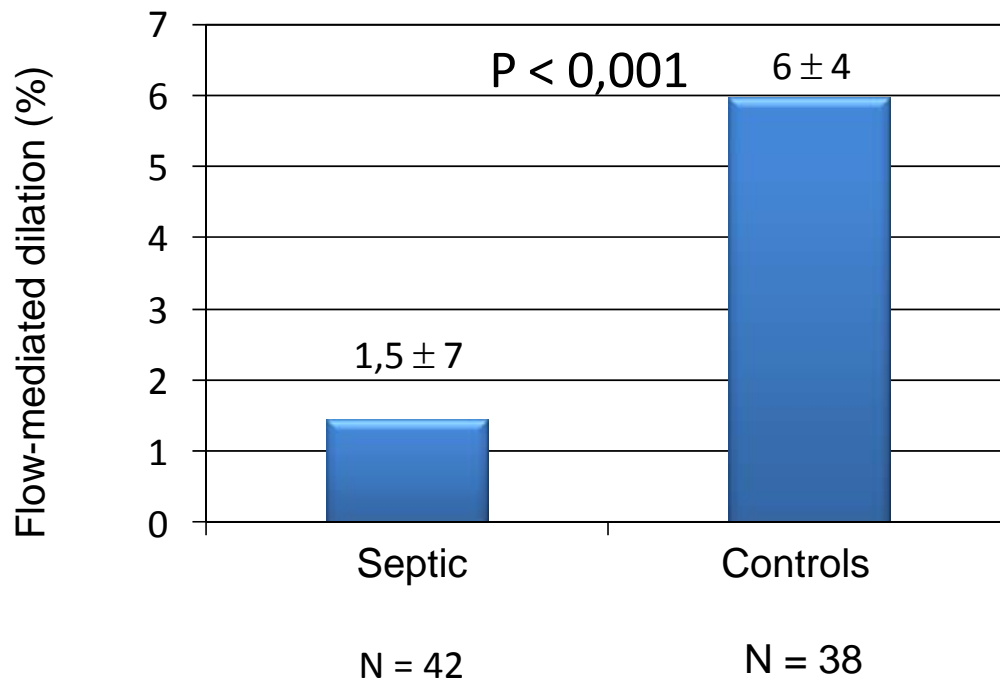


Figure 3.

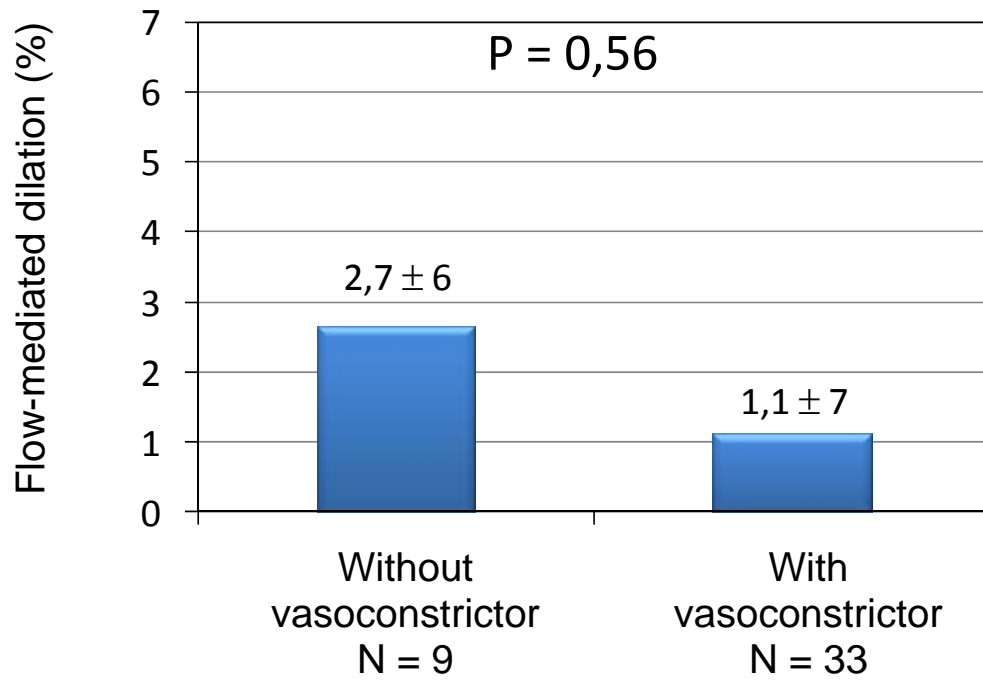
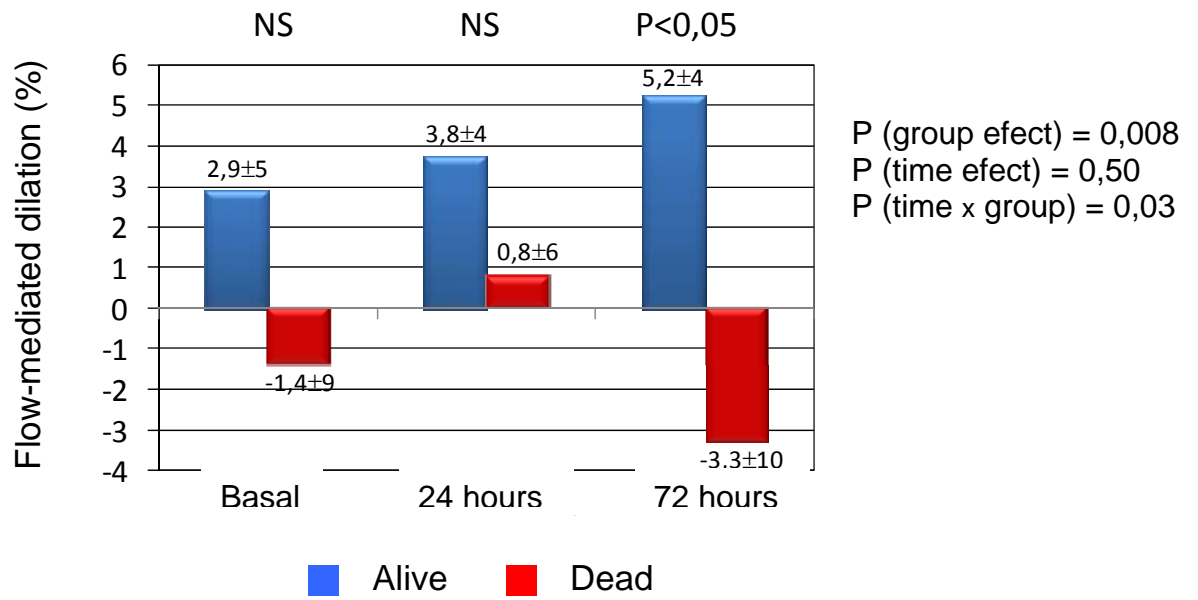


Figure 4.



8. ANEXOS

Termo de Consentimento Informado

Prezado Sr. (a) _____:

Objetivo da Pesquisa. Gostaríamos de convidar você (ou seu familiar) para participar de um estudo que estamos realizando em pacientes com quadro clínico de infecção grave. Este estudo tem como objetivo avaliar a função do endotélio (tecido que reveste as artérias) em pacientes com quadros de infecção grave. Hoje se sabe que este tecido é muito importante no corpo humano, podendo produzir diversas substâncias que estão associadas com quadros infecciosos.

Como será realizado? Neste estudo realizaremos uma avaliação com ecografia para medir o diâmetro da artéria do braço. Este procedimento é muito simples, não implica em risco algum e tem duração aproximada de 20-45 minutos. Durante o exame será inflado um aparelho de pressão no braço por 5 minutos que tem objetivo de avaliar a resposta do endotélio ao fluxo sanguíneo. Este exame do endotélio será repetido após 2 e 3 dias de internação na Unidade de Tratamento Intensivo. Simultaneamente ao exame será realizada coleta de sangue (aproximadamente 5 ml) venoso para mensuração de substâncias produzidas pelo endotélio (endotelinas).

Riscos e Benefícios. Todos os procedimentos realizados para a avaliação do endotélio descritos acima já foram amplamente testados em outros pacientes e não implicam em riscos maiores. O manguito de pressão pode causar leve desconforto no braço quando inflado, porém a sensação desaparece imediatamente após a liberação da pressão. A punção de sangue periférico será realizada em veia periférica e pode também causar leve desconforto e pequeno hematoma transitório no local. Por fim, é importante dizer que os resultados deste estudo não trarão benefícios diretos imediatos para o Sr.(a), mas sem dúvida poderão a esclarecer aspectos importantes do papel do endotélio nos quadros sépticos.

O Sr.(a) é livre para decidir por participar ou não do estudo, e sua recusa não implicará em nenhum prejuízo do atendimento neste Hospital. Todas as informações obtidas estarão à sua disposição ou de seu familiar se assim desejar. Todos os resultados referentes à pesquisa serão utilizados para fins exclusivos de pesquisa, sendo resguardada total confidencialidade

Eu, _____, fui informado(a) dos objetivos e da justificativa da pesquisa de forma clara e detalhada, bem como do procedimento de coleta de sangue que ocorrerá. Recebi também a garantia de resposta a dúvidas ou esclarecimentos relacionados à pesquisa e da segurança da confidencialidade dos dados obtidos.

Os pesquisadores responsáveis por este Projeto são a Dr. Leandro Becker, a Dra. Nadine Clausell, e o Dr. Luis Eduardo Rohde (fone para contato com os pesquisadores 21018344), tendo este projeto sido revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição.

Local e data

Paciente ou responsável:

Nome

Assinatura

Assinatura dos Pesquisadores

Protocolo de avaliação da função endotelial no choque séptico

Número paciente

Nome: _____

Prontuário: _____ id: _____ sexo: _____ raça: _____

Internação no HCPA: _____ Internação UTI: _____

Escore APACHE: _____

Motivo da internação no HCPA:

Comorbidades

Início do choque séptico: _____ Origem da sepse: _____

Etiologia: _____

Vasopressor:

Tipo: _____ início: _____ término _____

Tipo: _____ início: _____ término _____

Data e hora da avaliação basal: _____

Avaliação funcional do endotélio

Circunfer do vaso	BASAL			1 MIN APÓS LIBERAÇÃO DO MANGUITO		
	1ª med					
2ª med						
3ª med						
média						

Variação: _____

Data: _____ Hora: _____

Circunfer do vaso	BASAL			1 MIN APÓS LIBERAÇÃO DO MANGUITO		
	1ª med					
2ª med						
3ª med						
média						

Variação: _____

Data: _____ Hora: _____

Circunfer do vaso	BASAL			1 MIN APÓS LIBERAÇÃO DO MANGUITO		
	1ª med					
2ª med						
3ª med						
média						

Variação: _____

Data: _____ Hora: _____

	Todos (n = 42)	Vivos (n = 28)	Mortos (n = 14)	Valor de p
Idade (anos)	51 ± 19	48 ± 20	57 ± 15	0.15
Sexo Masculino	16 (38)	11 (39)	5 (36)	0.82
Etiologia da sepse				0.15
Enterobacter	2			
Enterococo	2			
Candida	2			
Pseudomonas	2			
Klebsiela pneumoniae	3			
Serratia sp	2			
E. coli	7			
S. aureus	2			
pneumococo	2			
Negativas	24			
PCR (mg/dL)	217 ± 129	198 ± 117	262 ± 149	0,15
Comorbidades				
Hipertensão arterial	8 (19)	5 (62,5)	3 (37,5)	
Tabagismo	5 (12)	1 (20)	4 (80)	
Diabete melito	4 (9)	3 (75)	1 (25)	
História prévia ou atual de neoplasia	2 (5)	1 (50)	1 (50)	
Cardiopatia isquêmica	1 (2)	0	1 (100)	