

Vandack Nobre<sup>1,2</sup>, Thiago Bragança Ataíde<sup>1</sup>, Luisa Caldeira Brant<sup>1</sup>, Clara Rodrigues Oliveira<sup>1</sup>, Lucas Vieira Rodrigues<sup>1</sup>, Antonio Luiz Pinho Ribeiro<sup>2,3</sup>, Fernanda Barbosa Lopes<sup>1</sup>, Ivan Euclides Saraiva<sup>1</sup>, Marcus Vinícius Andrade<sup>3</sup>, em nome do Núcleo Interdisciplinar de Investigação em Medicina Intensiva (NIIMI)

1. Serviço de Terapia Intensiva, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais - Belo Horizonte (MG), Brasil.
2. Programa de Pós-Graduação em Infectologia e Medicina Tropical, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais - Belo Horizonte (MG), Brasil.
3. Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais - Belo Horizonte (MG), Brasil.

**Conflitos de interesse:** Nenhum.

Submetido em 19 de maio de 2016  
Aceito em 23 de agosto de 2016

**Autor correspondente:**

Vandack Nobre  
Centro de Terapia Intensiva  
Avenida Alfredo Balena, 110, 3º andar - Ala Leste  
Bairro Santa Efigênia  
CEP: 30130-090 - Belo Horizonte (MG), Brasil  
E-mail: vandack@gmail.com

**Editor responsável:** Luciano César Pontes de Azevedo

DOI: 10.5935/0103-507X.20160072

## Uso de tonometria arterial periférica - hiperemia reativa e biomarcadores séricos para predição prognóstica na sepse

*Use of reactive hyperemia - peripheral arterial tonometry and circulating biological markers to predict outcomes in sepsis*

### RESUMO

**Objetivo:** Avaliar a utilidade e o valor prognóstico da tonometria arterial periférica - hiperemia reativa em pacientes com sepse, e investigar a associação dos resultados deste exame com os níveis séricos de algumas moléculas inflamatórias.

**Métodos:** Estudo prospectivo, realizado em uma unidade de terapia intensiva para pacientes adultos com 18 leitos. Os critérios de exclusão foram imunossupressão grave ou tratamento com antibióticos iniciado mais de 48 horas antes da avaliação. Aplicamos o exame de tonometria arterial periférica - hiperemia reativa quando da inclusão (dia 1) e no dia 3. Avaliamos os níveis de interleucina 6, interleucina 10, proteínas do grupo 1 de mobilidade alta e de ST2 solúvel no sangue obtido quando da inclusão.

**Resultados:** Dos 79 pacientes incluídos, 17 (21,6%) tiveram os sinais da tonometria arterial periférica - hiperemia reativa considerados tecnicamente não confiáveis, tendo sido excluídos do estudo. Assim, incluímos na análise final 62 pacientes, que foram submetidos a 95 exames de tonometria arterial periférica -

hiperemia reativa dentro das primeiras 48 horas após sua inclusão. A média de idade foi de 51,5 (DP: 18,9), e 49 (62%) dos pacientes eram do sexo masculino. Os índices de hiperemia reativa dos dias 1 e 3 não se associaram com necessidade de vasopressores, SOFA, APACHE II ou mortalidade aos 28 dias. Dentre os pacientes que morreram, em comparação aos sobreviventes, houve aumento significativo nos índices de hiperemia reativa no dia 3 em comparação ao dia 1 ( $p = 0,0045$ ). Ocorreu fraca correlação negativa entre o índice obtido por tonometria arterial periférica - hiperemia reativa no dia 1 e os níveis de proteínas do grupo 1 de mobilidade alta ( $r = -0,287$ ).

**Conclusão:** Dificuldades técnicas e falta de associações claras dos resultados do exame com a gravidade clínica e com o desfecho foram fortes limitantes da utilidade do exame de tonometria arterial periférica - hiperemia reativa em pacientes sépticos admitidos à unidade de terapia intensiva.

**Descritores:** Sepse/metabolismo; Células endoteliais/metabolismo; Biomarcadores; Hiperemia; Manometria/métodos; Prognóstico

### INTRODUÇÃO

A sepse grave é um grande consumidor de recursos em terapia intensiva,<sup>(1)</sup> chegando a 750 mil casos ao ano nos Estados Unidos.<sup>(2,3)</sup> Embora nos últimos anos tenha ocorrido uma melhoria do prognóstico, a mortalidade da sepse continua elevada, chegando a 40 - 50% quando há presença de choque.<sup>(4)</sup>

Sugeriu-se que a base para a disfunção endotelial observada na sepse seria uma resposta adaptativa exagerada e generalizada.<sup>(5)</sup> Antes vista simplesmente

como uma camada celular que recobria os vasos que conduzem oxigênio e nutrientes para os órgãos periféricos, o endotélio é hoje reconhecido como um tecido altamente ativo e multifuncional, que exerce um papel central na proteção do hospedeiro contra agentes patogênicos.<sup>(5)</sup> Os distúrbios do endotélio parecem estar diretamente envolvidos na fisiopatologia do fenômeno distintivo das formas severas de sepse: as disfunções de órgãos.<sup>(6)</sup>

Considerando-se que o endotélio tem uma relevância fundamental na sepse, podemos supor que o estudo da função endotelial em pacientes sépticos tem potencial utilidade para melhorar o tratamento desta síndrome mortal. A função endotelial pode ser avaliada com diferentes ferramentas; por exemplo, pela avaliação da resposta vasomotora ao estímulo farmacológico ou mecânico, pela cateterização vascular invasiva ou por testes não invasivos, ou medindo biomarcadores circulantes que refletem a ativação endotelial.<sup>(7)</sup> O exame de tonometria arterial periférica - hiperemia reativa (RH-PAT - *reactive hyperemia - peripheral arterial tonometry*) é uma técnica não invasiva e independente do usuário, utilizada para medir a função endotelial nos microvasos dos dedos da mão.<sup>(8)</sup> O exame de RH-PAT avalia a capacidade da microcirculação de dilatar-se em resposta a um estresse provocado pela liberação do fluxo sanguíneo após um período de interrupção (isto é, isquemia), uma resposta que depende da biodisponibilidade de óxido nítrico. Recentemente, os resultados de RH-PAT foram associados à gravidade da enfermidade em pacientes com sepse.<sup>(9)</sup>

No presente trabalho, procuramos investigar a associação dos valores obtidos por RH-PAT com a mortalidade por todas as causas aos 28 dias em um grupo de pacientes sépticos admitidos em unidade de terapia intensiva de um hospital universitário. Avaliamos também a associação da função endotelial microvascular, com base nos exames de RH-PAT, e a gravidade da doença e a mortalidade, em comparação aos níveis circulantes de cinco marcadores biológicos da inflamação. Finalmente, buscamos descrever as dificuldades observadas durante o uso do teste de RH-PAT nas condições da unidade de terapia intensiva.

## MÉTODOS

O presente estudo é ramo de um estudo de coorte de pacientes sépticos conduzido na unidade de terapia intensiva (UTI) mista de 18 leitos do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG). O HC-UFMG dispõe de 506 leitos ativos, e trata-se de um hospital de referência regional para o tratamento de pacientes com enfermidades de complexidades moderada e alta.

No período compreendido entre outubro de 2012 e outubro de 2013, todos os pacientes adultos (isto é, com idade igual ou maior que 18 anos) admitidos à UTI com suspeita ou confirmação de sepse grave ou choque séptico, definidos segundo o Consenso Sepse 2,<sup>(6)</sup> foram avaliados quanto à sua possível elegibilidade. Os critérios de exclusão foram: (1) mais de 48 horas de tratamento com antibióticos; (2) diagnóstico conhecido de infecção por HIV com contagem de linfócitos CD4+ abaixo de 200 células/mm<sup>3</sup>; (3) pacientes com neutropenia grave (menos de 500 células/mL); (4) pacientes após transplante de órgãos sólidos ou de medula óssea, ou em uso de terapia imunossupressora; (5) pacientes que tivessem recebido mais de 0,5mg/kg de prednisona ou equivalente nas últimas 2 semanas; (6) pacientes em tratamento paliativo; e (7) pacientes vítimas de trauma múltiplo, queimaduras ou cirurgia de grande porte nos 5 dias prévios. Especificamente para o estudo do teste RH-PAT, foram também excluídos pacientes com baixa contagem de plaquetas (< 20.000/mm<sup>3</sup>), pacientes com outras alterações graves da coagulação (por exemplo, índice internacional normalizado [INR - *international normalized ratio*] > 5, tempo de tromboplastina parcial ativada - TTPa > 120 segundos), e pacientes não sedados, incapazes de cooperar com o procedimento em razão de agitação.

Os dados dos pacientes foram coletados de forma prospectiva, utilizando uma ficha clínica dedicada, por meio de consulta aos registros eletrônicos e em papel. A coleta dos dados foi realizada por dois médicos (TA e IS) e confirmada por dois gerentes de equipe (CRO e LB). Foram colhidas as seguintes variáveis: idade, sexo, dados microbiológicos, local de infecção, presença de comorbidades (diabetes, nefropatia crônica, insuficiência hepática, tumor sólido, doença hematológica maligna, insuficiência cardíaca, eventos cerebrovasculares prévios, ventilação mecânica e hemodiálise), mortalidade na UTI e aos 28 dias por todas as causas, e duração da permanência na UTI e no hospital.

Os principais desfechos medidos foram necessidade de usar vasopressores durante as primeiras 48 horas após a inclusão, e mortalidade por todas as causas aos 28 dias.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética local (CAAE - 0319.0.203.000-11) e todos os pacientes ou seus responsáveis legais assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

## Ensaio laboratoriais

As amostras de sangue foram coletadas por ocasião da inclusão no estudo, no dia 3 e no dia 7 de seguimento. As

amostras foram centrifugadas, e o soro, separado em cinco alíquotas de 0,5mL. A seguir, as alíquotas foram armazenadas a -80°C.

Os níveis de proteína C-reativa (PCR) foram medidos quando da inclusão (dia 1), e nos dias 3 e dia 7 de seguimento, por meio de química seca, utilizando o sistema Ektachem 950ICR System (Johnson & Johnson Clinical Diagnostics, Inc., Rochester, NY, EUA). O limite de detecção para PCR foi de 7mg/L. Consideramos anormais os valores acima de 10mg/dL.

Os níveis séricos de interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10) e proteínas do grupo 1 de mobilidade alta (HMGB1 - *high-mobility group box 1 protein*) e proteína ST2 solúvel (sST2) foram medidos no soro obtido quando da inclusão e armazenado a -70°C, descongelado em temperatura ambiente. Os níveis de HMGB1 e sST2 foram medidos por captura com ELISA utilizando os *kits* II Elisa para HMGB1 (IBL International GMB, Hamburg, Alemanha) e o ST2/IL-1 R4 Quantikine ELISA Kit (R&D systems, Minneapolis, MN, EUA), respectivamente. A quantificação foi realizada pela medida da absorbância a 45nm, e os resultados foram expressos como nanogramas de antígeno por mililitro. Os níveis de IL-6 e IL-10 foram medidos utilizando microesferas fluorescentes em citometria de fluxo, com uso do método Cytometric Bead Array (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA). Todos os procedimentos foram realizados em conformidade com as instruções correspondentes dos fabricantes.

### Tonometria arterial periférica - hiperemia reativa

A função endotelial microvascular foi determinada com um dispositivo automático (EndoPAT2000, Itamar Medical, Caesarea, Israel), com a técnica já descrita.<sup>(10)</sup> Em resumo, o manguito era colocado no braço não dominante, 2cm acima da fossa cubital, e testes de RH-PAT na polpa de cada dedo indicador eram realizados. Utilizamos o braço dominante nos pacientes monitorados com pressão intra-arterial radial no punho contralateral. Após um período de equilíbrio, mediu-se a amplitude basal do pulso por 5 minutos. O fluxo arterial foi interrompido em um dos lados por 5 minutos por insuflação do manguito, com pressão de oclusão de 200mmHg, ou 60mmHg acima da pressão arterial sistólica. Após o período de oclusão por 5 minutos, o manguito foi desinflado para induzir hiperemia reativa, e registramos o sinal de RH-PAT em ambas as mãos por um período adicional de 5 minutos. Utilizamos o dedo contralateral como controle quanto a alterações sistêmicas. O índice de hiperemia reativa (IHR) é calculado

automaticamente pelo equipamento de RH-PAT por meio de fórmula proposta pelo fabricante. Ela é definida como a proporção entre a amplitude do pulso pós-deflação 90 a 150 segundos após a liberação do manguito e a média da amplitude basal do pulso. Este resultado é dividido pela proporção correspondente do dedo controle, e multiplicado por um fator de correção basal. Este último cálculo tem a intenção de ajustar o índice quanto à influência do tônus vascular basal. Valores mais baixos de IHR se relacionam ao comprometimento da resposta vasodilatadora endotelial. Dois investigadores treinados (TAB e LVR) executaram os exames de RH-PAT consecutivamente (isto é, não como testes duplicados), e um dos coautores (LCB) cuidou do controle de qualidade de todos os exames. As razões para exclusão de estudos foram sinais com ruído, duração da oclusão > 5,5 ou < 4,5 minutos, e surgimento de curva de pressão arterial durante a oclusão do braço.<sup>(11)</sup>

### Análise estatística

As variáveis categóricas são apresentadas segundo sua frequência absoluta e relativa. Com relação aos dados contínuos, utilizamos a mediana 25 - 75% do intervalo interquartil (Q1 - Q3) para variáveis sem distribuição normal, enquanto utilizamos média e desvio padrão (DP) para as variáveis com distribuição normal. Os pacientes foram comparados utilizando o teste do Qui quadrado ou o teste exato de Fisher e o teste *t* de Student ou o teste U de Mann-Whitney, conforme apropriado. Os resultados de IHR obtidos dos mesmos pacientes em diferentes momentos de avaliação (isto é, dia 1 e dia 3) foram comparados utilizando o teste de Wilcoxon.

A correlação entre as variáveis contínuas foi avaliada com uso do teste de Spearman em razão da natureza não normal destas variáveis. As variáveis incluídas nestas análises foram IHR, *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II* (APACHE II), *Sequential Organ Failure Score* (SOFA), e níveis circulantes das moléculas IL-6, IL-10, sST2, HMGB1 e PCR).

Para todas as análises, estabelecemos um teste bicaudal com significância para valores de *p* inferiores a 0,05. Todos os dados foram analisados com uso do pacote estatístico SPSS, versão 20.1 (SPSS, Chicago, IL).

### RESULTADOS

Durante o período do estudo, avaliamos, no total, 99 pacientes com sepse, dos quais 79 foram submetidos ao exame RH-PAT dentro das primeiras 48 horas após a inclusão. Dos 79 pacientes, 17 (21,6%) tiveram seus sinais

obtidos nos exames de RH-PAT realizados dentro das primeiras 48 horas (no dia 1 ou no dia 3) considerados tecnicamente não confiáveis, e foram excluídos do estudo (Figura 1). Assim, a análise final incluiu 62 indivíduos com, no mínimo, um exame confiável de RH-PAT. Não houve diferença na proporção de pacientes com choque séptico entre os 17 pacientes excluídos (82,4%) e os 62 pacientes com sinais confiáveis (75,8%), com  $p = 0,749$ .

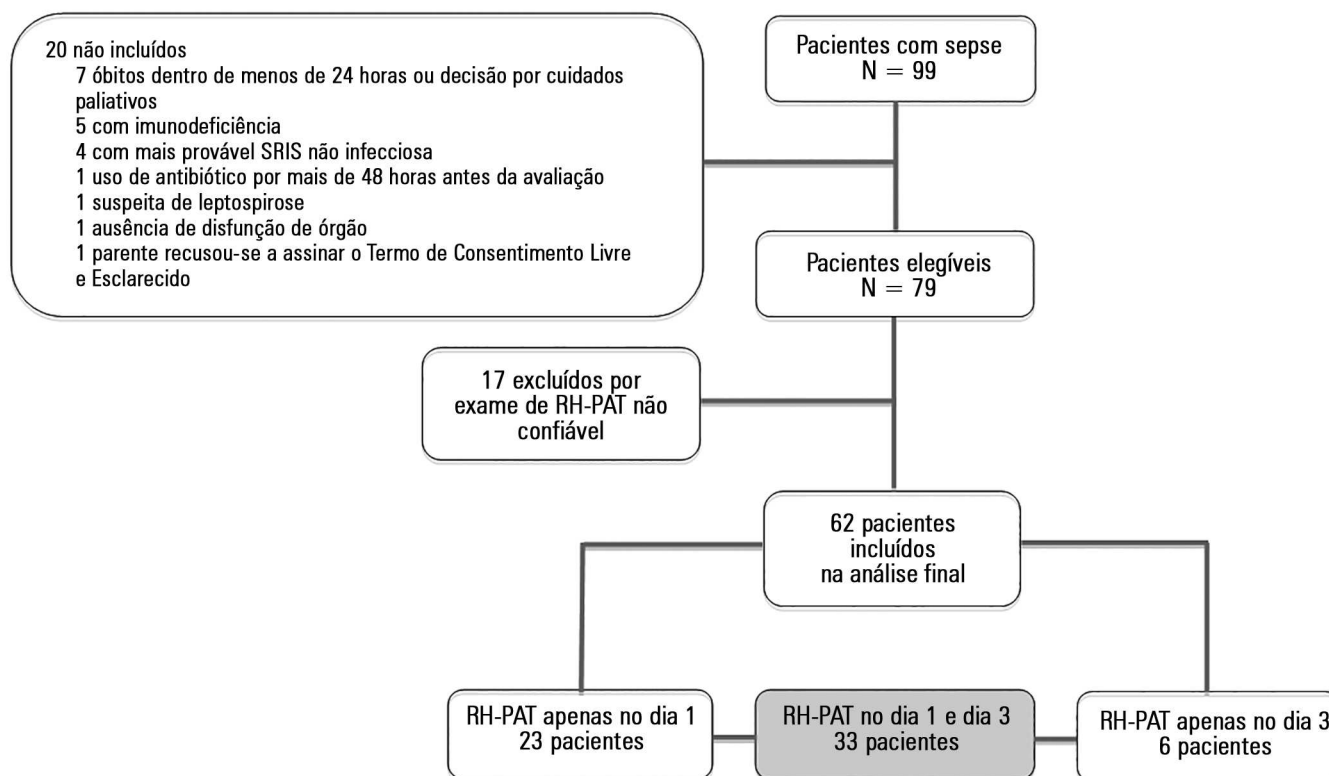
Foram realizados, no total, 95 exames de RH-PAT em 62 indivíduos estudados como segue: 56 (90,3%) exames realizados no dia 1 e 39 (62,9%) realizados no dia 3. Trinta e três (53,2%) dos 62 pacientes foram avaliados por RH-PAT nos dois momentos de avaliação, isto é, nos dias 1 e 3. As razões para não realização do exame em ambos os momentos, ou seja, nos dias 1 e 3 nos 29 indivíduos foram: presença de um critério de exclusão no dia 3 (14 casos), questões técnicas e logísticas que impediram a realização do RH-PAT no dia 1 (6 casos) ou no dia 3 (5 casos), e óbito antes do terceiro dia de seguimento (4 casos). Especificamente para o dia 3, observaram-se os seguintes critérios de exclusão: decisão por cuidados paliativos (quatro casos), agitação psicomotora (oito casos) e nível baixo

de plaquetas (dois casos). As principais características que os 62 pacientes incluídos na análise final apresentavam são demonstradas na tabela 1. Na tabela 2 apresentamos as mesmas características por subgrupo dos 33 pacientes com exames de RH-PAT realizados nos dias 1 e 3.

### Tonometria arterial periférica - hiperemia reativa

Os valores de IHR obtidos nos dias 1 e 3 são apresentados na tabela 3. Não se encontrou diferença, em termos de IHR, nos dias 1 e 3 e na tendência de IHR (dia 3 - dia 1) quando os subgrupos de pacientes com necessidade de vasopressores durante as primeiras 48 horas de seguimento ou sem essa necessidade foram comparados ( $p = 0,179$ ,  $p = 0,105$  e  $p = 0,868$ , respectivamente). Mais ainda, não se observou qualquer correlação significativa entre os valores de IHR medidos nos dias 1 e 3 ou a diferença destes valores (tendência de IHR) e os escores de disfunção (SOFA) e gravidade (APACHE II), ou os níveis basais de lactato.

Os valores de IHR medidos nos dias 1 e 3 não foram diferentes entre os pacientes que morreram dentro de 28 dias de seguimento quando comparados aos dos sobreviventes ( $p = 0,203$  e  $p = 0,712$ , respectivamente). No



**Figura 1** - Fluxograma dos procedimentos do estudo. SRIS - síndrome de resposta inflamatória sistêmica; RH-PAT - tonometria arterial periférica - hiperemia reativa.

**Tabela 1** - Principais características dos 62 pacientes incluídos no estudo

Características	Geral (N = 62)	Sobreviventes (N = 45)	Não sobreviventes (N = 17)
Idade	51,5 (18,9)	47,4 (15,9)	62,3 (18,4)
Sexo masculino	49 (62,0)	28 (62,2)	11 (64,7)
Tipo de admissão			
Clínica	54 (87,1)	40 (88,9)	14 (82,4)
Cirurgia não trauma	8 (12,9)	5 (11,1)	3 (17,6)
Comorbidades			
Hipertensão arterial	25 (40,3)	17 (37,8)	8 (47,1)
Insuficiência cardíaca	11 (17,7)	7 (15,6)	4 (23,5)
Insuficiência renal crônica	12 (19,4)	7 (15,6)	5 (29,4)
Diabetes	12 (19,4)	9 (20,0)	3 (17,6)
AVC prévio	8 (12,9)	7 (15,6)	1 (5,9)
Coronariopatia crônica	10 (16,1)	6 (31,3)	4 (23,5)
Neoplasia sólida	8 (12,9)	5 (11,1)	3 (17,6)
Tabagismo ativo (últimos 6 meses)	13 (21)	13 (28,9)	0 (0)
Uso de estatinas	18 (22,8)	10 (22,2)	4 (23,5)
Hipercolesterolemia conhecida	8 (10,1)	4 (8,8)	1 (5,9)
APACHE II (primeiras 24 horas)	16 [12 - 20]	14 [9 - 18,5]	19 [17 - 28,5]
SOFA (primeiras 24 horas)	7 [5 - 9]	6 [5 - 8,5]	9 [6,5 - 12,5]
Microbiologia confirmada	37 (59,7)	27 (60,0)	10 (58,8)
Hemocultura positiva	26 (41,9)	18 (40,0)	8 (47,1)
Local de infecção			
Pulmão	27 (43,5)	20 (44,4)	7 (4,2)
Abdome	12 (19,4)	8 (17,8)	4 (23,5)
Cateter	7 (11,3)	5 (11,1)	2 (11,8)
Pele e tecidos moles	7 (11,3)	4 (8,9)	3 (17,6)
Urina	2 (3,2)	2 (4,4)	0 (0)
Outros	7 (11,3)	6 (31,3)	1 (5,9)
Creatinina	1,15 [0,6 - 2,54]	1,5 (1,4)	2,2 (1,6)
Esteroides nas primeiras 48 horas	14 (22,6)	7 (15,6)	7 (41,2)
Inotrópicos quando da inclusão	12 (19,4)	7 (15,6)	5 (29,4)
Vasopressores quando da inclusão	47 (75,8)	33 (73,3)	14 (82,3)
Diálise nas primeiras 48 horas	13 (21)	6 (13,3)	7 (41,2)
Óbito na UTI	14 (22,6)	-	-
Óbito nos 28 dias	17 (27,4)	-	-

AVC - acidente vascular cerebral; APACHE II - *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II*; SOFA - *Sequential Organ Failure Assessment*; UTI - unidade de terapia intensiva. Resultados expressos por número (%), média (desvio padrão) ou mediana [25 - 75%].

subgrupo de 33 pacientes com teste de RH-PAT nos dias 1 e 3, observou-se aumento mais expressivo dos valores de IHR (incremento mediano = 0,295) entre os pacientes não sobreviventes, quando comparados aos sobreviventes (redução mediana = 0,080), com  $p = 0,045$  (Figura 2).

### Marcadores biológicos circulantes

Os valores medianos de PCR circulante e das moléculas inflamatórias HMGB1, IL-6, IL-10 e sST2 medidas no dia 1 são apresentados na tabela 3. Nenhum dos marcadores testados teve seus níveis circulantes medianos com

**Tabela 2** - Principais características dos 33 pacientes com exame de tonometria arterial periférica - hiperemia reativa realizado no dia 1 e no dia 3

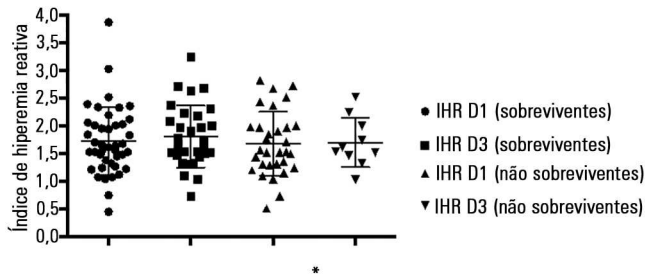
Características	Geral (N = 33)	Características	Geral (N = 33)
Idade	46,5 (18,9)	Pós-operatório, sistema nervoso central	5 (15,1)
Sexo masculino	21 (63,6)	Cateter	4 (12,1)
Tipo de admissão		Pele e tecidos moles	2 (6,0)
Clínica	29 (87,9)	Urina	1 (3,0)
Cirurgia não trauma	4 (12,1)	Outros	2 (6,0)
Comorbidades		IHR dia 1	1,68 [1,40 - 2,04]
Hipertensão arterial	14 (42,4)	IHR dia 1	1,72 (0,51)
Insuficiência cardíaca	4 (12,1)	IHR dia 3	1,61 [1,46 - 2,23]
Insuficiência renal crônica	4 (12,1)	IHR dia 3	1,82 (0,51)
Diabetes	5 (15,2)	IHR tendência	0,020 [-0,300-0,365]
AVC prévio	4 (12,1)	HMGB1 dia1	14,29 [8,02 - 24,55]
Coronariopatia crônica	3 (9,1)	IL-6 dia 1	277,5 [41,6 - 713,8]
Neoplasia sólida	3 (9,1)	IL-10 dia 1	3,01 [0,77 - 8,08]
Tabagismo ativo (últimos 6 meses)	8 (24,4)	sST2 dia 1	1761,3 [925,7 - 3269,0]
Uso de estatinas	5 (15,2)	Proteína C-reativa	205,0 [145,5 - 248,5]
Hipercolesterolemia conhecida	3 (9,1)	Creatinina	1,30 [0,5 - 3,30]
APACHE II (primeiras 24 horas)	15 (9-20,5)	Esteroides nas primeiras 72 horas	6 (18,2)
SOFA (primeiras 24 horas)	6 (5-9)	Inotrópicos nas primeiras 72 horas	4 (12,1)
Microbiologia confirmada	17 (51,5)	Vasopressores nas primeiras 48 horas	21 (63,6)
Hemocultura positiva	14 (42,4)	Diálise nas primeiras 48 horas	6 (18,2)
Local de infecção		Óbito na UTI	4 (12,1)
Pulmão	13 (39,4)	Óbito nos 28 dias	6 (18,2)
Abdome	6 (18,2)		

AVC - acidente vascular cerebral; APACHE II - *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II*; SOFA - *Sequential Organ Failure Assessment*; IHR - índice de hiperemia reativa; HMGB1 - proteínas do grupo 1 de mobilidade alta; IL-6 - interleucina 6; IL-10 - interleucina 10; sST2 - ST2 solúvel; UTI - unidade de terapia intensiva. Resultados expressos por número (%), média (desvio padrão) ou mediana [25 - 75%].

**Tabela 3** - Índice de hiperemia reativa e níveis séricos de marcadores biológicos observados entre os pacientes no estudo, segundo o desfecho

Variáveis	Sobreviventes (N = 45)	Não sobreviventes (N = 17)	Valor de p
IHR dia 1	1,62 [1,30 - 2,03]	1,44 [1,23 - 2,45]	0,203
IHR dia 3	1,66 [1,45 - 2,19]	1,53 [1,39 - 1,99]	0,712
IHR tendência	-0,080 [-0,320 - 0,340]	0,295 [0,167 - 0,795]	0,045
HMGB1 dia 1	15,97 [7,22 - 24,52]	15,23 [9,08 - 23,30]	0,937
IL-6 dia 1	316,7 [103,3 - 864,9]	278,1 [195,7 - 1767,7]	0,937
IL-10 dia 1	5,04 [1,19 - 11,54]	4,27 [1,66 - 9,11]	0,623
sST2 dia 1	1660,5 [976,2 - 2844,4]	2136,8 [1401,3 - 2872,7]	0,222
Proteína C-reativa	223,0 [180,5 - 332,5]	252,5 [198,4 - 357,7]	0,569

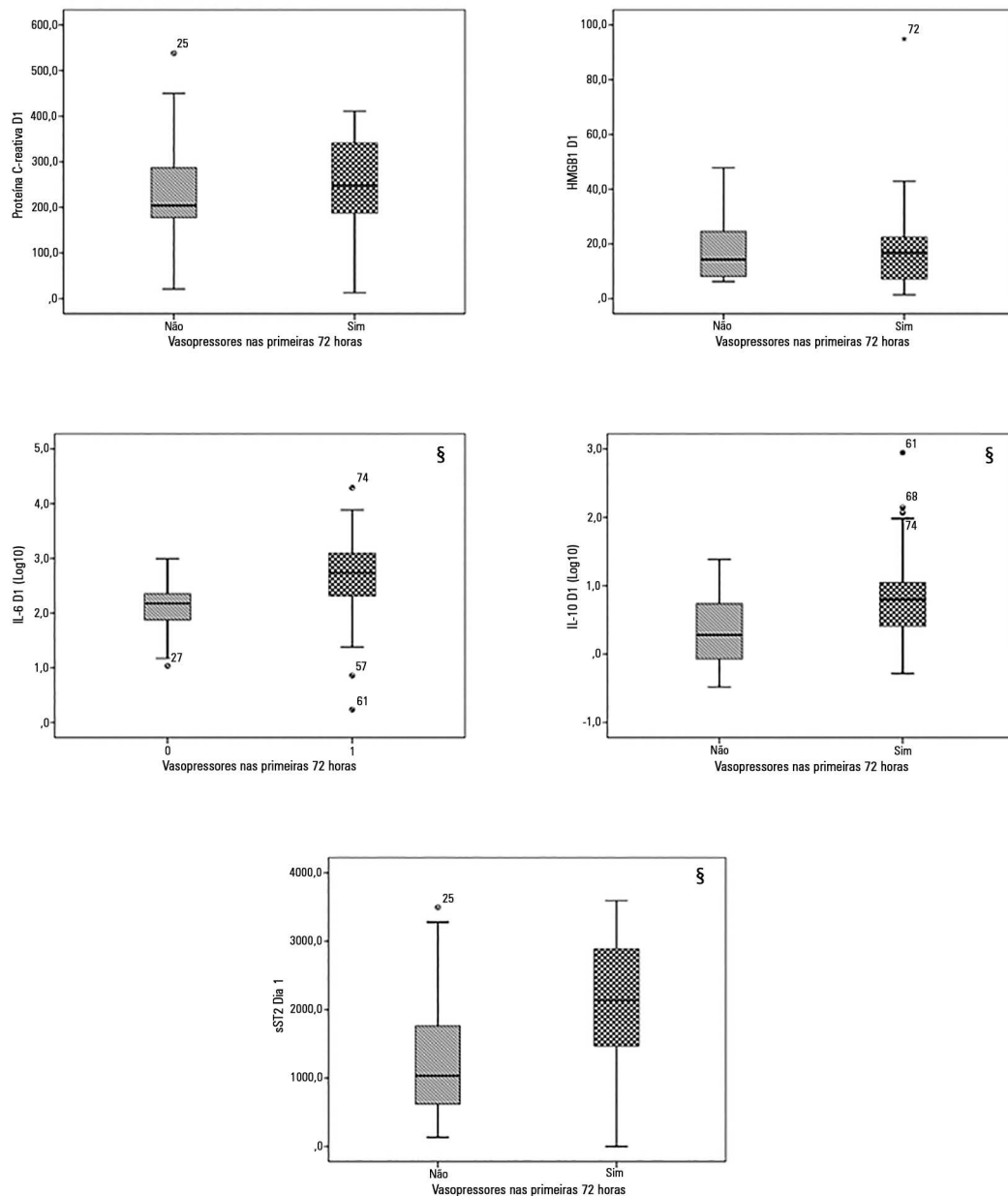
IHR - índice de hiperemia reativa; HMGB1 - proteínas do grupo 1 de mobilidade alta; IL6 - interleucina 6; IL-10 - interleucina 10; sST2 - ST2 solúvel. Teste de Mann-Whitney para todas as comparações. Resultados expressos como mediana [25 - 75%].



**Figura 2** - Índice de hiperemia reativa medido quando da inclusão e no terceiro dia de seguimento, segundo o desfecho aos 28 dias. IHR - índice de hiperemia reativa; D1 - dia 1; D3 - dia 3. Esta análise foi restrita ao subgrupo de 33 pacientes com o índice de hiperemia reativa testado na inclusão e no terceiro dia de seguimento. Houve aumento significativo dos valores de índice de hiperemia reativa desde a inclusão até o terceiro dia de seguimento. \*  $p < 0,05$ .

diferença significativa entre pacientes que morreram dentro de 28 dias de seguimento e pacientes sobreviventes. Com relação à gravidade da sepse, observamos que os níveis circulantes de IL-6 ( $p = 0,002$ ), IL-10 ( $p = 0,034$ ) e sST2 ( $p = 0,020$ ) foram significativamente mais altos entre os pacientes com choque séptico do que nos pacientes com sepse grave, que responderam a ressuscitação hídrica (Figura 3).

Observou-se uma fraca correlação negativa ( $r = -0,287$ ) entre o valor basal de IHR (dia 1) e os níveis de HMGB1 ( $p = 0,034$ ). Não se encontrou qualquer correlação significativa entre as demais moléculas e os resultados de IHR.



**Figura 3** - Níveis dos biomarcadores testados, segundo a necessidade de vasopressores pelos pacientes estudados. HMGB1 - proteínas do grupo 1 de mobilidade alta; IL-6 - interleucina 6; D1 - dia 1; IL-10 - interleucina 10; sST2 - ST2 solúvel. §  $p < 0,05$ .

## DISCUSSÃO

Neste estudo prospectivo com pacientes sépticos, encontramos que a função endotelial microvascular avaliada por meio do RH-PAT, um método não invasivo e independente do usuário não se correlacionou com a gravidade da sepse e não se associou com a mortalidade por todas as causas aos 28 dias. Uma tendência imprevista de aumento (isto é, melhora) nos valores de IHR foi observada entre pacientes não sobreviventes. Mais ainda, com exceção de uma fraca correlação negativa entre os níveis de HMGB1 e os valores de IHR, não se observou qualquer correlação entre os níveis de moléculas inflamatórias testadas e os resultados de RH-PAT. Por último, elevada proporção de pacientes sépticos inicialmente incluídos no estudo teve seus resultados de RH-PAT rejeitados em função de má qualidade, o que implica baixa utilidade deste método em pacientes graves.

O fluxo sanguíneo microcirculatório e a função endotelial podem ser avaliados por diferentes técnicas. Marcadores biológicos, como o lactato, representam um indicador clássico de hipoperfusão tissular, o que o torna útil para definir a gravidade da doença e dirigir a ressuscitação inicial na sepse grave.<sup>(12)</sup> Dispositivos à base de laser Doppler, técnicas microvideoscópicas e videocapilaroscopia periungueal representam ferramentas interessantes para avaliação das condições microcirculatórias, porém todos encaram importantes limitações, que impedem seu uso no controle rotineiro de pacientes sépticos.<sup>(13)</sup> A observação de imagem obtida por meio de polarização ortogonal e campo escuro *sidestream* são técnicas videomicroscópica amplamente testadas em estudos experimentais. Embora tenham sido publicados estudos clínicos interessantes com estes dispositivos em pacientes sépticos,<sup>(14,15)</sup> há inúmeros obstáculos a superar antes que estas técnicas possam tornar-se parte do arsenal rotineiro no controle da sepse.

Quanto a estudos que avaliem a função endotelial, Becker et al. compararam um grupo de pacientes com sepse (APACHE II médio de  $23 \pm 7$ ) a controles saudáveis e demonstraram que uma menor vasodilatação mediada por fluxo (FMD - *flow-mediated vasodilation*) da artéria braquial, uma mensuração obtida com um método não invasivo que se baseia em ultrassom, estava presente no grupo de pacientes sépticos quando comparados ao controle.<sup>(16)</sup> Estes achados sugerem que ocorre um comprometimento da vasodilatação arterial compensatória na sepse. Mais ainda, em comparação aos sobreviventes, uma proporção significativamente maior de não sobreviventes dentre os pacientes sépticos teve um declínio dos valores de FMD a partir do dia da inclusão até o terceiro dia de

seguimento. Em razão de sua independência do usuário, da facilidade de realização e do baixo consumo de tempo para sua execução, a RH-PAT parece uma ferramenta atraente para avaliação da função endotelial na microcirculação de pacientes sépticos. Assumimos inicialmente que a resposta de vasodilatação arterial representada pelo IHR seria inibida nos pacientes sépticos, provavelmente em razão de uma menor biodisponibilidade de óxido nítrico e uma disfunção endotelial; tínhamos ainda como hipótese que esta inibição seria proporcional à gravidade da doença, sendo mais pronunciada em não sobreviventes. De fato, o valor médio de IHR no dia 1 que se observou nos pacientes estudados ( $1,71 \pm 0,62$ ) foi mais baixo do que o observado por Brant et al. em recente estudo de reprodutibilidade realizado em um grupo de participantes adultos (73% eram homens, média de idade de cerca de 52 anos) de uma coorte a respeito dos determinantes de cardiopatias no Brasil.<sup>(10)</sup> Nesse estudo, o IHR médio não variou significativamente entre os dois exames realizados com intervalo de 2 a 6 horas, sendo respectivamente de  $1,92 \pm 0,56$  e  $1,96 \pm 0,58$ . A diferença que se observa entre os resultados de Brant e os nossos sugere um comprometimento da resposta vasodilatadora da microcirculação nos pacientes com sepse, pelo menos naqueles com uma ou mais disfunções de órgãos.

Davis et al.<sup>(17)</sup> encontraram resultados similares aos nossos, com valores médios de IHR de 1,57 (intervalo de confiança de 95% - IC95%: 1,44 - 1,71) em pacientes com sepse grave, valor significativamente mais baixo do que o observado em controles saudáveis.<sup>(9)</sup> No entanto, diferentemente de relatos prévios, não encontramos qualquer correlação significativa entre valores de IHR, gravidade da doença e desfecho do paciente. Davis et al.<sup>(17)</sup> demonstraram em seu estudo que a média basal de IHR observada em um grupo de 85 pacientes sépticos foi inversamente proporcional à gravidade da doença (isto é, presença de choque e escore APACHE II). Surpreendentemente, em nosso estudo, pacientes com desfecho ruim tiveram leve, mas significativa melhora do IHR entre os dias 1 e 3. Se assumirmos que nosso pacientes foram incluídos mais tardiamente na evolução da sepse, nossos achados poderiam ser parcialmente explicados pela variação na atividade do óxido nítrico endotelial no decorrer da síndrome.<sup>(18)</sup> Foi demonstrado que os estágios mais tardios da sepse podem ser caracterizados por aumento da produção de óxido nítrico, que causa vasodilatação microcirculatória difusa e, portanto, queda da pressão arterial. Este excesso de biodisponibilidade de óxido nítrico pode contribuir para o choque refratário, que se observa no espectro mais grave de pacientes.<sup>(18)</sup> Como alternativa, este estudo pode ter



sofrido um viés, já que os pacientes com enfermidade mais grave podem ter morrido antes de sua inclusão no estudo ou antes do dia 3, de forma que não foram avaliados por RH-PAT nesse dia. Quanto a este ponto, convém mencionar que a proporção de pacientes com tempo de permanência na UTI de 3 ou menos dias foi similar entre os grupos de sobreviventes e não sobreviventes (17,8% *versus* 17,6%;  $p = 1,00$ ). Finalmente, uma vez que os níveis de IHR medidos nos dias 1 e 3 não se correlacionaram com mortalidade, a melhora do IHR desde a inclusão até o dia 3 nos indivíduos que não sobreviveram pode ter resultado do acaso, fazendo-se necessários mais estudos para confirmação destes resultados.

No presente estudo também investigamos se os níveis circulantes basais de PCR e de quatro outros marcadores biológicos se correlacionavam com os valores de IHR. Três destes marcadores têm propriedades predominantemente pró-inflamatórias (IL-6, HMGB1 e sST2), e o remanescente é uma citocina regulatória (IL-10). A justificativa para medir IL-6 e IL-10 foi a melhor caracterização do perfil do paciente por ocasião da inclusão no estudo, se a ação inflamatória (IL-6) ou anti-inflamatória (IL-10) teriam influência na tonometria arterial. Recentemente, foi noticiado que as HMGB1 podem potencializar a liberação de moléculas de adesão ICAM-1, VCAM-1 e selectina E nas membranas endoteliais, o que pode estar associado à disfunção endotelial.<sup>(19)</sup> Foi amplamente demonstrado um papel da IL-33 e ST2 em numerosas doenças, mas principalmente na fisiopatologia de doenças cardiovasculares.<sup>(20)</sup> Quisemos avaliar se as HMGB1 e sST2 podem prever a função endotelial microvascular medida por RH-PAT em pacientes sépticos. Conforme apresentado, apenas os níveis de HMGB1 tiveram correlação significativa (fraca e negativa) com o IHR medido no dia 1. O significado destes achados deve ser investigado em futuros estudos. É interessante observar que IL-6, IL-10 e sST2 foram significativamente mais altas em pacientes com necessidade de vasopressores durante as primeiras 48 horas de acompanhamento.

O presente estudo tem diversas limitações, que devem ser reconhecidas. Primeiramente, incluímos uma amostra pequena de pacientes em um único centro, limitando o poder de nossa análise estatística e a extrapolação de nossos achados para outros ambientes. Em segundo lugar, não incluímos um grupo controle de voluntários saudáveis, ou um grupo de pacientes de terapia intensiva sem sepse. Para superar estas falhas, comparamos os resultados encontrados de IHR neste estudo com os publicados por Brant et al.<sup>(10)</sup> Estes autores estudaram 123 adultos com proporção entre os sexos e faixa etária similares aos de nossos

pacientes. Mais ainda, o estudo de Brant et al. incluiu pacientes que viviam na mesma cidade que os do presente estudo. Além disto, não pudemos testar indicadores melhores e mais específicos da função endotelial, como L-arginina, E-selectina, angiopetina-2, células endoteliais circulantes, dentre outros. Igualmente, devemos enfatizar que mais de um quinto dos pacientes sépticos inicialmente incluídos neste estudo foi excluído da análise final em razão de os resultados de RH-PAT serem não confiáveis. RH-PAT foi descrito como método para ser utilizado em ambiente controlado<sup>(21)</sup> com condições de luz, temperatura e cooperação do paciente necessárias para obtenção de resultados válidos. Mais ainda, o uso de medicações pode ter influenciado nos resultados. A proporção de resultados não confiáveis acima citada nos tornou reticentes quanto à validade deste método para avaliar a função endotelial microvascular em pacientes de UTI. Por último, não podemos precisar o número exato de horas que se passaram entre o diagnóstico de sepse e os exames de RH-PAT.

## CONCLUSÃO

Neste estudo com pacientes sépticos que tinham pelo menos uma disfunção de órgão, identificamos que os resultados do exame de tonometria arterial periférica - hiperemia reativa não puderam distinguir indivíduos com doença mais grave de outros com doença menos grave. Além do mais, este exame não identificou indivíduos com desfecho desfavorável entre os pacientes estudados. Os resultados do exame de tonometria arterial periférica - hiperemia reativa no dia 1 tiveram correlação negativa com os níveis de proteínas do grupo 1 de mobilidade alta medidos quando da inclusão, e este achado merece ser melhor investigado. Além de sua pobre capacidade prognóstica, o exame de tonometria arterial periférica - hiperemia reativa comprovou ser uma ferramenta limitada para uso em pacientes na unidade de terapia intensiva, mostrando resultados não confiáveis em até um quinto dos exames.

## Contribuições dos autores

V Nobre concebeu o estudo, supervisionou a coleta de dados, analisou os dados, redigiu e revisou o manuscrito; TB Ataíde colheu os dados, redigiu e revisou o manuscrito; LC Brant analisou os exames de PAT, redigiu e revisou o manuscrito; LV Rodrigues colheu os dados, redigiu e revisou o manuscrito; ALP Ribeiro analisou os exames de PAT, redigiu e revisou o manuscrito; FB Lopes colheu os dados, redigiu e revisou o manuscrito; IE Saraiva colheu os dados, redigiu e revisou o manuscrito; MV Andrade concebeu o estudo, analisou os dados, redigiu e revisou o manuscrito.

## ABSTRACT

**Objective:** To evaluate the usefulness and prognostic value of reactive hyperemia - peripheral arterial tonometry in patients with sepsis. Moreover, we investigated the association of reactive hyperemia - peripheral arterial tonometry results with serum levels of certain inflammatory molecules.

**Methods:** Prospective study, conducted in an 18-bed mixed intensive care unit for adults. The exclusion criteria included severe immunosuppression or antibiotic therapy initiated more than 48 hours before assessment. We measured the reactive hyperemia - peripheral arterial tonometry on inclusion (day 1) and on day 3. Interleukin-6, interleukin-10, high-mobility group box 1 protein and soluble ST2 levels were measured in the blood obtained upon inclusion.

**Results:** Seventeen of the 79 patients (21.6%) enrolled were determined to have reactive hyperemia - peripheral arterial tonometry signals considered technically unreliable and were excluded from the study. Thus, 62 patients were included in the final analysis, and they underwent a total of 95 reactive

hyperemia - peripheral arterial tonometry exams within the first 48 hours after inclusion. The mean age was 51.5 (SD: 18.9), and 49 (62%) of the patients were male. Reactive hyperemia indexes from days 1 and 3 were not associated with vasopressor need, Sequential Organ Failure Assessment score, Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II score, or 28-day mortality. Among the patients who died, compared with survivors, there was a significant increase in the day 3 reactive hyperemia index compared with day 1 ( $p = 0.045$ ). There was a weak negative correlation between the day 1 reactive hyperemia - peripheral arterial tonometry index and the levels of high-mobility group box 1 protein ( $r = -0.287$ ).

**Conclusion:** Technical difficulties and the lack of clear associations between the exam results and clinical severity or outcomes strongly limits the utility of reactive hyperemia - peripheral arterial tonometry in septic patients admitted to the intensive care unit.

**Keywords:** Sepsis/metabolism; Endothelial cells/metabolism; Biomarkers; Hyperemia; Manometry/methods; Prognosis

## REFERÊNCIAS

- Brun-Buisson C, Doyon F, Carlet J, Dellamonica P, Guoin F, Lepoutre A, et al. Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults. A multicenter prospective study in intensive care units. French ICU Group for Severe Sepsis. *JAMA*. 1995;274(12):968-74.
- 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(16):1546-54.
- Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*. 2001;29(7):1303-10.
- Vincent JL, Marshall JC, Namendys-Silva SA, Francois B, Martin-Loeches I, Lipman J, et al. Assessment of the worldwide burden of critical illness: the intensive care over nations (ICON) audit. *Lancet Respir Med*. 2014;2(5):380-6.
- Ait-Oufella H, Maury E, Lehoux S, Guidet B, Offenstadt G. The endothelium: physiological functions and role in microcirculatory failure during severe sepsis. *Intensive Care Med*. 2010;36(8):1286-98.
- Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G; SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med*. 2003;31(4):1250-6. Review.
- Deanfield J, Donald A, Ferri C, Giannattasio C, Halcox J, Halligan S, Lerman A, Mancina G, Oliver JJ, Pessina AC, Rizzoni D, Rossi GP, Salvetti A, Schiffrin EL, Taddei S, Webb DJ; Working Group on Endothelin and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. Endothelial function and dysfunction. Part I: Methodological issues for assessment in the different vascular beds: a statement by the Working Group on Endothelin and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *J Hypertens*. 2005;23(1):7-17.
- Hamburg NM, Benjamin EJ. Assessment of endothelial function using digital pulse amplitude tonometry. *Trends Cardiovasc Med*. 2009;19(1):6-11.
- Davis JS, Yeo TW, Thomas JH, McMillan M, Darcy CJ, McNeil YR, et al. Sepsis-associated microvascular dysfunction measured by peripheral arterial tonometry: an observational study. *Crit Care*. 2009;13(5):R155.
- Brant LC, Barreto SM, Passos VM, Ribeiro AL. Reproducibility of peripheral arterial tonometry for the assessment of endothelial function in adults. *J Hypertens*. 2013;31(10):1984-90.
- Schnabel RB, Schulz A, Wild PS, Sinning CR, Wilde S, Eleftheriadis M, et al. Noninvasive vascular function measurement in the community: cross-sectional relations and comparison of methods. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2011;4(4):371-80.
- Jones AE, Shapiro NI, Trzeciak S, Arnold RC, Claremont HA, Kline JA; Emergency Medicine Shock Research Network (EMShockNet) Investigators. Lactate clearance vs central venous oxygen saturation as goals of early sepsis therapy: a randomized clinical trial. *JAMA*. 2010;303(8):739-46.
- De Backer D, Ospina-Tascon G, Salgado D, Favory R, Creteur J, Vincent JL. Monitoring the microcirculation in the critically ill patient: current methods and future approaches. *Intensive Care Med*. 2010;36(11):1813-25.
- 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(1):98-104.
- De Backer D, Donadello K, Sakr Y, Ospina-Tascon G, Salgado D, Scolletta S, et al. Microcirculatory alterations in patients with severe sepsis: impact of time of assessment and relationship with outcome. *Crit Care Med*. 2013;41(3):791-9.
- Becker L, Prado K, Foppa M, Martinelli N, Aguiar C, Furian T, et al. Endothelial dysfunction assessed by brachial artery ultrasound in severe sepsis and septic shock. *J Crit Care*. 2012;27(3):316.e9-14.
- Davis JS, Yeo TW, Piera KA, Woodberry T, Celermajer DS, Stephens DP, et al. Angiotensin-2 is increased in sepsis and inversely associated with nitric oxide-dependent microvascular reactivity. *Crit Care*. 2010;14(3):R89.
- Vincent JL, Zhang H, Szabo C, Preiser JC. Effects of nitric oxide in septic shock. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161(6):1781-5.
- Fiuza C, Bustin M, Talwar S, Tropea M, Gerstenberger E, Shelhamer JH, et al. Inflammation-promoting activity of HMGB1 on human microvascular endothelial cells. *Blood*. 2003;101(7):2652-60.
- Pascual-Figal DA, Januzzi JL. The biology of ST2: the International ST2 Consensus Panel. *Am J Cardiol*. 2015;115(7 Suppl):3B-7B.
- Flammer AJ, Anderson T, Celermajer DS, Creager MA, Deanfield J, Ganz P, et al. The assessment of endothelial function: from research into clinical practice. *Circulation*. 2012;126(6):753-67.