

Luis Filipe Gomes Malheiro¹, Rita Gaió²,
Manuel Vaz da Silva³, Sandra Martins⁴, Susana
Sampaio⁵, Janete Quelhas-Santos⁵, Ana
Cerqueira⁵, António Sarmento¹, Lurdes Santos¹

A hiperemia reativa correlaciona-se com presença de sepse e degradação de glicocálix na unidade de terapia intensiva: um estudo de coorte prospectiva

Reactive hyperemia correlates with the presence of sepsis and glycocalyx degradation in the intensive care unit: a prospective cohort study

1. Serviço de Doenças Infecciosas, Centro Hospitalar de São João, Faculdade de Medicina, Universidade do Porto - Porto, Portugal.
2. Departamento de Matemática, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto - Porto, Portugal.
3. Departamento de Farmacologia e Terapêutica, Faculdade de Medicina, Universidade do Porto - Porto, Portugal.
4. Departamento de Patologia Clínica, Centro Hospitalar de São João, Faculdade de Medicina, Universidade do Porto - Porto, Portugal.
5. Departamento de Nefrologia, Centro Hospitalar de São João, Faculdade de Medicina, Universidade do Porto - Porto, Portugal.

RESUMO

Objetivo: Investigar se a hiperemia reativa correlaciona-se com marcadores de disfunção endotelial e pode ser utilizada para identificar sepse na doença crítica.

Métodos: Trata-se de estudo prospectivo em uma coorte de pacientes críticos. A disfunção endotelial foi avaliada quando da admissão, por meio da quantificação de hiperemia por tonometria arterial periférica e níveis plasmáticos de endotelina 1, E-selectina solúvel, endocana e sindecano 1. Os pacientes sépticos foram comparados com pacientes sem evidência de infecção.

Resultados: Cinquenta e oito pacientes sépticos foram comparados com 28 controle. O logaritmo natural da tonometria arterial periférica teve correlação negativa com comorbidades cardiovasculares, severidade da doença e níveis plasmáticos de E-selectina solúvel ($p = 0,024$) e sindecano 1 ($p < 0,001$). O logaritmo natural da tonometria arterial

periférica foi mais baixo nos pacientes sépticos quando comparado com os de pacientes controle ($0,53 \pm 0,48$ versus $0,69 \pm 0,42$, respectivamente) e, quando ajustado à idade, o modelo multivariado predisse que cada 0,1 de diminuição em unidades de logaritmo natural da tonometria arterial periférica levou a aumento de 14,6% na probabilidade de infecção.

Conclusão: A hiperemia reativa avaliada por tonometria arterial periférica tem estreita relação com E-selectina solúvel e sindecano 1, o que sugere associação entre ativação endotelial, degradação de glicocálix e reatividade vascular. A hiperemia reativa por tonometria arterial periférica parece estar comprometida em pacientes críticos, especialmente os com sepse.

Descritores: Hiperemia; Sepse; Disfunção endotelial; Syndecana-1; Tonometria arterial periférica; E-selectina; Endotélio vascular/fisiopatologia; Glicocálix

Conflitos de interesse: Nenhum.

Submetido em 19 de outubro de 2019
Aceito em 13 de janeiro de 2020

Autor correspondente:

Luis Filipe Gomes Malheiro
Serviço de Doenças Infecciosas
Centro Hospitalar de São João
Faculdade de Medicina, Universidade do Porto
Alameda Prof. Hernâni Monteiro
Porto, 4200-319, Portugal
E-mail: lmalha@gmail.com

Editor responsável: Pedro Póvoa

DOI: 10.5935/0103-507X.20200064

INTRODUÇÃO

O diagnóstico de sepse é um desafio. Ele requer a verificação de uma infecção, frequentemente oculta, juntamente da identificação de uma disfunção de órgão induzida pela sepse.⁽¹⁾ A taxa de mortalidade se correlaciona com a severidade da sepse e pode ser superior a 40% quando há presença de choque séptico. Isso salienta a importância do pronto reconhecimento da sepse e seu tratamento adequado.⁽²⁾ Apesar dessa necessidade, não existe um padrão-ouro para o diagnóstico da sepse. As recomendações atuais sugerem a utilização do escore *Sequential Organ Failure Assessment* (SOFA), contudo ele não reflete toda a extensão dos mecanismos da sepse, o que tem levado diversos autores a criticarem, além de suas limitações, sua falta de especificidade.⁽²⁻⁷⁾



A sepse é uma intrincada teia de respostas imunológicas, e muitos alvos têm sido investigados, na expectativa de se identificar um biomarcador dinâmico, que possa ajudar a distinguir pacientes sépticos de não sépticos. Lamentavelmente, muitos desses biomarcadores são restritos à pesquisa, dispendiosos, ou não específicos.⁽⁸⁻¹⁴⁾

A disfunção endotelial induzida pela sepse é uma consequência de citocinas circulantes e toxinas bacterianas e virais, e tem manifestações proteicas, que incluem disfunção microvascular, transtornos da coagulação, aumento da permeabilidade vascular e perda do tônus vascular.⁽¹⁵⁻¹⁸⁾ Todas essas alterações provocam defeitos da perfusão e morte celular, desencadeando dano aos órgãos.

⁽⁸⁾ A hiperemia reativa (RH - *reactive hyperemia*) é uma resposta de vasodilatação transitória dependente de óxido nítrico (NO - *nitric oxide*), que ocorre brevemente após um período de oclusão do fluxo e é considerada parte da resposta microvascular normal às modificações no volume e altamente dependente da integridade do glicocálix endotelial.⁽¹⁹⁻²³⁾ A tonometria arterial periférica (PAT) é um método indireto e não invasivo de avaliar a resposta de RH (RH-PAT) com reprodutibilidade adequada, e que tem sido associada com disfunção endotelial crônica e aguda.^(21,24-27)

O dano do glicocálix endotelial induzido pela sepse e a depleção de NO podem contribuir para a disfunção endotelial e microvascular.^(17,18) Demonstrou-se também que a RH avaliada por PAT se encontra comprometida em pacientes sépticos em comparação com controles saudáveis, porém ainda não se sabe quanto desse comprometimento é específico para sepse em comparação a outros pacientes críticos sem doença infecciosa.^(23,28-30)

O objetivo deste estudo é avaliar se a RH-PAT se correlaciona com o diagnóstico de sepse e marcadores imunológicos de ativação endotelial e se pode ser utilizada na prática clínica, para identificar sepse no paciente crítico.

MÉTODOS

Este foi um estudo prospectivo conduzido em uma coorte de pacientes consecutivamente admitidos à unidade de terapia intensiva (UTI) do Serviço de Doenças Infecciosas em um único centro de cuidados terciários. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética local (Centro Hospitalar de São João, ref. 205/11) e conduzido em conformidade com os padrões éticos estabelecidos pela Declaração de Helsinque de 1964 e emendas subsequentes. Obteve-se a assinatura de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido por parte do paciente, quando consciente, ou de seu representante legal.

Durante um período de 12 meses, avaliaram-se, quanto à elegibilidade dentro das primeiras 24 horas após a admissão, os pacientes adultos consecutivamente admitidos à UTI. Os pacientes foram estabilizados segundo a rotina de cuidados na UTI. O protocolo do estudo não teve interferência nas atividades diárias. Os pacientes foram considerados elegíveis se cumprissem os seguintes critérios: ter um distúrbio (infeccioso ou não) cujo grau de severidade justificasse a admissão à UTI para observação ou tratamento. Os critérios de exclusão foram: impossibilidade de realizar a RH-PAT dentro das primeiras 24 horas, ou condições clínicas e anatômicas que interferissem na PAT, como ausência do segundo ou terceiro pares de dedos, hipotensão grave (que acarretaria comprometimento da perfusão distal pela compressão da artéria braquial), estenose da artéria braquial ou vasoespasmio reativo grave em resposta à recente cateterização arterial, fístula arteriovenosa em qualquer dos membros superiores, tremor permanente ou agitação e plaquetas em nível de contagem < 20.000/ μ L, ou transtornos da coagulação.

A classificação de pacientes como sépticos se deu em conformidade com a definição SEPSIS-3.⁽²⁾ O paciente era considerado infectado mediante confirmação de etiologia microbiológica em testes diagnósticos apropriados (cultura, esfregaço de sangue, sorologia, detecção de antígeno ou teste de amplificação de ácido nucleico) ou por resposta clínica à terapia antimicrobiana na ausência de identificação microbiológica, nos casos em que não era provável um diagnóstico alternativo. Os pacientes do grupo controle foram definidos como aqueles sem evidência de infecção quando da admissão, sem necessidade de administrar antimicrobianos ou quando se chegava a um diagnóstico alternativo. Os pacientes foram ainda classificados em choque séptico, choque cardiogênico ou choque hipovolêmico, segundo as diretrizes atuais.^(2,31)

Nas primeiras 24 horas após a admissão à UTI, procedeu-se, em cada participante incluído, à coleta de dados demográficos. Colheram-se amostras sanguíneas para exames rotineiros de análise bioquímica e quantificação de biomarcadores, além de avaliação da RH-PAT. Para cada um dos pacientes, a amostra de plasma foi fracionada e armazenada a -80°C para outras quantificações de biomarcadores. Com a finalidade de simplificar a análise multivariada, a idade foi categorizada com base em um valor de corte de 60 anos, já que, segundo estudos que avaliaram os efeitos da idade na função endotelial, este foi o ponto de corte mais razoável após o qual a disfunção endotelial é afetada pela idade de forma independente e

significante.⁽³²⁾ Para cada participante, quantificaram-se os escores SOFA, *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation* (APACHE) e *Simplified Acute Physiology Score* (SAPS).

Quantificação da hiperemia reativa avaliada por tonometria arterial periférica

A disfunção endotelial foi medida de forma indireta pela quantificação da RH-PAT com o tonômetro Endo-PAT 2000® (Itamar Medical, Cesareia, Israel). A avaliação foi realizada após, no mínimo, 1 hora de estabilidade hemodinâmica (definida como ausência de ajustes na dose de vasopressores ou necessidade de administração de bolo de fluidos).

As avaliações foram conduzidas em ambiente controlado (temperatura ambiente de 21,5°C, umidade de 48,9%) com o mínimo de distrações e em posição deitada. Quando em uso, as doses dos vasopressores foram mantidas estáveis por tempo ≥ 60 minutos, e apenas os cuidados de rotina essenciais foram realizados durante a avaliação. Para cada avaliação, introduziu-se um perfil no programa de computador com controle para idade, peso, estatura estimada, frequência cardíaca e pressão arterial.

Foram inseridos dois captadores em ambos os segundos dedos das mãos (ou em ambos os terceiros dedos em caso de amputação de dedo ou deformidade grave). Registrou-se a amplitude da onda de pulso (PWA - *pulse wave amplitude*) basal em ambos os dedos por 5 minutos, seguida de insuflação do manguito do esfigmomanômetro na segunda porção do braço, para interrupção do fluxo da artéria braquial (o manguito foi insuflado acima de 200mmHg, ou acima de 60mmHg da pressão arterial sistólica basal). A PWA foi então registrada por outros 5 minutos. Evitou-se, sempre que possível, a compressão em membros com presença de cateteres vasculares. O manguito foi desinflado, e foi realizada uma outra avaliação por 5 minutos. Cada avaliação durou entre 15 e 20 minutos. Calculou-se automaticamente um índice de RH (RHI), que mede a adaptação vascular a um aumento do fluxo sanguíneo, com utilização do programa de computador *Endo-PAT 2000* (versão 3.1.2) fornecido pelo fabricante (Figura 1).

Para avaliação da faixa normal do RHI em nossas condições, selecionou-se um grupo de voluntários saudáveis (13 homens, mediana de idade de 51 anos, variando entre 31 e 61 anos) a partir de uma coorte de doadores de rim no Departamento de Nefrologia, e estes voluntários foram avaliados quanto à RH-PAT.

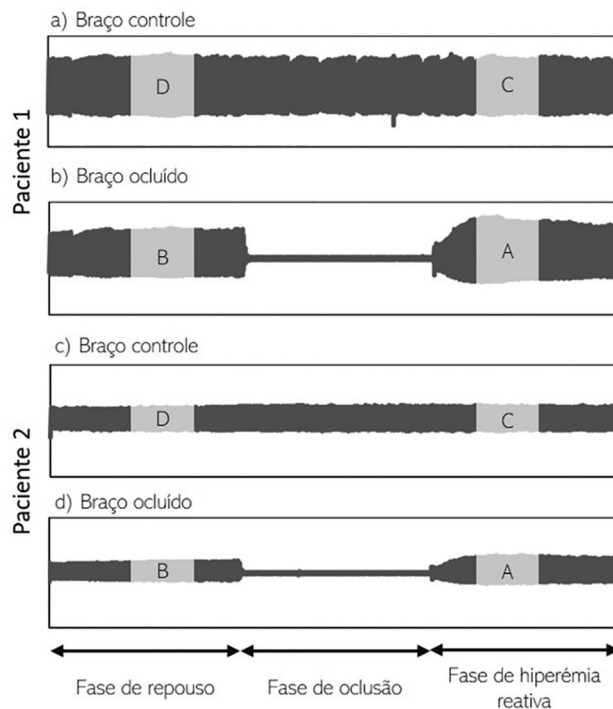


Figura 1 - Avaliação da hiperemia reativa por tonometria arterial periférica em dois pacientes diferentes. (A e B) Um paciente com índice de hiperemia reativa normal. (C e D) Um paciente com comprometimento do índice de hiperemia reativa. Uma pletismografia de dedo capta a amplitude de onda do pulso após cada batimento cardíaco. Após avaliação basal por 5 minutos em condição de repouso, infla-se o manguito em um dos braços por 5 minutos. Após a deflação do manguito, a amplitude de onda do pulso é registrada por mais 5 minutos, e a amplitude média de pulso é calculada para o intervalo de 90 - 150 segundos após a oclusão. O índice de hiperemia reativa é relatado como a proporção da amplitude média de pulso do braço ocluído após a oclusão (A) para a amplitude média de pulso basal do mesmo braço (B), e o resultado é ainda dividido pela mesma proporção no braço controle (C/D), permitindo que o dispositivo leve em conta alterações vasculares sistêmicas durante o exame.

Avaliação laboratorial

Para cada paciente admitido, realizamos uma quantificação dos níveis de sindecano 1, endocana, E-selectina solúvel (sE-selectina) e endotelina 1 (ET-1) em amostras de plasma com utilização do kit Human Premixed Multiplex (Magnetic Luminex® Assay, Cat. No. LXSAM-04, kit lot n. L126978, R&D Systems®, Inc.) e analisado com o aparelho Luminex® 200TM xMAPTM Technology (Luminex Corp.).

As concentrações dos analitos foram determinadas por monitoramento com laser das propriedades espectrais nas amostras e a quantidade de fluorescência, medida como mediana da intensidade de fluorescência (MIF). O cálculo da MIF líquida foi realizado a partir da média de mensurações (em duplicata) para cada padrão e amostra,

com subtração da média de MIFs brancos. Criou-se uma curva *fit five-parameter logistic* (5-PL) para cada analito com utilização do programa de computador Luminex® xPONENT® Software, versão 3.1.

Análise estatística

A estatística descritiva consistiu na média e desvio padrão (DP), para variáveis contínuas, e frequências absoluta e relativa, para as variáveis categóricas.

Na avaliação basal, para a identificação (univariada) de variáveis significativamente associadas com infecção, utilizaram-se o teste qui-quadrado, para as variáveis categóricas, e o teste t, para variáveis contínuas. Os efeitos do RHI sobre infecção, ajustados para outras variáveis relevantes, foram investigados por modelos de regressão logística múltipla. Em conformidade com o tamanho da amostra, apenas variáveis com valor de p na análise univariada $\leq 0,1$ foram considerados como potenciais fatores de confusão. A escolha do melhor modelo se baseou no teste de razão de verossimilhanças (*likelihood ratio test*) para modelos agrupados e caso contrário no *Akaike Information Criterion* (AIC).

Para os modelos de interesse, computou-se a área sob a curva (ASC) Característica de Operação do Receptor (ROC). Os modelos de corte para o RHI foram determinados pela maximização da soma entre sensibilidade e especificidade. As análises estatísticas foram conduzidas com o sistema R language and software environment for statistical computation, versão 2.3.3.⁽³³⁾ O nível de significância foi estabelecido em 0,05.

RESULTADOS

Durante o período de 12 meses, incluíram-se 115 pacientes. Foram excluídos 29 pacientes. As principais razões para exclusão foram a impossibilidade de se submeter à PAT nas primeiras 24 horas após a admissão (n = 9), instabilidade hemodinâmica que levou a óbito (n = 8), trombocitopenia grave (n = 3), agitação (n = 2), fístula arteriovenosa (n = 2), vasoespasm arterial (n = 1) e impossibilidade de realizar mensuração do RHI (n = 4). Nove dos pacientes ou seus representantes legais recusaram a participação. As características dos pacientes e suas comorbidades são apresentadas na tabela 1. Houve predominância de pacientes do sexo masculino (67,4%) e de indivíduos com idade inferior a 60 anos (59,3%).

Dentro do grupo de pacientes sépticos, estes foram classificados, segundo as novas definições de sepse, com SOFA que variaram entre 2 e 19 pontos. Uma subanálise do grupo com sepse revelou que 29 (50,0%) pacientes tinham choque séptico.

O grupo controle não foi significativamente diferente do grupo com sepse, em termos de características e comorbidades, exceto quanto à idade, com prevalência maior de pacientes mais velhos no grupo controle (Tabela 1). Não houve diferenças significantes com relação aos níveis de endocana, sindecano 1 e ET-1 entre os pacientes nos grupos com sepse e controle, porém os níveis de sE-selectina foram significativamente mais altos no primeiro grupo ($p < 0,001$). Os escores relativos à severidade, a necessidade de suporte com aminérgicos e os níveis de lactato foram similares entre os grupos, porém o SOFA foi ligeiramente mais alto no grupo de pacientes com sepse. O diagnóstico clínico para cada um dos grupos é informado na tabela 1.

Análise microvascular - fatores que influenciam no índice de hiperemia reativa

O RHI foi quantificado nos 86 pacientes inscritos. Em razão da distribuição empírica enviesada, utilizou-se o logaritmo natural do RHI (Ln_RHI). A média do Ln_RHI na população do estudo foi de $0,58 \pm 0,46$. A média do Ln_RHI nos voluntários saudáveis foi de $0,71 \pm 0,05$, o que foi significativamente mais alto do que na população do estudo ($p = 0,02$).

Os biomarcadores inflamatórios (endocana, sindecano 1, sE-selectina e ET-1) foram quantificados em amostras colhidas de 68 pacientes (53 sépticos e 15 controles). Os valores de ET-1 em seis (8,8%) pacientes com distribuição equitativa entre pacientes sépticos e controle encontravam-se abaixo dos limites de detecção. Em razão das distribuições empíricas enviesadas, utilizaram-se os logaritmos naturais de endocana, sindecano 1 e sE-selectina.

A análise univariada revelou que idade acima dos 60 anos ($p = 0,023$), coronariopatia ($p = 0,043$), dislipidemia ($p = 0,015$) e neoplasia sólida ($p < 0,001$) tiveram associação significativa com médias mais baixas do Ln_RHI, assim como escores de severidade mais elevados, baixo nível de potássio sérico, hipotensão, presença de choque, doses de noradrenalina mais elevadas e níveis mais elevados de lactato (Tabela 2). O Ln_sindecano 1 foi o único biomarcador com correlação significativa com o Ln_RHI ($p < 0,001$, teste de Pearson $r = 0,346$). Não ocorreu diferença significativa em termos do Ln_RHI entre pacientes com e sem bacteremia, com bactérias *Gram*-positivas em comparação às *Gram*-negativas, ou com bactérias em comparação aos outros agentes. Após realizar ajuste quanto a outras comorbidades e escores de severidade, por meio de modelos de regressão linear, as mesmas variáveis foram identificadas como significantes, com exceção de idade, potássio sérico e pressão arterial

Tabela 1 - Características dos pacientes e análise univariada para sépticos versus controles

	Sépticos (n = 58)	Controles (n = 28)	Valor de p	Total (n = 86)
Demografia e comorbidades				
Sexo masculino	42 (71,4)	16 (57,1)	0,157	58 (67,4)
Idade ≥ 60 anos	18 (31,0)	17 (60,7)	< 0,01	35 (40,7)
Idade	55,9 [1,90]	62,0 [4,20]	0,051	57,4 [1,81]
IMC	27,3 ± 5,5	27,4 ± 4,4	0,916	27,3 ± 5,1
DM2	16 (27,6)	6 (21,4)	0,540	22 (25,6)
Hipertensão arterial	25 (43,1)	18 (64,3)	0,066	43 (50,0)
Dislipidemia	22 (37,9)	13 (46,4)	0,452	35 (40,7)
Uso de estatinas	19 (32,8)	11 (39,3)	0,552	30 (34,9)
Doença arterial periférica	12 (20,7)	9 (32,1)	0,247	21 (24,4)
DPOC	10 (10,7)	3 (17,2)	0,529*	13 (15,1)
Doença autoimune	5 (8,6)	0	0,168*	5 (4,8)
Hábito de tabagismo	20 (34,5)	8 (28,6)	0,584	28 (32,6)
Coronariopatia	15 (25,9)	9 (32,1)	0,543	24 (27,9)
Câncer hematológico	1 (1,7)	1 (3,6)	0,548*	2 (2,3)
HIV	9 (15,5)	3 (10,7)	0,743*	12 (14,0)
Neoplasia sólida	5 (8,6)	3 (10,7)	0,712*	8 (9,3)
Variáveis clínicas e escores de severidade				
APACHE	21,1 [7,6]	19,1 [5,8]	0,194	20,5 [7,1]
SAPS 2	55,2 [21,1]	55,5 [17,8]	0,953	55,4 [20,0]
SOFA	10,1 [4,4]	8,1 [3,3]	0,035	9,5 [4,2]
Choque	29 (50,0)	9 (32,1)	0,118	38 (44,2)
PAM (mmHg)	75,2 [1,70]	81,0 [3,8]	0,064	76,6 [1,60]
Cálcio ionizado (mmol/L)	1,12 [0,05]	1,21 [0,03]	0,693	1,15 [0,04]
pH	7,39 [0,01]	7,42 [0,02]	0,021	7,39 [0,01]
PaCO ₂ (mmHg)	36,9 [1,19]	40,0 [2,89]	0,628	37,6 [1,14]
Bicarbonato (mmol/L)	21,7 [0,56]	25,6 [1,36]	< 0,01	22,3 [0,56]
Potássio (mEq/L)	4,02 [0,08]	3,7 [0,96]	0,013	3,91 [0,60]
Temperatura [‡] (Celsius)	36,8 [0,25]	36,8 [0,15]	0,905	36,8 [0,13]
Frequência respiratória [‡] (mov/minuto mov/minuto)	19,6 [0,77]	17,5 [1,0]	0,153	19,1 [0,64]
PCR (mg/L)	102,2 [12,89]	69,3 [15,4]	0,102	97,3 [13,5]
Lactato (mmol/L)	2,1 [2,2]	1,4 [0,5]	0,022	2,5 [2,5]
Noradrenalina (mcg/kg/minuto)	0,25 [0,50]	0,13 [0,21]	0,105	0,38 [0,59]
Mortalidade (28 ^o dia)	14 (24,1)	7 (25,0)	0,999	21 (24,4)
Biomarcadores e avaliação de PAT				
Ln_endocana (pg/mL)	7,07 ± 0,85	7,27 ± 0,58	0,403	7,11 ± 0,79
Ln_sindicano 1 (pg/mL)	8,61 ± 0,58	8,44 ± 0,53	0,298	8,57 ± 0,57
Ln_E-selectina (pg/mL)	10,79 ± 0,84	10,19 ± 0,56	0,011	10,66 ± 0,82
Endotelina-1 (pg/mL)	5,28 ± 3,59	5,80 ± 3,14	0,880	5,69 ± 3,47
Ln_RHI	0,53 ± 0,48	0,69 ± 0,42	0,122	0,58 ± 0,46
Diagnóstico				
Neurológico	Meningite: 8 (13,7) Outro: 2 (3,4)	Hemorragia intracraniana: 6 (21,4) Estado epiléptico: 4 (14,3) Outro: 2 (7,1)	-	22 (25,6)

Continua...

... continuação

Pleuro-pulmonar e cardiovascular	Pneumonia: 17 (29,3)	Infarto do miocárdio: 5	-	22 (25,6)
Intra-abdominal	Peritonite: 5 (8,6) Pielonefrite: 4 (6,9) Outro: 2 (3,4)	Neoplasia GI: 2 (7,1) Pancreatite 2 (7,1) Colite isquêmica: 1 (3,6)	-	16 (27,6)
Pele e tecidos moles	NF: 1 (1,7)	-	-	1 (1,2)
Sistêmica	Malária: 10 (17,2) Bacteremia: 6 (10,3) Varíola: 2 (3,4) Tuberculose: 1 (1,7)	Choque hemorrágico: 3 (10,7) Politraumatismo: 2 (7,1) Leucemia: 1 (3,6)	-	25 (29,0)
Microbiologia confirmada	43 (74,1)	-	-	-
Hemoculturas positivas	24 (41,4)	-	-	-
Microrganismo causal		-	-	-
Bactéria Gram-positiva	10 (17,2)			
Bactéria Gram-negativa	10 (17,2)			
Bactéria atípica	3 (5,2)			
Micobactéria	2 (3,4)			
Protozoário	10 (17,2)			
Vírus	4 (6,9)			
Fungo	3 (5,2)			

IMC - índice de massa corporal; DM2 - diabetes mellitus 2; DPOC - doença pulmonar obstrutiva crônica; APACHE - Acute Physiology And Chronic Health Evaluation; SAPS 2 - Simplified Acute Physiology Score 2; SOFA - Sequential Organ Failure Assessment; PAM - pressão arterial média; PaCO₂ - pressão parcial de dióxido de carbono; PCR - proteína C reativa; PAT - tonometria arterial periférica; Ln - logaritmo natural; NF - fasciíte necrosante; RHI - índice de hiperemia reativa. *Teste exato de Fischer. Resultados expressos como n (%), média ± desvio padrão ou mediana [variação interquartilis].

média. O Ln_sE-selectina e a doença arterial periférica também influenciaram significativamente no Ln_RHI após ajuste quanto a outras variáveis.

Análise microvascular - associação entre índice de hiperemia reativa e infecção

Na comparação do Ln_RHI entre os grupos de pacientes sépticos e controles, os que tinham infecção tiveram média mais baixa (0,53 ± 0,48 versus 0,69 ± 0,42, respectivamente), embora a diferença não fosse estatisticamente significativa (p = 0,122). Para avaliar outras interações entre as características dos pacientes e a presença de sepse, realizamos uma análise multivariada com ajuste do efeito do Ln_RHI para variáveis significantes e marginalmente significantes, a partir da análise univariada. O melhor modelo de regressão consistiu no Ln_RHI (p = 0,024) e na idade (p = 0,002) como variáveis explanatórias (modelo A - Tabela 3), ambos negativamente associados com sepse. O modelo predisse que, para cada grupo etário, cada 0,1 de diminuição no Ln_RHI aumentou a propensão à sepse em 14,6% ($1/e^{-1,368 \times 0,1} = 1,146$). Para cada valor fixado de RHI, indivíduos com idade ≥ 60 anos tiveram propensão 880,4% mais baixa de sepse do que para pacientes com menos de 60 anos de idade. A interação entre a faixa etária e o Ln_RHI não foi significativa (p = 0,821), o que significou que a associação entre o Ln_RHI e sepse não variou significativamente entre os dois grupos

etários. Nenhuma outra variável (inclusive hipertensão e marcadores de severidade) melhorou o modelo de forma significativa.

Como alternativa, realizamos a mesma análise considerando o Ln_sE-selectina como preditor de sepse em razão de sua forte associação com o grupo de pacientes sépticos encontrada em sua avaliação univariada (modelo B - Tabela 3). O melhor modelo consistiu na idade (p = 0,035) e em sE-selectina (p = 0,02) como variáveis explanatórias e predisse que, em cada grupo etário, o aumento de 0,1 nos valores de Ln_sE-selectina aumentava a propensão à sepse em 13,9%. Indivíduos com idade ≥ 60 anos tiveram propensão 75,6% menor para sepse do que os com idade inferior a 60 anos. A interação entre o grupo etário e o Ln_sE-selectina não foi estatisticamente significativa (p = 0,538).

Computamos as curvas COR e seus valores correspondentes de ASC, sensibilidades, especificidades e valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN) para os modelos de regressão. No modelo A, os melhores valores de corte de Ln_RHI foram 1,43 (RHI 4,2) para pacientes com menos de 60 anos de idade, e 0,41 (RHI 1,5) para pacientes com idade ≥ 60 anos. No modelo B, os melhores valores de corte de Ln_sE-selectina foram, respectivamente, de 9,5 (sE-selectina: 12.708 pg/mL) e 10,5 (sE-selectina: 37.421pg/mL) para pacientes com menos de 60 anos de idade e pacientes com idade ≥ 60 anos.

Tabela 2 - Análise dos fatores com influência sobre logaritmo natural do índice de hiperemia reativa

Variáveis categóricas (teste t para as médias)				
	Análise univariada		Análise multivariada	
	Sim	Não	Valor de p	Valor de p; B (IC95% para RC)
Sexo masculino	0,59 ± 0,51	0,54 ± 0,33	0,617	NS
Idade ≥ 60 anos	0,44 ± 0,47	0,67 ± 0,43	0,023	NS
DM2	0,49 ± 0,42	0,61 ± 0,48	0,347	NS
Hipertensão arterial	0,50 ± 0,46	0,65 ± 0,45	0,127	NS
Dislipidemia	0,44 ± 0,47	0,68 ± 0,43	0,015	0,03; -0,908 (-1,463 - -0,320)
Uso de estatinas	0,43 ± 0,47	0,65 ± 0,43	0,031	0,029; 0,547 (0,058 - 1,035)
Doença arterial periférica	0,58 ± 0,47	0,57 ± 0,44	0,939	< 0,01; 0,490 (0,220 - 0,880)
DPOC	0,47 ± 0,52	0,60 ± 0,45	0,351	NS
Doença autoimune	0,60 ± 0,68	0,57 ± 0,45	0,911	NS
Tabagismo	0,55 ± 0,56	0,59 ± 0,41	0,709	NS
Coronariopatia	0,42 ± 0,46	0,64 ± 0,45	0,047	0,02; -0,304 (-0,590 - -0,040)
Câncer hematológico	1,06 ± 0,39	0,56 ± 0,45	0,135	NS
HIV	0,61 ± 0,43	0,57 ± 0,46	0,775	NS
Neoplasia sólida metastática	0,07 ± 0,51	0,63 ± 0,42	< 0,01	< 0,01; -0,275 (-0,72 - -0,11)
Choque	0,31 ± 0,41	0,79 ± 0,39	< 0,01	< 0,01; -0,261 (-0,53 - -0,07)

Variáveis contínuas (correlação de Pearson)				
	Análise univariada		Análise multivariada	
	r Pearson		Valor de p	Valor de p; B (IC95% para RC)
APACHE	-0,406		< 0,01	< 0,01; -0,362 (-0,039 - -0,010)
SAPS 2	-0,359		< 0,01	< 0,01; -0,320 (-0,013 - -0,003)
SOFA	-0,314		< 0,01	< 0,01; -0,414 (-0,067 - -0,022)
PAM (mmHg)	0,341		0,001	NS
Cálcio ionizado (mmol/L)	0,201		0,540	NS
pH	0,206		0,067	NS
PaCO ² (mmHg)	-0,140		0,895	NS
Potássio (mEq/L)	-0,224		0,023	NS
Temperatura (Celsius)	0,071		0,546	NS
Frequência respiratória (mov/minuto)	-0,102		0,556	NS
PCR (mg/L)	-0,135		0,445	NS
Lactato (mmol/L)	-0,499		< 0,01	0,01; 0,410 (-0,117 - 0,936)
Noradrenalina (mcg/kg/minuto)	-0,348		< 0,01	NS
Ln_endocana (pg/mL)	-0,137		0,265	NS
Ln_sindecano 1 (pg/mL)	-0,346		< 0,01	0,010; -0,276 (-0,483 - -0,069)
Ln_E-selectina (pg/mL)	-0,005		0,965	0,024; -0,245 (-0,273 - -0,02)
Endotelina 1 (pg/mL)	0,027		0,832	NS

IC95% - intervalo de confiança de 96%; B - coeficiente; RC - razão de chances; NS - não significante; DM2 - diabetes mellitus 2; DPOC - doença pulmonar obstrutiva crônica; APACHE - *Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II*; SAPS 2- *Simplified Acute Physiology Score 2*; SOFA - *Sequential Organ Failure Assessment*; PAM - pressão arterial média; PaCO² - pressão parcial de dióxido de carbono; PCR - proteína C reativa; Ln - logaritmo natural.

Tabela 3 - Estimativas a partir dos modelos de regressão logística estudando os efeitos de logaritmo natural do índice de hiperemia reativa/ logaritmo natural de E-selectina solúvel e grupo etário na probabilidade de infecção

	Variável	Coefficiente	Erro padrão	Valor de p	RC	IC95% para RC	ASC COR; valor de p	Se/Es	VPP/VPN	Limite para probabilidades preditas (Se/Es)
Modelo A	Ln_RHI	-1,368	0,605	0,024	0,255	0,078 - 0,833	0,726; p < 0,01	75%/71%	75%/71%	0,55 (86%/54%)
	Idade									
	< 60 anos	Referência	-	-	-	-				
	≥ 60 anos	-1,629	0,538	0,002	0,196	0,068 - 0,563				
Modelo B	Ln_sE-selectina	1,308	0,504	0,009	3,698	1,398 - 9,931	0,780; p < 0,01	94%/20%	81%/50%	0,52 (59%/93%)
	Idade									
	< 60 anos	Referência	-	-	-	-				
	≥ 60 anos	-1,412	0,669	0,035	0,244	0,066 - 0,904				

RC - razão de chance; IC95% - intervalo de confiança de 95%; ASC - área sob a curva; COR - Característica de Operação do Receptor; Se - sensibilidade; Es - especificidade; VPP - valor preditivo positivo; VPN - valor preditivo negativo; Ln - logaritmo natural; RHI - índice de hiperemia reativa.

DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo esclarecer o papel da RH-PAT na sepse, por meio da comparação de um grupo de pacientes sépticos na UTI com um grupo de pacientes críticos sem evidência de infecção. Após ajuste para variáveis que se sabem influenciar no RHI, encontramos uma diferença significativa influenciada pela idade entre pacientes com e sem sepse.⁽³⁴⁻³⁷⁾ O RHI teve associação negativa com sepse, isto é, quanto mais baixo o RHI, maior o risco de que o paciente fosse séptico, e esta associação foi independente da severidade da doença, comorbidades e outros fatores que sabidamente influenciam no RHI. Esse achado sugere que, embora a severidade da doença e comorbidades sejam os principais fatores a influenciar no RHI, a presença de infecção (independentemente da condição de sepse ou choque séptico) parece diminuir o RHI em uma extensão mais ampla do que outras doenças críticas.

A idade exerceu grande influência no valor preditivo do RHI, uma vez que, para um mesmo RHI, a propensão à infecção foi muito menor em pacientes mais idosos. Os valores de corte para o RHI também variaram amplamente entre os dois grupos etários e, apesar de uma boa sensibilidade de limite (86%), a falta de especificidade torna esses valores não confiáveis, do ponto de vista clínico. A fragilidade endotelial pode ser uma justificativa para esta diferença, já que, em razão da idade e de comorbidades, pacientes mais idosos podem já ter um endotélio disfuncional, com RHI basal mais baixo. Assim, em pacientes mais velhos, a presença de infecção pode ser suficiente para diminuir a função endotelial, e um limite de RHI mais baixo pode ser razoável para ajudar a diagnosticar infecção. Em contraste, pacientes mais jovens podem ter um endotélio funcional protetor, para o qual

uma infecção grave com profunda resposta inflamatória sistêmica poderia ser necessária para alcançar um efeito tão intenso quanto o observado em pacientes mais velhos.

Sindecano 1 é uma proteoglicana de sulfato de heparano cujos níveis séricos aumentam nas condições de degradação do glicocálix.^(38,39) Há poucos relatos de níveis séricos mais elevados de sindecano 1 em pacientes sépticos.⁽⁴⁰⁻⁴³⁾ A integridade do glicocálix é essencial para o mecanismo de identificação do estresse de cisalhamento que leva à resposta vasodilatadora dependente de NO observada na RH, e a ausência de sindecano 1 diminui muito o óxido nítrico-sintetase endotelial (eNOS) e a reatividade vascular.^(44,45) Seria previsível que os níveis de sindecano 1 no soro aumentassem em razão da clivagem induzida pela sepse, que a resposta à RH estivesse comprometida, e que o RHI diminuísse. E-selectina é uma proteína ligante glicânica geralmente ausente na parede endotelial, que é suprarregulada e mobilizada pelas células do endotélio vascular para a superfície celular voltada para o lume, em resposta a mediadores inflamatórios (lipopolissacarídeos bacterianos, interleucinas - IL-1 β e fator de necrose tumoral alfa - TNF- α). Sua função principal é iniciar o extravasamento de neutrófilos para os tecidos em doenças inflamatórias agudas e crônicas.^(46,47) A E-selectina solúvel torna-se disponível no plasma quando da apoptose de células endoteliais ativadas, tendo correlação com o grau de ativação endotelial, e níveis plasmáticos mais altos associaram-se com sepse e severidade da sepse.^(29,48,49) Em conjunto, a associação independente de RH-PAT com os níveis de sindecano 1 e sE-selectina em nossos resultados sugerem que a integridade do glicocálix e a ativação endotelial podem ter um papel na reatividade vascular, mais especificamente em relação à RH.

Apesar dos resultados promissores de sindecano 1 e sE-selectina, a endocana, uma proteoglicana secretada pelo

endotélio vascular em pacientes sépticos, não se associou nem com RH-PAT nem com sepsé.⁽⁵⁰⁻⁵³⁾ Como o diagnóstico de pneumonia foi subrepresentado na população de nosso estudo, e a endocana é produzida principalmente pelo rim e pelo pulmão na presença de mediadores inflamatórios, nossos resultados podem ter padecido de falta de poder para serem capazes de identificar essa associação. A ET-1 é um fator derivado do endotélio, que regula o tônus e a remodelação vascular, induz moléculas de adesão na parede endotelial e a adesão de células polimorfonucleares, e leva a estresse oxidativo com dano endotelial.^(54,55) Embora os níveis de ET-1 estejam, em geral, aumentados nas doenças cardiovasculares e na sepsé, não pudemos encontrar essa associação, nem qualquer associação com RH-PAT. As possíveis explicações incluem que, em uma população com muitas comorbidades e doença crítica, os níveis de ET-1 podem não diferir, mesmo na presença de infecção, ou, como os níveis plasmáticos de ET-1 encontram-se cem vezes mais baixos que na parede vascular, as quantificações no plasma podem não ser suficientemente sensíveis.⁽⁵⁶⁾

Nossos dados confirmaram nossa hipótese de que a sepsé é, de fato, associada com um comprometimento da resposta de RH quando medida por PAT em grau superior ao de outras condições não sépticas - algo não antes demonstrado com este método. Os dados também esclareceram a associação entre marcadores de ativação endotelial e degradação do glicocálix e a resposta de RH, o que não foi explorado antes em outros estudos. Entretanto, embora seja evidente uma clara tendência, nosso modelo com utilização do RHI só demonstrou moderada sensibilidade e especificidade, o que pode ser explicado pelo fato de o RHI ser afetado por numerosas variáveis, conforme evidenciado por nossa análise inicial.

Será necessário mais trabalho para compreender completamente o papel da RH-PAT na sepsé, já que nosso estudo tem algumas limitações. Como não existe um padrão-ouro para o diagnóstico de sepsé, a definição utilizada em nosso estudo pode não ter sido capaz de classificar os pacientes corretamente. Um tamanho maior de amostra pode ser necessário para atenuar o efeito das variáveis que influenciam na RH-PAT, porém os custos associados com cada mensuração por PAT tornam difícil seu uso em pesquisa e na prática clínica. Um estudo multicêntrico com a inclusão de outra UTI poderia ser desejável para diminuir potencial viés de seleção, contudo, mesmo sendo essa UTI parte de um serviço de doenças infecciosas, ela é considerada geral e recebe pacientes adultos com qualquer tipo de condição crítica. A mortalidade precoce na UTI é elevada; para a realização de RH-PAT é necessário

haver estabilidade hemodinâmica, mas, infelizmente, um número substancial de pacientes morre antes do recrutamento, o que pode ter distorcido os resultados. O exame também foi realizado após iniciar o uso de antimicrobianos e inotrópicos, o que tem impacto direto no tônus arterial e pode ter modificado a resposta ao exame.

Contudo, embora a RH-PAT não pareça, no presente, ter valor na prática clínica para distinguir pacientes sépticos de outros admitidos à UTI, ocorreu forte associação com todos os outros marcadores de severidade avaliados, o que sugere que a RH-PAT pode ser útil para avaliação do prognóstico. Entretanto, exceto para a avaliação de choques séptico e cardiogênico, nos quais a avaliação com a RH-PAT comprovou-se comprometida, ainda faltam estudos que correlacionem a RH-PAT com outras condições na UTI.⁽⁵⁷⁻⁵⁹⁾ Mais ainda, a sepsé é atualmente definida como uma disfunção orgânica na presença de infecção, e esta última é responsável pela cascata inflamatória que, em alguns pacientes, leva a mau funcionamento de órgãos, o que distingue a resposta inflamatória normal à infecção da sepsé. Se a avaliação com a RH-PAT se comprovar correlacionada com a disfunção de órgãos, este método pode ser tornar útil para distinguir pacientes com infecções simples daqueles com disfunção microvascular e progressão para sepsé.

Como a RH-PAT é um método não invasivo e tem quase nenhuma contraindicação ou complicação, trata-se de um procedimento desejável para avaliar a RH. Contudo, estudos futuros devem se focalizar no valor prognóstico deste exame.

CONCLUSÃO

A avaliação da hiperemia reativa por tonometria arterial periférica parece estar comprometida em pacientes sépticos em comparação àqueles com doença crítica não infecciosa, porém esse exame é altamente influenciado pela idade, e lhe falta especificidade, o que pode tornar seus resultados não confiáveis para distinguir pacientes sépticos de não sépticos. Identificou-se que E-selectina solúvel e sindecano 1 associam-se independentemente com a mensuração da hiperemia reativa por tonometria arterial periférica, o que pode sugerir mecanismos fisiopatológicos em comum. Nossos resultados revelaram forte associação entre o índice de hiperemia reativa e a severidade da doença, de forma que futuros estudos deveriam esclarecer se a avaliação da hiperemia reativa pela tonometria arterial periférica poderia ser utilizada como indicador prognóstico em pacientes admitidos à unidade de terapia intensiva.

Contribuição dos autores:

L. Malheiro, L. Santos e A. Sarmento procederam ao controle clínicos dos pacientes. L. Malheiro delineou o estudo, colheu, analisou e interpretou os dados e resultados dos pacientes. R. Gaio analisou os dados e contribuiu com o suporte estatístico. L. Santos, M. V. Silva e A. Sarmento forneceram apoio científico e foram contribuintes importantes na redação do manuscrito. S. Martins forneceu suporte laboratorial e na redação. J. Quelhas-Santos, S. Sampaio e A. Cerqueira forneceram controles de saúde e deram suporte tecnológico para a avaliação microvascular. Todos os autores contribuíram para a redação e revisão do manuscrito, leram e aprovaram a versão final do mesmo.

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de reconhecer a contribuição de todos os membros da equipe envolvida no tratamento dos pacientes. Agradecemos à Dra. Ana Monteiro, Dr. Joseph Freer e Dra. Hannah Dabrowsky por seu apoio para a redação.

Financiamento

A Professora Rita Gaio recebeu suporte parcial do Centro de Matemática da Universidade do Porto - CMUP (UID/MAT/00144/2013), que recebe financiamento da Fundação para a Ciência e a Tecnologia - FCT (Portugal) com fundos estruturais europeus (*European Regional Development Fund*) sob o acordo de parceria PT2020.

ABSTRACT

Objective: To investigate whether reactive hyperemia measured by peripheral arterial tonometry correlates with markers of endothelial dysfunction and may be used to identify sepsis in critical illness.

Methods: A prospective study was performed using a cohort of critically ill patients. Endothelial dysfunction was assessed on admission by quantifying reactive hyperemia-peripheral arterial tonometry and plasma levels of endothelin-1, soluble E-selectin, endocan and syndecan-1. Septic patients were compared to patients without evidence of infection.

Results: Fifty-eight septic patients were compared to 28 controls. The natural logarithm of reactive hyperemia-peripheral arterial tonometry was negatively correlated with cardiovascular comorbidities, disease severity and plasma levels of soluble E-selectin ($p = 0.024$) and syndecan-1 ($p < 0.001$). The natural

logarithm of reactive hyperemia-peripheral arterial tonometry was lower in septic patients than in controls (0.53 ± 0.48 versus 0.69 ± 0.42 , respectively). When adjusted for age, the multivariable model predicted that each 0.1-unit decrease in natural logarithm of reactive hyperemia-peripheral arterial tonometry increased the odds for infection by 14.6%. m.

Conclusion: Reactive hyperemia-peripheral arterial tonometry is closely related to soluble E-selectin and syndecan-1, suggesting an association between endothelial activation, glycoalyx degradation and vascular reactivity. Reactive hyperemia-peripheral arterial tonometry appears to be compromised in critically ill patients, especially those with sepsis.

Keywords: Hyperemia; Sepsis; Endothelial dysfunction; Syndecan-1; Peripheral arterial tonometry; E-selectin; Endothelium, vascular/physiopathology; Glycoalyx

REFERÊNCIAS

- Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive Care Med.* 2017;43(3):304-77.
- Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA.* 2016;315(8):801-10.
- Marshall JC. Sepsis-3: what is the meaning of a definition? *Crit Care Med.* 2016;44(8):1459-60.
- Simpson SQ. New Sepsis criteria: a change we should not make. *Chest.* 2016;149(5):1117-8.
- Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest.* 1992;101(6):1644-55.
- Seymour CW, Liu VX, Iwashyna TJ, Brunkhorst FM, Rea TD, Scherag A, et al. Assessment of Clinical Criteria for Sepsis: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA.* 2016;315(8):762-74. Erratum in *JAMA.* 2016;315(2):2237 [Incorrect data].
- Shankar-Hari M, Phillips GS, Levy ML, Seymour CW, Liu VX, Deutschman CS, Angus DC, Rubenfeld GD, Singer M; Sepsis Definitions Task Force. Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA.* 2016;315(8):775-87.
- Pool R, Gomez H, Kellum JA. Mechanisms of organ dysfunction in sepsis. *Crit Care Clin.* 2018;34(1):63-80.
- Singer M. Biomarkers in sepsis. *Curr Opin Pulm Med.* 2013;19(3):305-9.
- Cho SY, Choi JH. Biomarkers of sepsis. *Infect Chemother.* 2014;46(1):1-12.
- Faix JD. Biomarkers of sepsis. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2013;50(1):23-36.
- Henriquez-Camacho C, Losa J. Biomarkers for sepsis. *Biomed Res Int.* 2014;2014:547818.

13. Liu Y, Hou JH, Li Q, Chen KJ, Wang SN, Wang JM. Biomarkers for diagnosis of sepsis in patients with systemic inflammatory response syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Springerplus*. 2016;5(1):2091.
14. Paulus P, Jennewein C, Zacharowski K. Biomarkers of endothelial dysfunction: can they help us deciphering systemic inflammation and sepsis? *Biomarkers*. 2011;16 Suppl 1:S11-21.
15. 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.
16. Strisciuglio T, De Luca S, Capuano E, Luciano R, Niglio T, Trimarco B, et al. Endothelial dysfunction: its clinical value and methods of assessment. *Curr Atheroscler Rep*. 2014;16(6):417.
17. Colbert JF, Schmidt EP. Endothelial and microcirculatory function and dysfunction in sepsis. *Clin Chest Med*. 2016;37(2):263-75.
18. Ince C, Mayeux PR, Nguyen T, Gomez H, Kellum JA, Ospina-Tascón GA, Hernandez G, Murray P, De Backer D; ADQI XIV Workgroup. The endothelium in sepsis. *Shock*. 2016;45(3):259-70.
19. Schött U, Solomon C, Fries D, Bentzer P. The endothelial glycocalyx and its disruption, protection and regeneration: a narrative review. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med*. 2016;24:48.
20. Bruno RM, Gori T, Ghiadoni L. Endothelial function testing and cardiovascular disease: focus on peripheral arterial tonometry. *Vasc Health Risk Manag*. 2014;10:577-84.
21. Kavin JT, Patel AR, Slaney KA, Pandian NG, Sheffy J, Schnall RP, et al. Assessment of peripheral vascular endothelial function with finger arterial pulse wave amplitude. *Am Heart J*. 2003;146(1):168-74.
22. Raff U, Ott C, John S, Schmidt BM, Fleischmann EH, Schmieder RE. Nitric oxide and reactive hyperemia: role of location and duration of ischemia. *Am J Hypertens*. 2010;23(8):865-9.
23. Weinbaum S, Tarbell JM, Damiano ER. The structure and function of the endothelial glycocalyx layer. *Annu Rev Biomed Eng*. 2007;9:121-67.
24. Nohria A, Gerhard-Herman M, Creager MA, Hurlay S, Mitra D, Ganz P. Role of nitric oxide in the regulation of digital pulse volume amplitude in humans. *J Appl Physiol* (1985). 2006;101(2):545-8.
25. Bonetti PO, Pumper GM, Higano ST, Holmes DR Jr, Kavin JT, Lerman A. Noninvasive identification of patients with early coronary atherosclerosis by assessment of digital reactive hyperemia. *J Am Coll Cardiol*. 2004;44(11):2137-41.
26. Matsuzawa Y, Kwon TG, Lennon RJ, Lerman LO, Lerman A. Prognostic value of flow-mediated vasodilation in brachial artery and fingertip artery for cardiovascular events: a systematic review and meta-analysis. *J Am Heart Assoc*. 2015;4(11). pii: e002270.
27. 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.
28. Davis JS, Yeo TW, Piera KA, Woodberry T, Celemajer 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.
29. 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.
30. Nobre V, Ataíde TB, Brant LC, Oliveira CR, Rodrigues LV, Ribeiro AL, et al. Use of reactive hyperemia - peripheral arterial tonometry and circulating biological markers to predict outcomes in sepsis. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2016;28(4):387-96.
31. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JG, Coats AJ, Falk V, González-Juanatey JR, Harjola VP, Jankowska EA, Jessup M, Linde C, Nihoyannopoulos P, Parissis JT, Pieske B, Riley JP, Rosano GM, Ruilope LM, Ruschitzka F, Rutten FH, van der Meer P; ESC Scientific Document Group. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J*. 2016;37(27):2129-200. Erratum in *Eur Heart J*. 2018;39(10):860.
32. Matz RL, Andriantsitohaina R. Age-related endothelial dysfunction: potential implications for pharmacotherapy. *Drugs Aging*. 2003;20(7):527-50.
33. R Development Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2012.
34. Bullitt E, Zeng D, Mortamet B, Ghosh A, Aylward SR, Lin W, et al. The effects of healthy aging on intracerebral blood vessels visualized by magnetic resonance angiography. *Neurobiol Aging*. 2010;31(2):290-300.
35. Chen JJ, Rosas HD, Salat DH. Age-associated reductions in cerebral blood flow are independent from regional atrophy. *Neuroimage*. 2011;55(2):468-78.
36. Rodríguez-Mañas L, El-Assar M, Vallejo S, López-Dóriga P, Solís J, Petidier R, et al. Endothelial dysfunction in aged humans is related with oxidative stress and vascular inflammation. *Aging Cell*. 2009;8(3):226-38.
37. Seals DR, Jablonski KL, Donato AJ. Aging and vascular endothelial function in humans. *Clin Sci (Lond)*. 2011;120(9):357-75.
38. Stepp MA, Pal-Ghosh S, Tadvalkar G, Pajoohesh-Ganji A. Syndecan-1 and its expanding list of contacts. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2015;4(4):235-49.
39. Aquino RS, Teng YH, Park PW. Glycobiology of syndecan-1 in bacterial infections. *Biochem Soc Trans*. 2018;46(2):371-7.
40. Ikeda M, Matsumoto H, Ogura H, Hirose T, Shimizu K, Yamamoto K, et al. Circulating syndecan-1 predicts the development of disseminated intravascular coagulation in patients with sepsis. *J Crit Care*. 2018;43:48-53.
41. Smart L, Bosio E, Macdonald SP, Dull R, Fatovich DM, Neil C, et al. Glycocalyx biomarker syndecan-1 is a stronger predictor of respiratory failure in patients with sepsis due to pneumonia, compared to endocan. *J Crit Care*. 2018;47:93-8.
42. Steppan J, Hofer S, Funke B, Brenner T, Henrich M, Martin E, et al. Sepsis and major abdominal surgery lead to flaking of the endothelial glycocalyx. *J Surg Res*. 2011;165(1):136-41.
43. Wu X, Hu Z, Yuan H, Chen L, Li Y, Zhao C. Fluid resuscitation and markers of glycocalyx degradation in severe sepsis. *Open Med (Wars)*. 2017;12:409-16.
44. Kurmagai R, Lu X, Kassab GS. Role of glycocalyx in flow-induced production of nitric oxide and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med*. 2009;47(5):600-7.
45. Voyvodic PL, Min D, Liu R, Williams E, Chitalia V, Dunn AK, et al. Loss of syndecan-1 induces a pro-inflammatory phenotype in endothelial cells with a dysregulated response to atheroprotective flow. *J Biol Chem*. 2014;289(14):9547-59.
46. Schnaar RL. Glycobiology simplified: diverse roles of glycan recognition in inflammation. *J Leukoc Biol*. 2016;99(6):825-38.
47. Silva M, Videira PA, Sackstein R. E-selectin ligands in the human mononuclear phagocyte system: implications for infection, inflammation, and immunotherapy. *Front Immunol*. 2018;8:1878.
48. Cummings CJ, Sessler CN, Beall LD, Fisher BJ, Best AM, Fowler AA 3rd. Soluble E-selectin levels in sepsis and critical illness. Correlation with infection and hemodynamic dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;156(2 Pt 1):431-7.
49. Page AV, Liles WC. Biomarkers of endothelial activation/dysfunction in infectious diseases. *Virulence*. 2013;4(6):507-16.
50. Scherpereel A, Depontieu F, Grigoriu B, Cavestri B, Tscipoulos A, Gentina T, et al. Endocan, a new endothelial marker in human sepsis. *Crit Care Med*. 2006;34(2):532-7.
51. Seo K, Kitazawa T, Yoshino Y, Koga I, Ota Y. Characteristics of serum endocan levels in infection. *PLoS One*. 2015;10(4):e0123358.
52. De Freitas Caires N, Gaudet A, Portier L, Tscipoulos A, Mathieu D, Lassalle P. Endocan, sepsis, pneumonia, and acute respiratory distress syndrome. *Crit Care*. 2018;22(1):280.
53. Ioakeimidou A, Pagalou E, Kontogiorgi M, Antoniadou E, Kaziani K, Psaroulis K, Giamarellos-Bourboulis EJ, Prekates A, Antonakos N, Lassalle P, Gogos C; Hellenic Sepsis Study Group. Increase of circulating endocan over sepsis follow-up is associated with progression into organ dysfunction. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017;36(10):1749-56.
54. Kowalczyk A, Kleniewska P, Kolodziejczyk M, Skibska B, Goraca A. The role of endothelin-1 and endothelin receptor antagonists in inflammatory response and sepsis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2015;63(1):41-52.
55. Tamirisa P, Frishman WH, Kumar A. Endothelin and endothelin antagonism: roles in cardiovascular health and disease. *Am Heart J*. 1995;130(3 Pt 1):601-10.
56. Kedzierski RM, Yanagisawa M. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2001;41:851-76.
57. Kandhai-Ragunath JJ, Doggen CJ, Jorstad HT, Doelman C, de Wagenaar B, IJzerman MJ, et al. Endothelial dysfunction after ST-segment elevation myocardial infarction and long-term outcome: a study with reactive hyperemia peripheral artery tonometry. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2016;69(7):664-71.
58. Bravo Baptista S, Faustino M, Brizida L, Loureiro J, Augusto J, Abecasis J, et al. Early peripheral endothelial dysfunction predicts myocardial infarct extension and microvascular obstruction in patients with ST-elevation myocardial infarction. *Rev Port Cardiol*. 2017;36(10):731-42.
59. Baptista SB, Faustino M, Simões J, Nédio M, Monteiro C, Lourenco E, et al. Endothelial dysfunction evaluated by peripheral arterial tonometry is related with peak TnI values in patients with ST elevation myocardial infarction treated with primary angioplasty. *Microvasc Res*. 2016;105:34-9.