



MINISTÉRIO DA SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA
COORDENAÇÃO DE ENSINO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS CARDIOVASCULARES

LETICIA ROBERTO SABIONI

AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MICROVASCULAR SISTÊMICA DE PACIENTES
PORTADORES DE DOENÇAS CARDIOVASCULARES NA FASE AGUDA DE
COVID-19 E NO SEGUIMENTO DE LONGO PRAZO APÓS RECUPERAÇÃO

RIO DE JANEIRO
2022

LETICIA ROBERTO SABIONI

AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MICROVASCULAR SISTÊMICA DE PACIENTES
PORTADORES DE DOENÇAS CARDIOVASCULARES NA FASE AGUDA DE
COVID-19 E NO SEGUIMENTO DE LONGO PRAZO APÓS RECUPERAÇÃO

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Cardiovasculares, do Instituto Nacional de
Cardiologia, como pré-requisito à obtenção
do título de Mestre em Ciências
Cardiovasculares.

Orientadores: Prof^a. Dra. Andrea Rocha De Lorenzo
Prof. Dr. Eduardo Vera Tibiriçá

Rio de Janeiro
2022

S116a Sabioni, Letícia Roberto.

Avaliação da função microvascular sistêmica de pacientes portadores de doenças cardiovasculares na fase aguda de COVID-19 e no seguimento de longo prazo após recuperação / Letícia Roberto Sabioni – Rio de Janeiro, 2022.

88 f.

Dissertação (Mestrado Profissional em Ciências Cardiovasculares) Instituto Nacional de Cardiologia – INC

1. COVID-19. 2. Microcirculação. 3. Endotélio vascular. I. Título.

LETICIA ROBERTO SABIONI

AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MICROVASCULAR SISTÊMICA DE PACIENTES PORTADORES DE DOENÇAS CARDIOVASCULARES NA FASE AGUDA DE COVID-19 E NO SEGUIMENTO DE LONGO PRAZO APÓS RECUPERAÇÃO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Cardiovasculares, do Instituto Nacional de Cardiologia, como pré-requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências Cardiovasculares.

Aprovada em 31 de outubro de 2022.

Banca Examinadora:

Prof^a. Dra. Andrea Rocha De Lorenzo
Orientadora
Instituto Nacional de Cardiologia

Prof. Dr. Eduardo Vera Tibiriçá
Orientador
Instituto Nacional de Cardiologia

Dr. Daniel Arthur Barata Kasal
Membro interno
Instituto Nacional de Cardiologia

Prof^a. Dra. Cristiane da Cruz Lamas
Membro interno
Instituto Nacional de Cardiologia

Dr. Flávio Nacul
Membro externo
Hospital Pró-Cardíaco

Prof^a. Dra. Aurora Felice Castro Issa
Membro interno (suplente)
Instituto Nacional de Cardiologia

Prof. Dr. Ronaldo de Souza Leão Lima
Membro externo (suplente)
Universidade Federal do Rio de Janeiro

*A Deus e aos meus pais, por serem responsáveis por quem sou e
chegar aonde cheguei.
Aos meus irmãos e ao meu marido, pela parceria eterna e
por todo apoio incondicional.*

AGRADECIMENTOS

Aos melhores orientadores que eu poderia ter, persistentes, dedicados e competentes, Andrea De Lorenzo e Eduardo Tibiriçá.

Ao Marcio Marinho Gonzalez pela excelente assistência técnica durante todo o processo.

Aos meus amigos e inspirações profissionais, Viviane Belidio, Daniel Setta, Marcelo Melo e Gabriel Camargo.

Ao meu sogro, Paulo José Modenesi, por toda a ajuda.

Ao Instituto Nacional de Cardiologia por mais uma vez contribuir para a minha formação profissional.

Vivemos também outra pandemia, a da perda de credibilidade científica, em que ficaram evidentes e perigosas as divergências entre o senso comum e o conhecimento científico, exigindo dos pesquisadores e da ciência, muito mais que resiliência, mas uma postura persistente e antifrágil.

RESUMO

Introdução: O conhecimento da fisiopatologia da COVID-19 é extremamente importante, tanto na fase aguda da infecção como a longo prazo. A disfunção endotelial pode ocorrer em infecções graves e tem papel prognóstico, cabendo ser investigada na COVID-19. A avaliação da microcirculação cutânea através do *laser* Doppler, um método não invasivo e acessível, torna-se especialmente útil para essa finalidade.

Objetivo: Avaliar a função endotelial microvascular de pacientes em fase aguda da COVID-19 e a longo prazo após a recuperação do quadro infeccioso. **Métodos:**

Avaliados prospectivamente, num hospital cardiológico quaternário, pacientes infectados pelo vírus SARS-CoV-2, submetidos à análise da função microvascular sistêmica dependente de endotélio, através da fluxometria *laser* Doppler (do inglês *Laser Doppler Perfusion Monitoring*, LDPM). Foram registrados o fluxo basal e após hiperemia térmica local (LTH). Uma segunda avaliação com LDPM foi realizada após 12-15 meses da data da primeira avaliação. Um grupo-controle de voluntários saudáveis foi usado como referência para a comparação da reatividade microvascular. Na fase aguda da infecção, foram analisados exames laboratoriais. No seguimento de longo prazo, foi repetida a medida de PCR sérica. Dados clínicos foram obtidos no prontuário médico. Os grupos foram estratificados em: COVID-19 grave (S-COVID) os casos que desenvolveram síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) com necessidade de terapia intensiva; e COVID-19 leve a moderada (M-COVID) definido com base em sintomas clínicos menos graves (febre baixa, tosse, desconforto respiratório), sem evidência de SDRA e sem necessidade de internação na UTI. **Resultados:** Em 47 pacientes internados na fase aguda da COVID-19, a avaliação do fluxo microvascular e reatividade mostrou que a resposta vasodilatadora microvascular de pico induzida por LTH foi marcadamente diminuída em ambos os grupos de pacientes (M-COVID, $p=0,001$; S-COVID, $p<0,0001$) em comparação com o grupo de voluntários saudáveis. Os aumentos percentuais no fluxo microvascular, desde a linha de base até o pico de fluxo durante a LTH, foram significativamente reduzidos em ambos os grupos de pacientes (M-COVID, $p<0,0001$; S-COVID, $p<0,0001$) em comparação com o grupo de voluntários saudáveis. A vasodilatação microvascular dependente do endotélio induzida por LTH aumentou significativamente após a recuperação, quando comparada com os valores obtidos durante a fase aguda da COVID-19. As áreas sob as curvas de vasodilatação aumentaram significativamente após a recuperação: 103.901 ± 39.114 vs. 62.240 ± 31.823 APU ($p=0,0006$). O fluxo microvascular médio durante LTH também aumentou significativamente após a recuperação: $116,5$ ($96,5-144,5$) vs. 84

(61,2-140,5) APU ($p=0,01$). **Conclusões:** Pacientes com COVID-19 apresentaram disfunção endotelial microvascular sistêmica na fase aguda da doença, com melhora das respostas vasodilatadoras dependentes do endotélio no seguimento de 12 a 15 meses após a infecção. Na fase aguda, a resposta vasodilatadora microvascular de pico induzida por LTH foi marcadamente diminuída nos pacientes COVID-19 em comparação com o grupo de voluntários saudáveis. Na fase tardia, a avaliação da reatividade microvascular dependente do endotélio mostrou que a vasodilatação induzida pela LTH aumentou significativamente após a recuperação em comparação com os valores obtidos durante a fase aguda da COVID-19. Indivíduos com sintomas tardios (12 a 15 meses após a infecção) não apresentaram diferença da resposta microvascular dependente do endotélio quando comparados aos assintomáticos.

Palavras-chave: COVID-19; Fluxometria por *laser*-Doppler; Microcirculação; Endotélio vascular.

ABSTRACT

Introduction: Understanding the pathophysiology of the COVID-19 infection is important both for the acute phase and for long term complications. Endothelial dysfunction can occur in severe infections and has a prognostic role, that should be investigated in COVID-19. The assessment of cutaneous microcirculation can be used as a method of evaluating endothelial dysfunction through a non-invasive and accessible method for this purpose. **Objective:** To assess the presence of endothelium-dependent alteration of systemic microvascular function in cardiac patients in the acute phase of Covid-19 infection and in the long term after recovery from infection. **Methods:** Patients infected with the SARS-CoV-2 virus, who underwent percutaneous analysis of endothelium-dependent systemic microvascular function using laser Doppler flowmetry, were prospectively evaluated in a single center. Basal and post-local thermal hyperemia (LTH) flows were recorded. A second LDPM assessment was performed after 12-15 months from the date of the first assessment. A control group with healthy volunteers was recruited for comparison of the results. During the acute phase of the infection, clinical and laboratory data were collected together with microvascular analysis. For long term follow-up, PCR was measured again. The groups were divided into: severe COVID-19 (S-COVID) cases that developed ARDS requiring intensive care, and mild to moderate cases (M-COVID) generally defined on the basis of less severe clinical symptoms (low-grade fever, cough, discomfort), no evidence of ARDS and no need for ICU admission. **Results:** In 47 patients hospitalized in the acute phase of COVID-19, assessment of microvascular flow and reactivity showed that the LTH-induced peak microvascular vasodilator response was markedly diminished in both patient groups (M-COVID, $p=0.001$; S-COVID, $p<0.0001$) compared to the group of healthy volunteers. Percentage increases in microvascular flow from baseline to peak flow during LTH were also significantly reduced in both patient groups (M-COVID, $p<0.0001$; S-COVID, $p<0.0001$) compared to the group of healthy volunteers. LTH-induced endothelium-dependent microvascular vasodilation increased significantly after recovery when compared to values obtained during the acute phase of COVID-19. Areas under vasodilation curves increased significantly after recovery: $103,901 \pm 39,114$ vs. $62,240 \pm 31,823$ APU/mmHg/s ($p=0.0006$). Mean microvascular flow during LTH also increased significantly after recovery: 116.5 (96.5-144.5) vs. 84 (61.2-140.5) APU ($p=0.01$). **Conclusions:** The endothelium-dependent systemic microvascular dysfunction found in the acute phase of COVID-19 was shown to be

reversible within 12 to 15 months after recovery from the disease. During the acute phase, the LTH-induced microvascular vasodilation peak response was noticeably reduced on infected patients in comparison to healthy subjects. The same response increased significantly when measured after recovery, in comparison to values obtained during the acute phase of COVID-19. Individuals with late symptoms after 12 to 15 months did not show noticeable difference in microvascular vasodilation response to those patients without symptoms.

Keywords: COVID-19; Laser-Doppler flowmetry; Microcirculation; Endothelium, vascular.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Efeito da infecção por SARS-CoV-2 na função das células endoteliais, coagulação sistêmica e trombose	28
Figura 2 –	Recrutamento dos pacientes do estudo	33
Figura 3 –	Aparelho de LDPM à beira do leito	35
Figura 4 –	Curvas de análise pelo LDPM	36
Figura 5 –	Efeitos da LTH no fluxo microvascular cutâneo e reatividade em pacientes com COVID-19	43
Figura 6 –	Níveis sanguíneos de proteína C-reativa na fase aguda e no seguimento	44
Figura 7 –	Frequência de sintomas tardios nos pacientes recuperados	46
Figura 8 –	Análise comparativa entre pacientes com e sem sintomas no seguimento após recuperação	47
Figura 9 –	Efeitos da LTH no fluxo microvascular cutâneo na fase aguda e após recuperação dos pacientes e nos voluntários saudáveis ...	48
Figura 10 –	Efeitos da LTH no fluxo microvascular cutâneo na fase aguda e após recuperação dos pacientes	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Características clínicas, demográficas e laboratoriais dos pacientes na fase aguda da COVID-19	39
Tabela 2 –	Características clínicas dos pacientes após recuperação	45

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACE 2	Angiotensina 2
APU	Unidades arbitrárias de perfusão
AT1R	Receptores angiotensina tipo 1
BHD	Barreira hematoencefálica densa
CEC	Circulação extracorpórea
CE	Células endoteliais
cNOS	Óxido nítrico sintetase constitutiva
COVID 19	Coronavirus <i>disease</i> 2019
COVS	Coronavírus
CVC	Condutância vascular sistêmica
DAD	Dano alveolar difuso
DC	Débito cardíaco
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
ECA 2	Enzima conversora de angiotensina 2
EDHFS	Fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio
EDRFS	Fatores relaxantes derivados do endotélio
eNOS	Óxido nítrico sintetase endotelial
HCoV	Coronavírus humanos
FMD	Vasodilatação fluxo mediada
ICTV/ CITV	Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus
INC	Instituto Nacional de Cardiologia
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzida
LDF	<i>Laser Doppler flowmetry</i>
LDPM	<i>Laser Doppler Perfusion Monitoring</i>
LTH	Hiperemia térmica local
MERS-COV	Síndrome respiratória do Oriente Médio por coronavírus
NOS	Óxido nítrico sintetase
nNOS	Óxido nítrico sintetase neuronal
ON	Óxido nítrico
ORFs	<i>Open Reading Frames</i>

PAF	Fator de ativação plaquetária
PAM	Pressão arterial média
PCR	Proteína C-reativa
PGI2	Prostaciclina
PVC	Pressão venosa central
RAA	Renina-angiotensina-aldosterona
RNA	Ácido ribonucleico
RT PCR	Reação em cadeia da polimerase transcriptase reversa
SARS	Síndrome respiratória aguda grave
SARSCOV	Síndrome respiratória aguda grave por coronavírus
SDRA	Síndrome do desconforto respiratório agudo
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
SVO2	Saturação venosa mista de oxigênio
SCVO2	Saturação venosa central de oxigênio
TMPRSS2	Protease transmembranar serina 2
UP	Unidade de perfusão
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VWF	Fator Von Willebrand

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	FUNDAMENTOS TEÓRICOS	18
2.1	COVID-19	18
2.2	Sintomas tardios da COVID-19	19
2.3	O endotélio vascular: funções e avaliações	23
2.3.1	Endotélio vascular	23
2.3.2	Avaliação da função endotelial	25
2.3.3	Função endotelial e COVID-19	26
3	JUSTIFICATIVA	30
4	OBJETIVOS	31
4.1	Objetivo primário	31
4.2	Objetivos secundários	31
5	MÉTODOS	32
5.1	Caracterização do estudo	32
5.2	População estudada	32
5.3	Procedimentos de investigação	34
5.3.1	LDPM	34
5.3.2	Avaliação laboratorial	37
5.4	Análise estatística	37
6	RESULTADOS	39
6.1	Fase Aguda: características clínicas e demográficas dos pacientes	39
6.1.1	Avaliação da função microvascular	42
6.2	Fase Tardia: características clínicas e demográficas dos pacientes	44
6.2.1	Sintomas na fase tardia	46
6.2.2	Avaliação da função microvascular	47
7	DISCUSSÃO	50
8	CONCLUSÕES	54
	REFERÊNCIAS	55
	APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	63
	APÊNDICE B – TERMO DE COMPROMISSO DE UTILIZAÇÃO DE DADOS	65
	APÊNDICE C – ARTIGOS	66
	ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	81
	ANEXO B – TERMO DE ANUÊNCIA DE CHEFIAS	88

1 INTRODUÇÃO

Coronavírus (CoV) são vírus RNA de fita única, pertencentes à família *Coronaviridae*. A sua descoberta ocorreu em 1937 e passaram a ser nomeados a partir de 1965. O nome foi inspirado em seu formato semelhante a uma coroa quando observado ao microscópio. Até 2019, sabia-se de seis coronavírus capazes de infectar pessoas, dentre os quais o SARS-CoV e o MERS-CoV.^{1,2}

O termo “novo coronavírus” passou a ser utilizado pela imprensa em dezembro de 2019, quando surgiram os primeiros casos na China. Especialistas passaram a se referir ao vírus como 2019-nCov, mas de forma temporária, até ele ser nomeado oficialmente como SARS-CoV-2.

É um vírus transmitido por via respiratória, principalmente gotículas, e por contato. A síndrome respiratória aguda que o vírus provoca, varia de casos leves a graves com insuficiência respiratória, e sua letalidade varia, principalmente, conforme a faixa etária e condições clínicas associadas.¹ Como processo inicial, o vírus SARS-CoV-2, ancorado na enzima conversora da angiotensina 2 (ECA2), penetra nas células do hospedeiro, incluindo as células endoteliais e os macrófagos, além dos pneumócitos do tipo II.³

A avaliação do tecido pulmonar e de outros órgãos, durante a fase aguda da COVID-19, demonstrou a existência de um processo inflamatório microvascular associado à formação de trombos microvasculares.^{4,5} Além disso, há liberação maciça de diversas citocinas que aumentam o processo de inflamação vascular.⁶ Adicionalmente, as próprias células endoteliais liberam citocinas pró-inflamatórias, contribuindo para a extensão da disfunção endotelial microvascular.⁷ Ainda, a presença de microtrombos em pequenos vasos e de microangiopatia, na fase aguda da COVID-19,^{5,8} predispõe o paciente à formação de microinfartos em diversos órgãos – tais como o coração, os rins e o fígado – potencializando o estado de lesão e falência de múltiplos órgãos.⁴

Tais evidências de alterações provocadas pelo vírus na microcirculação chamam a atenção para a analogia com a disfunção endotelial observada em diversas condições patológicas.^{9,10} A disfunção endotelial é um processo sistêmico, sendo que a avaliação da microcirculação cutânea pode ser utilizada como método de avaliação da disfunção endotelial generalizada.¹¹ Diversos estudos demonstraram que a microcirculação cutânea constitui um leito vascular acessível e representativo para a avaliação de mecanismos subjacentes às alterações microvasculares em doenças cardiovasculares, metabólicas e na sepse, por exemplo.^{11,12} Assim, alterações microvasculares sistêmicas na fase aguda da COVID-19 podem estar relacionadas com a progressão e com o prognóstico da doença.

2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1 COVID-19

No início de 2020, o mundo foi acometido pela pandemia de COVID-19 que se refletiu em efeitos devastadores sobre as populações, estruturas sociais e crescimento econômico. O número de mortos devido à COVID-19 atingiu 629 370 889 casos confirmados até 7 de novembro de 2022, incluindo 6 578 245 mortes.¹³

A rápida disseminação da COVID-19 foi consequência da crescente extensão da conectividade global e mobilidade geográfica, que aceleraram a propagação da infecção em um ritmo incontrolável. Porém, essa conectividade global e cooperação científica também propiciaram a identificação do agente causador desse surto, o coronavírus SARS-CoV-2, e a possibilidade de ação, controle e a contenção eficazes desse patógeno através de ensaios diagnósticos confiáveis, agentes terapêuticos promissores e início da vacinação.¹⁴

As características clínicas da COVID-19 variam de doença leve a moderada (sem pneumonia e com pneumonia), a doença grave (dispneia, frequência respiratória superior a 30/min, saturação de oxigênio inferior a 93%, relação PaO₂ / FiO₂ inferiores a 300 e/ ou acometimento do parênquima pulmonar maior que 50% em 24-48 horas) e crítico (insuficiência respiratória, choque séptico e/ou disfunção/insuficiência de múltiplos órgãos).¹⁵

Os sintomas mais comuns da COVID-19 são inespecíficos e incluem principalmente febre, tosse e mialgia. Outros sintomas menores são: odinofagia, cefaleia, calafrios, náuseas ou emeses, diarreia ageusia e conjutivite.¹⁵

Ademais, o paciente pode se manifestar com disseminação assintomática de vírus e o comprometimento do olfato (hiposmia, anosmia e parosmia) ou do paladar (disgeusia). Outras manifestações extrapulmonares incluem diarreia, linfopenia, trombocitopenia, disfunção hepática e renal, rabdomiólise, meningoencefalite, acidente vascular encefálico, convulsão, síndrome de Guillain-Barré, arritmia cardíaca ou bloqueio cardíaco, pancreatite, doença de Kawasaki como vasculite multissistêmica, erupção cutânea, tromboembolismo e tireoidite aguda.^{16,17} Trombos e microtrombos dos pulmões, membros inferiores e superiores, cérebro, coração, fígado e rins foram observados em pacientes com COVID-19.¹⁸

As diminuições significativas no número total de linfócitos são observações laboratoriais comuns, sugerindo que os linfócitos (principalmente os linfócitos T)

sejam provavelmente alvos do SARS-CoV-2.¹⁹ Com a infecção por COVID, inicia-se uma tempestade de citocinas e, conseqüentemente, uma série de respostas imunes inatas e adaptativas. Esse processo resulta em algumas alterações nas células imunes, principalmente nos linfócitos, levando à disfunção do sistema imunológico.¹⁹

Essas respostas inflamatórias descontroladas possibilitam danos teciduais locais e sistêmicos. Em pacientes com COVID-19 grave, eosinopenia e linfopenia com redução importante do número de células T CD4+ e CD8+, células B e células natural killer (NK) são uma característica comum. A gravidade da COVID-19 depende também do desenvolvimento de tempestade de citocinas caracterizada por níveis séricos elevados de citocinas pró-inflamatórias.¹⁹

2.2 Sintomas tardios da COVID-19

Atualmente observa-se o declínio dos casos graves de COVID-19, devido ao desenvolvimento de vacinas e da vacinação da população, e do conhecimento maior sobre a evolução da doença. Ademais, ensaios clínicos para agentes antivirais seguros e eficazes estão em andamento e, assim, as sequelas de longo prazo da infecção por SARS-CoV-2 tornaram-se cada vez mais reconhecidas e preocupantes.²⁰

As “sequelas pós-agudas da infecção por SARS-CoV-2” estão sendo definidas como sintomas persistentes por mais de três a quatro semanas após o início dos sintomas de COVID-19, caracterizado por uma combinação de sintomas inespecíficos, mais comumente: fadiga, dispneia, cefaleia, tosse, perda contínua do olfato, dor torácica, dor musculoesquelética, alterações cognitivas, distúrbios do sono, ansiedade e intolerância ao exercício.²¹⁻²³

Essas sequelas podem ser causadas por dano tecidual de longo prazo (por exemplo: pulmão, cérebro e coração) e inflamação patológica (por exemplo: persistência viral, desregulação imunológica e autoimunidade). Os fatores de risco associados podem incluir sexo feminino, mais de cinco sintomas iniciais, dispneia precoce, transtornos psiquiátricos prévios e biomarcadores específicos (por exemplo: D-dímero, PCR e contagem de linfócitos), embora sejam necessárias mais pesquisas para fundamentar esses fatores de risco.²⁴ Estima-se que 80% dos pacientes infectados com SARS-CoV-2 tenham desenvolvido um ou mais sintomas de longo prazo.²⁵

Embora os tratos respiratórios superior e inferior sejam os principais locais de entrada do SARS-CoV-2 no corpo, resultando em pneumonia por COVID-19 como a apresentação mais comum, de acordo com as evidências atualmente disponíveis o SARS-CoV-2 pode afetar todos os órgãos, levando a danos agudos

nos órgãos e sequelas a longo prazo, sendo os últimos efeitos percebidos apenas recentemente.²⁶

Sabe-se que o dano pulmonar agudo pode ser seguido por fibrose pulmonar e comprometimento crônico da função pulmonar, pode haver envolvimento do sistema nervoso central (SNC) e do sistema nervoso periférico (SNP), danificando direta ou indiretamente os neurônios, provocando sequelas neurológicas a longo prazo.²⁶

Sem dúvidas, o sistema respiratório se configura como a linha de frente da infecção por SARS-CoV-2.²⁷ As sequelas a longo prazo da COVID-19 ainda continuam sendo estudadas. As lições de epidemias virais anteriores revelam que, após a recuperação, os pacientes com infecções pulmonares virais podem sofrer de disfunção pulmonar irreversível e apresentar imagens residuais ou anormalidades funcionais. Opacidades residuais em vidro fosco, consolidações, opacidades reticulares e lineares, padrão de pavimentação em espiral residual e bandas fibróticas parenquimatosas são várias características encontradas nos estágios tardios ou de remissão da COVID-19.²⁸

Na fase aguda, com a infecção do hospedeiro e desenvolvimento da doença, o vírus pode lesar os pulmões de três maneiras: síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) com dano alveolar difuso (DAD), oclusão microvascular alveolar trombótica difusa, e inflamação das vias aéreas associada a mediadores inflamatórios. Os resultados dessas ações combinadas incluem oxigenação alveolar prejudicada, hipoxemia e acidose, podendo finalizar a morte do paciente por insuficiência respiratória ou sequelas de lesão pulmonar permanente.²⁹

Ademais, o SARS-CoV-2 induz a inflamação das vias aéreas através da infiltração inflamatória de bronquíolos, brônquios e traqueia e reduz a função de ventilação das vias aéreas.²⁹ Esses eventos no sistema respiratório, a formação de trombose intra-alveolar e dano viral inflamatório das vias aéreas, contribuem diretamente para o desenvolvimento de fibrose pulmonar.²⁹

As complicações neurológicas após uma infecção grave por COVID-19 podem incluir delírio, inflamação cerebral, acidente vascular encefálico e danos nos nervos.³⁰ No SNC, o receptor de ligação à proteína SARS-CoV-2 spike (S), ACE2, é amplamente expresso em células endoteliais microvasculares cerebrais. Essa proteína, SARS-CoV-2 spike (S), pode danificar diretamente a integridade da barreira hematoencefálica densa (BHD) em vários graus e pode induzir a resposta inflamatória das células endoteliais microvasculares. Esse mecanismo de ação possibilita o aparecimento de sintomas neurológicos, a formação de microtrombos fatais e até a ocorrência de encefalite associada ao COVID-19. Isso corrobora a base potencial para a ocorrência de sequelas neurológicas de longo prazo.³¹

Essa alta expressão do receptor ACE2 em uma ampla gama de locais no cérebro propicia o SARS-CoV-2 causar danos cerebrais agudos e a possibilidade de alterações neurodegenerativas posteriores. Ainda não está claro se SARS-CoV-2 causa doenças neurodegenerativas ou acelera sua ocorrência prematura, e é difícil tirar conclusões em apenas alguns meses. Porém, essa possibilidade é apoiada pelos achados de estudos recentes que mostraram a presença de inibição funcional de complexos de receptores de acetilcolina virais e nicotínicos na patogênese da infecção por SARS-CoV-2.³²

Outro ponto é que as células infectadas por SARS-CoV-2, incluindo neurônios, podem sofrer necrose, apoptose ou disfunção devido ao estresse oxidativo e influxo de íons de cálcio, com função mitocondrial prejudicada. Embora a necrose e a apoptose de células hospedeiras infectadas pareçam reduzir a sobrevivência do vírus, esses efeitos resultam em danos ao SNC. Essa explicação da patogênese de longo prazo da infecção cerebral por SARS-CoV-2 também pode incluir as sequelas neurológicas de longo prazo.³³

No sistema cardiovascular, alguns sintomas tardios são frequentemente relatados na literatura. As manifestações cardíacas na COVID-19 parecem ocorrer em diferentes momentos: agudamente durante a COVID-19 e/ou após a aparente recuperação da COVID-19. As complicações cardíacas descritas na fase aguda (pré-recuperação) incluem inflamação miocárdica/pericárdica, arritmias, insuficiência cardíaca e morte súbita cardíaca, mais comumente observadas com o aumento da gravidade da COVID-19, presença de comorbidades e idade avançada.³⁴

Ademais, estudos recentes apontam que os pacientes com COVID-19 têm uma probabilidade três vezes maior de um evento cardíaco adverso, avaliado em uma mediana de cinco meses após a alta, em comparação com controles pareados por idade, sexo e fator de risco.³⁴

Clinicamente, esses pacientes pareciam estar em maior risco do que os controles que nunca tiveram COVID-19 para uma série de doenças cardíacas, incluindo insuficiência cardíaca, infarto do miocárdio, miocardite, pericardite e arritmia.³⁴ A lesão miocárdica e a miocardite podem levar à dor torácica cardíaca crônica, intolerância ao exercício e à fadiga. Acredita-se que a pericardite recorrente seja uma consequência da infecção viral que possibilita um estado autoinflamatório cíclico ou persistente.^{23,34}

Uma das apresentações mais marcantes da COVID-19 tem sido sua capacidade de diminuir e alterar o sabor e o cheiro. Embora a anosmia normalmente se resolva sozinha, já existem relatos de indivíduos que não recuperam esses sentidos. As consequências a longo prazo da perda ou distorção do olfato e paladar terão consequências nutricionais, de segurança e psicológicas.³⁵

As manifestações psiquiátricas também são manifestações relevantes nos pós-COVID-19. Uma revisão sistemática e meta-análise das manifestações psiquiátricas associadas à doença SARS/MERS e SARS-CoV-2 concluiu que o estresse pós-traumático é muito prevalente (32,0%), seguido por déficits de memória (19,0%), irritabilidade (12,8%), ansiedade (12,3%), insônia (12,0%) e depressão (19,5%).³⁵

Além dos sintomas e complicações já citadas, indivíduos que experienciaram a COVID-19 relataram problemas de qualidade de vida, saúde mental e emprego. Esses indivíduos podem necessitar de cuidados multidisciplinares envolvendo o monitoramento dos sintomas em longo prazo, para identificar potenciais complicações, reabilitação física, saúde mental e apoio dos serviços sociais.^{25,36}

Publicações recentes vêm se dedicando ao estudo da síndrome COVID longa ou pós-COVID-19, condição em que os indivíduos afetados não se recuperam por várias semanas ou meses após o início dos sintomas sugestivos de COVID-19.^{13,37}

A COVID longa é uma condição complexa e cada vez mais reconhecida por sintomas heterogêneos prolongados e complicações secundárias pouco compreendidas no momento.^{38,39} Estudos recentes mostram que um número crescente de pacientes experimentará sintomas prolongados, sintomas cujo perfil e cronograma permanecem incertos.

Infecções virais que causam sintomas persistentes não são um conceito novo, pois SARS e MERS causam sintomas pós-infecção persistentes que permanecem muitos anos após a infecção. O que resta a ser determinado com a COVID-19 é a gravidade e a duração das longas manifestações da COVID.^{39,40}

A OMS¹³ estimou em 10-20% o número de pacientes com COVID-19 que tenham apresentado sintomas persistentes por meses após a infecção, e reconheceu que a condição é claramente uma preocupação de saúde pública, dado o impacto substancial que tem na sociedade, variando do aumento dos custos de saúde a custos econômicos e pró-perda de produtividade.⁴⁰ A falha em reconhecer que as consequências de longo prazo da COVID-19 também incluem o desenvolvimento de novas doenças crônicas resultará em novo despreparo para lidar com os enormes efeitos posteriores da infecção.^{13,41}

A avaliação contínua dos efeitos a longo prazo e seu impacto na qualidade de vida dos pacientes em recuperação é necessária, pois há que se estar preparado para o aumento de eventos pulmonares, cardíacos, vasculares, renais e outros órgãos após SARS-CoV-2 infecção.⁴⁰

2.3 O endotélio vascular: funções e avaliações

2.3.1 Endotélio vascular

O endotélio vascular é uma estrutura tecidual que recobre internamente todos os vasos do organismo. Ele é constituído por uma monocamada de epitélio do tipo pavimentoso, localizado entre o sangue circulante e a camada média do músculo liso vascular, regulando o tônus vascular.⁴²

O endotélio age diretamente como um sensor nas modificações hemodinâmicas, em resposta a estímulos humorais, neurais e mecânicos capazes de transmitir os sinais responsáveis para a síntese de substâncias vasoativas, que desempenham papel fundamental na regulação do tônus vascular, fluidificação, coagulação, manutenção da circulação sanguínea, assim como respostas inflamatórias.⁴³

Em condições fisiológicas, o endotélio continuamente secreta substâncias que contribuem para equilíbrio entre a vasodilatação e vasoconstrição. As principais moléculas vasodilatadoras são os fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRF), a prostaciclina (PGI₂), os fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (EDHF); e substâncias vasoconstritoras – tromboxano A₂, endotelina e fator de ativação plaquetária (PAF).⁴²

Em vasos sadios, os EDRF são liberados de forma basal através de uma grande variedade de estímulos fisiológicos (exercício, aumento de fluxo sanguíneo, aumento da tensão nas paredes, temperatura) e de substâncias vasoativas, como a acetilcolina, histamina, bradicinina, substância P, serotonina, vasopressina, noradrenalina, ADP, ATP, trombina e fator de ativação plaquetária (FAP). Os EDRF desempenham o papel de inibidor da adesão e agregação plaquetária.^{43,44}

A liberação de fatores relaxantes derivados do endotélio pode ser induzida através do aquecimento local da pele, gerando um potente efeito vasodilatador na região estimulada. A resposta vasodilatadora é caracterizada por um pico inicial de rápida duração (1-2 min), que se estende por cerca de 15 a 20 minutos e depende predominantemente de fatores endoteliais como eicosanoides (prostaciclina – PGI₂, metabólitos do citocromo P450, etc.) que formam a via do EDHF, e da via do óxido nítrico (NO), que é responsável por 2/3 da resposta vasodilatadora.^{44,45}

Os EDRF são uma família de moléculas capazes de induzir o relaxamento do músculo liso do leito arterial, promovendo assim a vasodilatação. Entre os fatores relaxantes conhecidos, o NO parece ser um importante regulador metabólico e hemodinâmico, pois consegue se difundir livremente pelas membranas celulares,

onde sua síntese ocorre em vários tipos celulares e tecidos, como no endotélio vascular, em macrófagos, nas plaquetas e nas células neuronais.⁴⁶

O NO medeia vários fenômenos, como a vasodilatação dependente de endotélio, a citotoxicidade mediada por macrófagos, inibição da ativação, adesão e agregação plaquetária, relaxamento do corpo cavernoso, regulação da pressão sanguínea basal, depressão sináptica, potencialização da transmissão sináptica e microcirculação medular e glomerular.⁴⁶

No sistema circulatório, em particular na coagulação sanguínea, o NO está envolvido com a cascata fibrinolítica e trombótica, eventualmente, associado com dano endotelial, sendo que as propriedades antitrombóticas do NO resultam em parte da inibição da adesão e agregação plaquetária.^{47,48} A deficiência de NO tem sido associada com trombose arterial.⁴⁸

Nos vasos sanguíneos, o NO exerce função na modulação do diâmetro vascular e da resistência vascular pela sua habilidade em relaxar o músculo liso vascular. O NO inibe interações de elementos sanguíneos circulatórios com a parede do vaso.⁴⁶

Uma deficiência de NO pode promover trombose vascular, aterogênese e injúria da reperfusão.^{49,50} A diminuição da vasodilatação dependente do endotélio pode ser induzida por hipertensão, diabetes e/ou aterosclerose. O NO pode ser um inibidor da adesão leucocitária em microvasos pós-capilares.^{51,52}

O NO endógeno é produzido por vias enzimáticas, proveniente da degradação da L-arginina em L-citrulina e NO. A óxido nítrico-sintase (NOS) é a enzima responsável pela síntese do NO. Três isoformas de NOS são descritas, sendo uma NOS induzida (iNOS) e duas NOS constitutivas (cNOS), sendo elas a forma endotelial (eNOS ou NOS3) e a forma neuronal NOS (nNOS ou NOS1).⁵³

As células endoteliais vasculares produzem e liberam NO pela atividade da enzima NOS3, um dos moduladores mais importantes na regulação do tônus da musculatura lisa vascular.⁵⁴ Como consequência à disfunção endotelial, observa-se o dano à vasodilatação dependente do endotélio, causada por uma perda da biodisponibilidade do NO.⁵² Em estados infecciosos/inflamatórios, a microcirculação é acometida em todos os seus segmentos – arteríolas, capilares e vênulas – sofrendo alterações funcionais e estruturais, além de atuar perpetuando a resposta inflamatória.⁵²

Estados inflamatórios exacerbados culminam em estase sanguínea, ativação plaquetária e disfunção endotelial, elevando as chances de episódios trombóticos venosos e arteriais. A coagulopatia na infecção grave por COVID-19 é semelhante à coagulopatia induzida pela sepse, caracterizada por coagulação intravascular

disseminada e microangiopatia trombótica. Somado a isso, destaca-se que a hipoxemia, secundária à lesão pulmonar causada pela COVID-19, é fator de risco para trombose.^{55,56}

2.3.2 Avaliação da função endotelial

Rotineiramente na prática clínica as avaliações da função endotelial são utilizadas, sejam elas na macrocirculação ou na microcirculação. Usualmente parâmetros hemodinâmicos relacionados à macrocirculação, como pressão arterial média (PAM), pressão venosa central (PVC), débito cardíaco (DC), e saturação venosa mista (SvO_2) e central ($ScvO_2$) de oxigênio, são utilizados durante a avaliação clínica do paciente.⁵⁷ Porém estudos demonstram que existe dissociação entre esses parâmetros e o estado da microcirculação dos pacientes.^{58,59}

A avaliação da microcirculação pode ser realizada em diferentes tecidos de acordo com a técnica e o aparelho utilizado. A região sublingual, por exemplo, é frequentemente utilizada para realização da videomicroscopia, por ser de fácil acesso e não invasiva, além de ser potencialmente confiável para o acompanhamento e o manejo clínico de pacientes.⁶⁰

A microcirculação é formada por vasos com diâmetro inferior a 100 μm , compostos por arteríolas, metarteríolas, capilares e vênulas.⁶¹ As arteríolas são responsáveis pela manutenção do tônus vascular e, conseqüentemente, pelo controle do gradiente de pressão existente entre os capilares proximais e distais.⁶¹ Assim, elas promovem o controle local do fluxo sanguíneo de acordo com a demanda metabólica dos tecidos.

Testes que utilizam estímulos fisiológicos ou farmacológicos realizados para avaliar a reatividade microvascular podem ser dependentes ou independentes do endotélio vascular. Alguns métodos já foram descritos para o estudo da microcirculação cutânea: a estimulação térmica pelo calor ou pelo frio, estimulação induzida pela pressão local, hiperemia reativa pós-oclusiva, administração local de agentes farmacológicos, entre outros. A reatividade microvascular cutânea foi avaliada através da técnica de *laser Doppler flowmetry* (LDF), padronizada e validada em diversos estudos clínicos.^{10,62-65}

Entre esses vários métodos, será descrita e realizada a monitorização da perfusão tecidual por *laser Doppler*, ou em inglês *Laser Doppler Perfusion Monitoring*

(LDPM), um método capaz de obter leitura do fluxo sanguíneo microvascular tecidual em uma área onde a sonda é colocada.

Baseada nos fundamentos do efeito Doppler, descrito pela primeira vez por Christian Johann Doppler em 1842, a fluxometria *laser* Doppler permite medir de forma não invasiva variações de parâmetros microcirculatórios sistêmicos, tais como a velocidade e variação de fluxo em uma área da pele ao qual o fluxômetro é sensível.

O sinal luminoso emitido pelo *laser* Doppler penetra na pele e sofre reflexão pelas células em movimento nos microvasos superficiais, sendo esta reflexão proporcional ao número e velocidade das células sanguíneas em trânsito. De acordo com o princípio Doppler, ocorre uma mudança de frequência, gerando um sinal correlacionado de maneira linear com o fluxo de hemácias. O sinal é semiquantitativo e expresso em unidades de perfusão de voltagem de saída (1UP = 10mV), de acordo com o Consenso Europeu (*European Laser Doppler Users Groups, London 1992*).

No presente estudo, o fluxo máximo em resposta a hiperemia térmica e a condutância vascular cutânea dele derivada foram obtidos no platô do registro, fase em que a influência vasodilatadora dependente de endotélio é mais evidente. Foi calculada igualmente a área sob a curva de hiperemia térmica.

A avaliação do fluxo sanguíneo e reatividade microvascular em pacientes portadores da COVID-19 pode então ser realizada de modo não invasivo na pele utilizando o LDPM, como será descrito neste estudo.

2.3.3 Função endotelial e COVID-19

No desenvolvimento e evolução da COVID-19 percebe-se a desregulação de várias vias, não se limitando ao trato respiratório, mas configurando-se como uma síndrome multissistêmica na qual o endotélio vascular é um dos órgãos mais danificados, caracterizado por um estado de imunotrombose dentro de microvasos e uma predisposição à macrotrombose.⁶⁶ Os diversos distúrbios clínicos e biomarcadores observados na COVID-19 podem ser classificados em interrupção do equilíbrio imunológico, renina-angiotensina-aldosterona (RAA) e trombótico, convergindo para o endotélio vascular como uma via comum.^{67,68}

Entende-se que o SARS-CoV-2 infecta a célula endotelial vascular causando danos celular e apoptose, que resulta consequentemente na diminuição da atividade antitrombótica da superfície luminal e distúrbio microcirculatório associado à formação de trombos, contribuindo para a disfunção respiratória.⁶⁹

Diretamente, o SARS-CoV-2 infecta as células endoteliais devido aos seus altos níveis de expressão da ACE2 e da protease transmembranar serina 2 (TMPRSS2).

A ACE2 é expressa no endotélio vascular humano, epitélio respiratório e outros tipos de células, e acredita-se que a ligação de SARS-CoV-2 à ACE2 seja o mecanismo primário. Em condições fisiológicas, a ACE2 por meio de sua atividade carboxipeptidase gera fragmentos de angiotensina (Ang 1-9 e Ang 1-7) e desempenha um papel essencial no sistema renina-angiotensina (RAS), um regulador crítico da homeostase cardiovascular.⁷⁰

Após a ligação por SARS-CoV-2, o ACE2 é internalizado, e a falta de ACE2 nas células endoteliais favorece a progressão de processos inflamatórios e trombóticos desencadeados pela hiperatividade local da angiotensina II. A inibição de ACE2 pela ligação de SARS-CoV-2 reduz a conversão mediada por ACE2 de Ang II em Ang 1-7. A redução da ativação do receptor MAS induz um fenótipo pró-inflamatório através do aumento da ativação dos receptores da angiotensina tipo 1 (AT1R).⁷⁰ Além disso, a redução nos níveis de ACE2 limita a degradação de bradicinina em peptídeos inativos, provocando o aumento da sinalização pró-trombótica através da ativação de receptores de bradicinina.⁷¹

O SARS-CoV-2 também ativa o sistema complemento – um componente integral da resposta imune inata. O sistema complemento, como outros componentes do sistema imunológico inato, é responsável por controlar infecções bacterianas e virais, porém sua ativação exacerbada, como ocorre na infecção prolongada por SARS-CoV-2, pode ser prejudicial, causando danos diretos aos tecidos do hospedeiro.⁷² Além disso, complexos de anticorpos específicos para SARS-CoV-2 e antígenos virais podem induzir lesão de células endoteliais por meio da ativação do complexo C1 da via clássica e indução de citotoxicidade dependente de anticorpos (ADC).⁷¹

O uso de uma abordagem proteômica clínica de alto rendimento identificou ativação consistente da via clássica do complemento (especificamente, componentes do complemento C1R, C1S e C8A) no soro de pacientes com COVID-19 clinicamente grave, juntamente com aumento da ativação da via alternativa componente, complemento fator B e seus moduladores CFI e CFH.⁷³

Embora os estudos clínicos sobre a ativação do complemento após a infecção por SARS-CoV-2 sejam limitados, os achados indicam que a ativação irrestrita do mesmo pode contribuir para a lesão e morte das células endoteliais, com subsequente desnudamento vascular e exposição da membrana basal trombogênica, trombose e coagulação intravascular, resultando em falência orgânica multissistêmica em pacientes com COVID-19.^{71,74}

Ainda, indiretamente, o vírus SARS-CoV-2 promoveria uma tempestade sistêmica de citocinas inflamatórias.⁷⁵ Isso inclui o papel do endotélio vascular

no recrutamento de leucócitos inflamatórios, que contribuem para o dano tecidual e a liberação de citocinas, sendo os principais fatores da síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), na coagulação intravascular disseminada e nas complicações cardiovasculares na COVID-19 (Figura 1).⁷¹

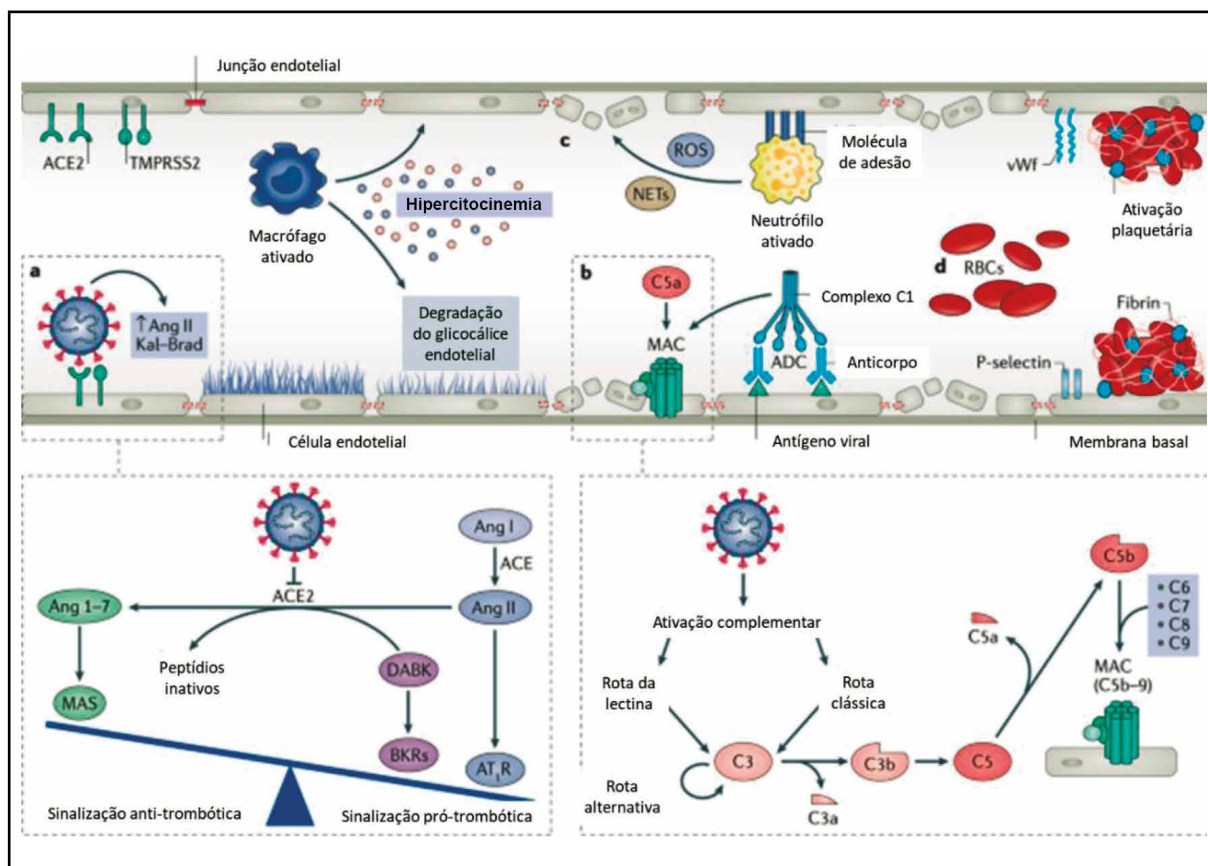


Figura 1 – Efeito da infecção por SARS-CoV-2 na função das células endoteliais, coagulação sistêmica e trombose

Fonte: Adaptado de Perico et al., 2021.⁷¹

Há também evidências que ligam as células endoteliais (CE) à infecção por SARS-CoV-2, incluindo: (i) a expressão e função de seu receptor enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) na vasculatura; (ii) a prevalência de uma síndrome semelhante à doença de Kawasaki (vasculite) na COVID-19; e (iii) evidência de infecção em células endoteliais com SARS-CoV-2 em pacientes com COVID-19 fatal.⁷⁶

Em diferentes órgãos de pacientes com COVID-19, partículas virais foram encontradas dentro de células endoteliais mortas associadas a um acúmulo de células inflamatórias mortas, evidenciando um ataque viral direto e uma resposta inflamatória difusa do hospedeiro na parede do vaso.⁷⁷

Portanto, é razoável supor que a disfunção endotelial contribua para a inflamação vascular associada ao COVID-19, particularmente endotelite, no pulmão,

coração e rim, bem como coagulopatia associada ao COVID-19, particularmente microtrombos fibrinosos pulmonares nos capilares alveolares.

Cabe ressaltar que essa disfunção endotelial é subjacente a várias doenças agudas (como na sepse) e ocorre também nas crônicas, consideradas condições coexistentes associadas a pior prognóstico na COVID-19, como por exemplo, hipertensão, diabetes e obesidade. Ademais, essa disfunção teria um papel importante em outras manifestações clínicas da COVID-19, incluindo lesão cardíaca e hipercoagulabilidade medida por aumento nos níveis de dímero D e fator de Von Willebrand (VWF).⁷⁰

Ainda, a disfunção endotelial pré-existente combinada com o ataque direto do SARS-CoV-2 no sistema vascular pode ser responsável por uma alta mortalidade de pacientes com COVID-19.⁷⁸

Esses níveis elevados do fator de VWF em pacientes com COVID-19 apoiam ainda mais a hipótese de disfunção ou dano endotelial induzido por SARS-CoV-2. O VWF é uma glicoproteína adesiva circulante, secretada por células endoteliais e plaquetas e seus níveis são elevados em vasculite, inflamação, envelhecimento e diabetes, condições que estão todas associadas à disfunção endotelial. O VWF ativa as plaquetas provocando agregação plaquetária, atua como carreador do fator de coagulação VIII e contribui para a coagulação sanguínea. Além disso, o VWF é fator fundamental no sistema vascular, incluindo a regulação da angiogênese e da permeabilidade vascular.^{79,80}

Evidências crescentes sugerem que a perda da integridade da barreira do vaso e o desenvolvimento de um endotélio pró-coagulante contribuam para o início e propagação da SDRA na COVID-19, induzindo endotelite e mediando a infiltração de células inflamatórias nos pulmões.⁷¹

Mecanismos adicionais, como a redução da atividade endotelial da síntese do óxido nítrico e dos níveis de óxido nítrico, bem como a liberação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) como consequência da hipóxia sistêmica induzida pela SDRA, também têm sido propostos como processos patogênicos-chave na disfunção endotelial subjacente após infecção por SARS-CoV-2.^{81,82}

Ademais, a COVID-19 está associada ao aumento do número de plaquetas imaturas, mesmo com contagens normais de plaquetas que são mais funcionais, promovendo o aumento de eventos de coagulação na COVID-19. Além de aumentar o número de plaquetas imaturas, os pacientes com COVID-19 podem ter níveis aumentados de plaquetas ativadas circulantes.⁸⁰

3 JUSTIFICATIVA

Considerando as alterações vasculares já conhecidas e descritas na COVID-19, é importante e justifica-se a investigação da função endotelial sistêmica nos pacientes com COVID-19, através de um leito vascular acessível, uma vez que podem estar relacionadas com a progressão, complicações e com o prognóstico da doença.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo primário

Avaliar a função endotelial microvascular de pacientes portadores de doenças cardiovasculares em fase aguda da COVID-19 e a longo prazo (12-15 meses) após a recuperação do quadro infeccioso.

4.2 Objetivos secundários

- Investigar as associações entre variáveis obtidas no estudo da microcirculação com variáveis demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes analisados na fase aguda.
- Avaliar possíveis diferenças nos perfis microcirculatórios observados entre os pacientes com apresentação moderada e grave da COVID-19.
- Comparar os parâmetros microcirculatórios de pacientes em fase aguda e após recuperação com voluntários saudáveis.
- Investigar as associações entre as alterações obtidas no estudo da microcirculação com a persistência de sintomas tardios da COVID-19.

5 MÉTODOS

5.1 Caracterização do estudo

Trata-se de estudo observacional, longitudinal, prospectivo, que avaliou as alterações do fluxo e reatividade microvascular pela técnica de LDPM em pacientes portadores de doenças cardiovasculares, com diagnóstico de COVID-19 confirmado por RT-PCR, no Instituto Nacional de Cardiologia (INC), centro de atenção à saúde de nível quaternário, especializado em Cardiologia, no período de maio de 2020 a outubro de 2020.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Cardiologia, sob o nº CAAE: 31237220.1.0000.5272 (ANEXO A).

Os pacientes em condições clínicas de entendimento e responsabilização assinaram o Termo de Consentimento Livre e esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A), de acordo com a Resolução CNS 466/2012. No caso dos pacientes graves, foi feito contato por via telefônica com o familiar responsável, em viva voz, e realizada a gravação de toda a orientação e autorização.

Foram submetidos e assinados, o Termo de Compromisso de Utilização de Dados (TCUD) para sigilo das informações coletadas em bancos de dados (APÊNDICE B), e o Termo de Anuência das Chefias, assinado por responsáveis de cada um dos setores com áreas de isolamento e pacientes internados com COVID-19 (ANEXO B).

5.2 População estudada

Foram estudados indivíduos, de ambos os sexos, maiores de 18 anos, portadores de doenças cardiovasculares, com infecção por SARS-CoV2 confirmada por análise de RT-PCR de *swabs* nasofaríngeos após a internação hospitalar.

O recrutamento dos pacientes foi feito nos setores destinados a isolamento respiratório do INC, tanto em terapia intensiva quanto em enfermaria, no período de maio de 2020 a outubro de 2020.

Os critérios de inclusão adotados foram:

- Idade ≥ 18 anos
- Internação no INC
- Teste molecular por PCR em tempo real positivo para SARS-CoV-2

Os critérios de exclusão foram:

- Presença de infecção não COVID com repercussão sistêmica e documentada microbiologicamente
- Testes moleculares de PCR inconclusivos ou indeterminados

Um grupo de 14 voluntários saudáveis (sem doenças crônicas ou fatores de risco cardíaco) foi recrutado entre os funcionários do INC, que testaram negativo para SARS-CoV-2. Este grupo também foi avaliado pela técnica de LDPM e constituiu o grupo-controle.

Durante o recrutamento inicial, 94 pacientes foram diagnosticados com COVID-19. Porém houve exclusão de pacientes por apresentarem resultado indeterminado e inconclusivo e também por transferência para unidades hospitalares destinadas a pacientes com COVID-19, antes da realização do LDP.

O fluxograma (Figura 2) mostra o recrutamento e a avaliação dos pacientes do estudo.

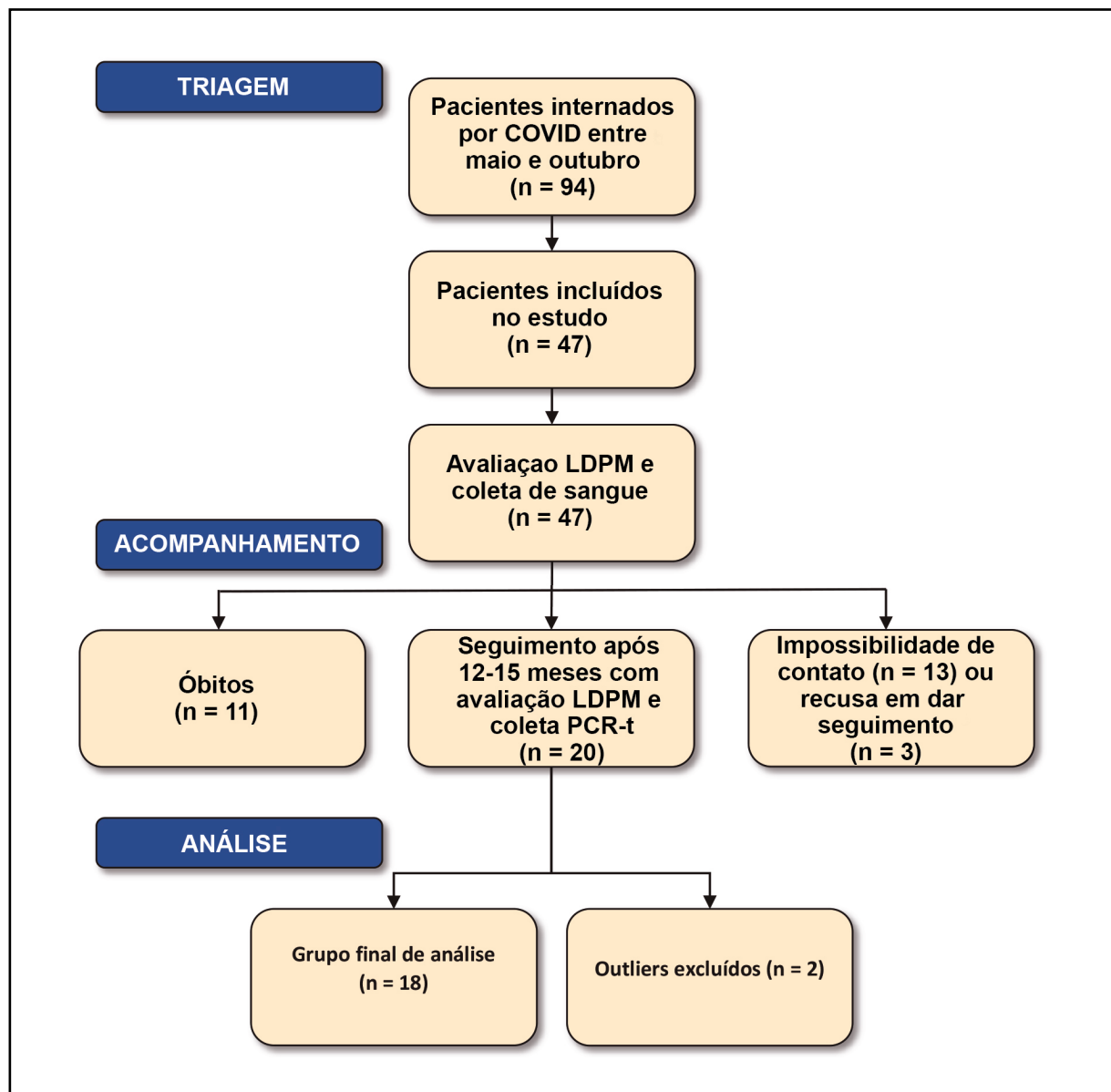


Figura 2 – Recrutamento dos pacientes do estudo

Legenda: LDPM – *laser Doppler perfusion monitor*

5.3 Procedimentos de investigação

Foi realizada uma avaliação clínica inicial dos pacientes com aferição dos sinais vitais (pressão arterial, frequência cardíaca e temperatura), coleta de sangue para análise de bioquímica básica e, posteriormente, realização da análise com LDPM.

A avaliação do fluxo microvascular foi realizada entre 24-48 horas após a confirmação do diagnóstico por RT-PCR. A coleta de bioquímica e dados laboratoriais foram obtidos em até 24 horas após a avaliação microvascular.

Foram coletadas, através de anamnese e dados de prontuários, informações sobre dados clínicos e demográficos, registradas em um banco de dados do RedCap.

Durante a avaliação da fase aguda, os pacientes foram estratificados em dois grupos: COVID-19 leve a moderada (M-COVID) e COVID-19 grave (S-COVID) e comparados com um grupo de voluntários saudáveis.

A COVID-19 grave (S-COVID) foi definida de acordo com os critérios da Organização Mundial da Saúde,¹³ enquanto todos os outros casos de COVID-19 foram considerados leves a moderados (M-COVID). Os casos graves desenvolveram SDRA com necessidade de internação em terapia intensiva, já os casos leves ou moderados foram geralmente definidos com base em sintomas clínicos menos graves (febre baixa, tosse, desconforto respiratório), sem evidência de síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) e sem necessidade de internação na Unidade de Terapia Intensiva (UTI).

Para caracterizar a SDRA, é necessário um insulto agudo (descrito nos Critérios de Berlim). A SDRA é uma resposta inflamatória pulmonar excessiva, devido a diferentes tipos de agressões, que leva ao aumento da permeabilidade capilar pulmonar e sistêmica e a instalação de uma insuficiência respiratória aguda.

O grupo-controle, constituído por voluntários saudáveis, também foi avaliado pela técnica de LDPM.

Após 12-15 meses os pacientes foram reconvocados para reavaliação. Na fase de seguimento, os pacientes foram novamente submetidos a aferição dos sinais vitais com coleta de sangue para análise da PCR e, posteriormente, realização da análise com LDPM.

5.3.1 LDPM

Para a realização do *laser Doppler perfusion monitor* houve adequação do local com ajuste da temperatura ambiente (cerca de 25°C), posicionado o paciente

em decúbito ventral com a cabeceira a 30°, deixando o antebraço estendido e de fácil acesso. Um Doppler de ponto único (LDPM) (*Periflux 5001*, *Perimed*, Jarfalla, Suécia) foi utilizado para medir de forma não invasiva a perfusão microvascular sistêmica (em unidades arbitrárias de perfusão [APU=10 mV]), utilizando uma sonda *laser* de aquecimento (PF 457, *Perimed*). A sonda *laser* foi acoplada ao antebraço, em uma região com pouco pelo, sem ferida local ou hematoma, fixada com fitas adesivas para evitar deslocamento da mesma (Figura 3), e os pacientes foram orientados quando possível a não se moverem durante a análise e registro do *laser*.

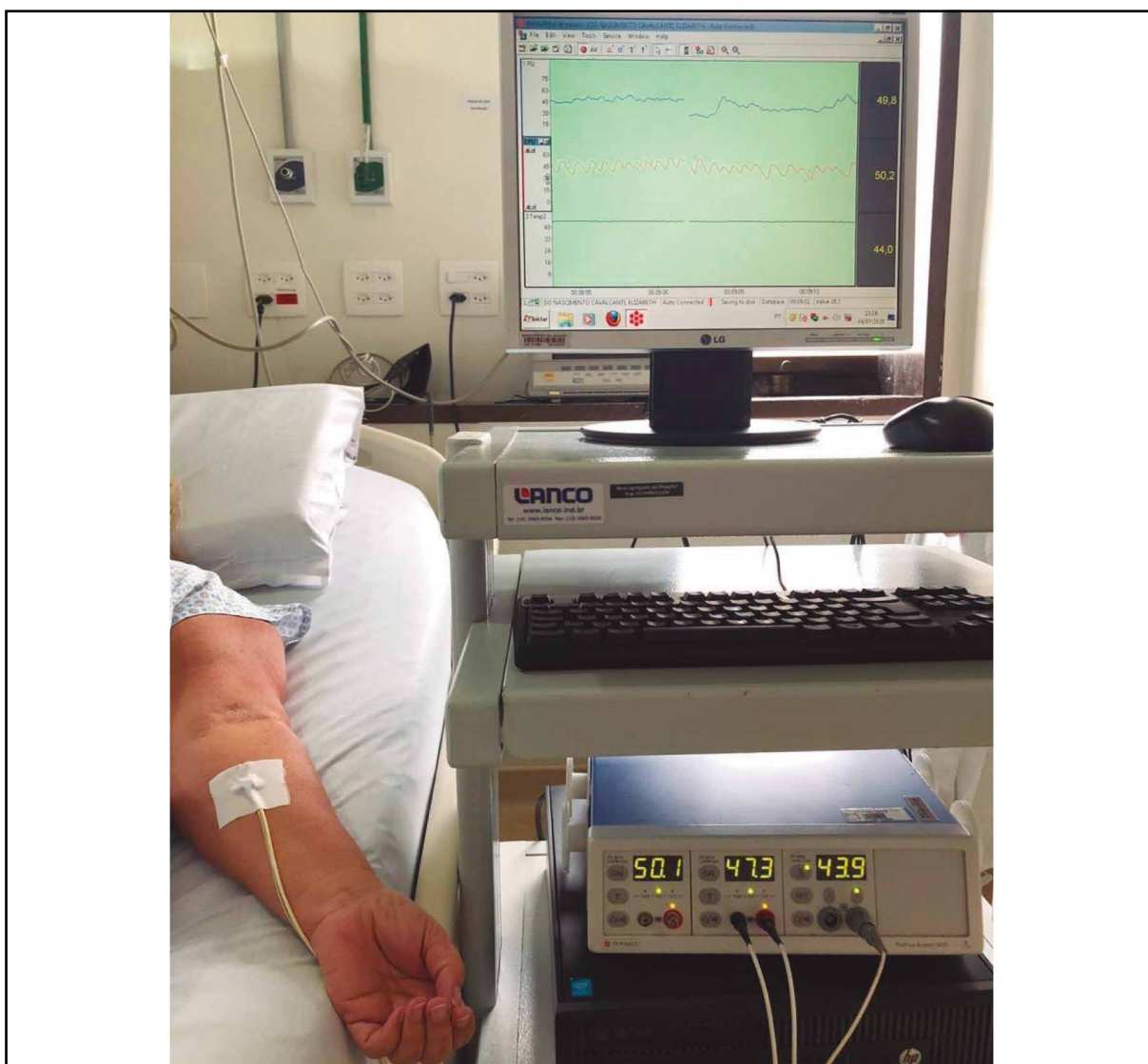


Figura 3 – Aparelho de LDPM à beira do leito

Legenda: LDPM – *laser Doppler perfusion monitor*

Fonte: Acervo pessoal da autora

O fluxo basal foi analisado durante 5 minutos e, posteriormente, essa análise usada de forma comparativa. Após esse período foi realizado estímulo térmico através

de aquecimento local até a temperatura de 44°C pela sonda *laser* (hiperemia térmica local – LTH). O registro do fluxo em resposta ao aquecimento da sonda de luz *laser* aplicada sobre a pele do antebraço dos pacientes foi monitorado durante um período mínimo de 15 minutos. O fluxo máximo obtido dessa forma é considerada a resposta como a resposta vasodilatadora máxima obtida pelo protocolo de exame. Após o término da análise, todo o equipamento foi devidamente higienizado.

As áreas sob as curvas geradas na análise microvascular (Figura 4), tanto do fluxo basal quanto do fluxo após hiperemia local, foram analisadas através de um *software* dedicado da *Perimed* para *Perimed Periflux System 5001* (*Perimed*, Jarfalla, Suécia) e variáveis correlacionadas estatisticamente. As áreas sob a curva induzida pela LTH e o fluxo microvascular médio durante a LTH foram calculados.

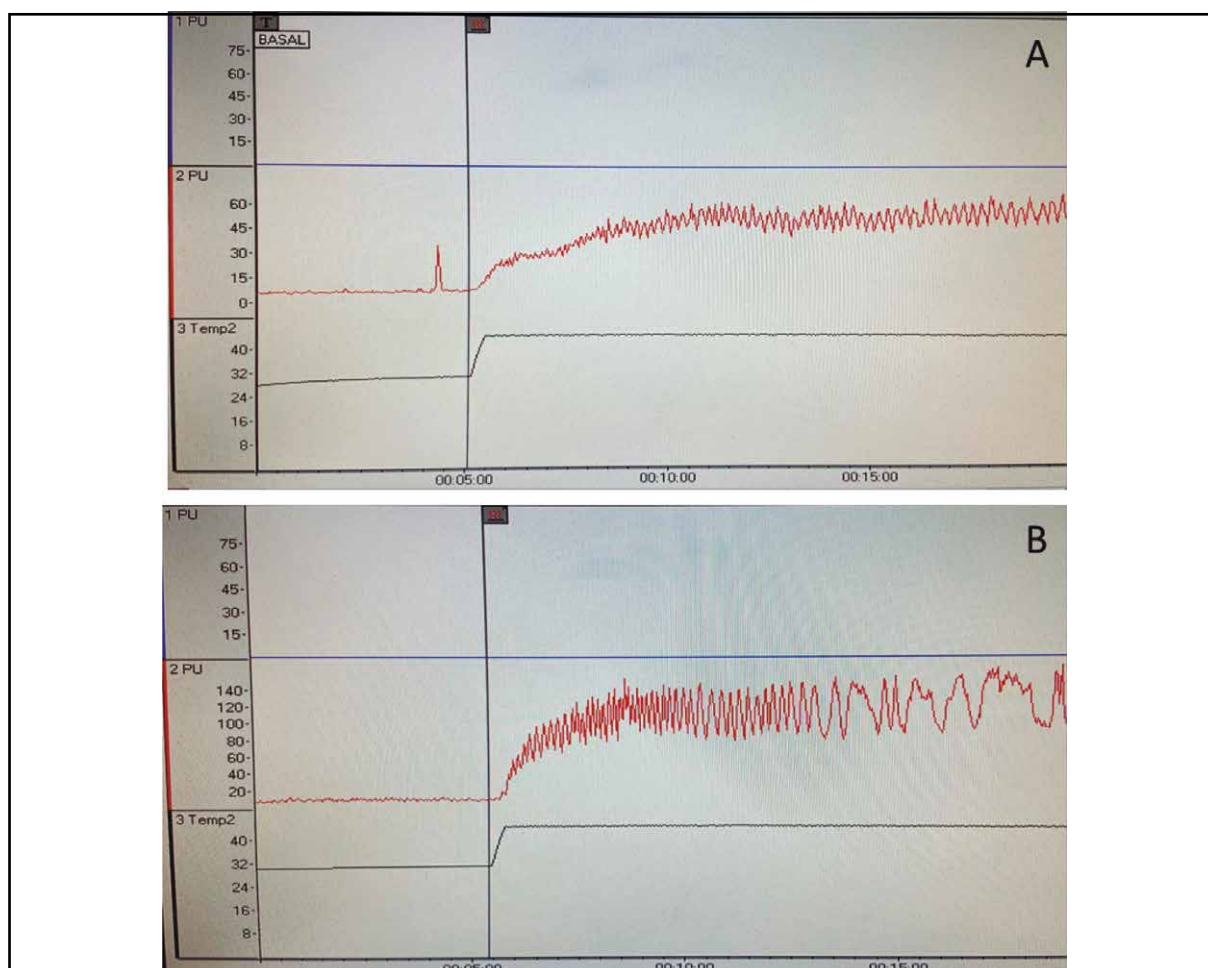


Figura 4 – Curvas de análise pelo LDPM

Em A: na fase aguda

Em B: na fase tardia

Legenda: LDPM – *laser Doppler perfusion monitor*

Nota: Observa-se o dobro dos valores em B, na escala de Unidades arbitrárias de perfusão (AUP)

Fonte: Acervo pessoal da autora.

Como o sinal do Doppler não pode ser traduzido facilmente em valores absolutos de fluxo, as alterações de fluxo cutâneo são calculadas com relação ao fluxo basal. Os valores máximos de fluxo também são expressos sob a forma de condutância vascular cutânea (CVC), representada pela relação entre o fluxo máximo medido pelo *laser* Doppler e a pressão arterial média (mV/mmHg). Para efeitos comparativos, foram analisados o fluxo máximo em unidades arbitrárias de perfusão (UAP), a CVC máxima em UAP/mmHg e a área sob a curva definida de modo semiautomático.⁸³

5.3.2 Avaliação laboratorial

Os dados laboratoriais foram obtidos no prontuário de exames coletados na rotina laboratorial dos pacientes internados, usando os valores de até 24 horas após a avaliação da reatividade microvascular.

O grupo-controle não foi submetido à avaliação laboratorial.

Durante a fase de seguimento via ambulatorial, os pacientes foram submetidos à coleta de sangue apenas para análise da proteína C-reativa (PCR) como parâmetro laboratorial de infecção ativa.

5.4 Análise estatística

Na análise descritiva os resultados foram expressos em médias $\pm$ desvios-padrão ou mediana (percentis 25 - 75) para as variáveis paramétricas ou não paramétricas, respectivamente, de acordo com o teste de normalidade Shapiro-Wilk.

A análise inferencial foi composta pelos seguintes testes:

- A análise estatística foi realizada por meio de testes t pareados bicaudais (valores paramétricos) ou teste de Wilcoxon (valores não paramétricos).
- As curvas de vasodilatação microvascular induzida por LTH foram analisadas por análise de variância de duas vias (ANOVA) seguida do teste de comparações múltiplas de Sidak.
- Os valores discrepantes dos parâmetros microvasculares foram detectados pelo método ROUT, que combina regressão robusta e remoção de valores discrepantes. O método de regressão ROUT segue três etapas:
 - a) O método de regressão não linear robusto é usado para ajustar uma curva que não é influenciada por *outliers*.

- b) Os resíduos do ajuste robusto são analisados para identificar quaisquer *outliers*. Esta etapa usa um novo teste de *outlier* adaptado da abordagem *False Discovery Rate* de teste para comparações múltiplas.
- c) Os valores discrepantes são removidos e a regressão de mínimos quadrados é executada nos dados restantes.

O critério de determinação de significância adotado foi 5%. A análise foi processada pelo programa estatístico *Prismversion 7.0* (*GraphPad Software Inc. La Jolla, CA, USA*).

6 RESULTADOS

6.1 Fase Aguda: características clínicas e demográficas dos pacientes

Foram incluídos no estudo 47 pacientes, portadores de doenças cardiovasculares, em fase aguda da COVID-19 com RT-PCR positivo para coronavírus. As características demográficas, clínicas e laboratoriais desses pacientes foram coletadas durante a realização do LDPM e estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Características clínicas, demográficas e laboratoriais dos pacientes na fase aguda da COVID-19

Características	(n=47)
Sexo masculino n (%)	27 (57)
Idade na coleta do <i>swab</i> (anos) média±DP	60 ± 14
Peso (kg) média±DP	75 ± 14
Altura (cm) média±DP	1,65 ± 0,08
Índice de massa corpórea (kg/m ²)	25,4 ± 3,0
Internado por COVID-19 n (%)	24 (51)
Sintomático de COVID-19 n (%)	30 (64)
Pré-operatório n (%)	14 (30)
Pós-operatório tardio n (%)	13 (28)
Pós-operatório recente n (%)	2 (4)
Doença arterial coronariana n (%)	33 (70)
Valvulopatia n (%)	13 (28)
Ar ambiente n (%)	34 (72)
Oxigênio n (%)	6 (13)
Ventilação mecânica n (%)	7 (15)
Temperatura corporal (°C) média±DP	36 ± 1
Saturação de oxigênio (%) média±DP	96 ± 3
Pressão arterial sistólica (mmHg) média±DP	118 ± 19
Pressão arterial diastólica (mmHg) média±DP	69 ± 11
Frequência cardíaca (bpm) média±DP	77 ± 16
Frequência respiratória (irpm) média±DP	25 ± 7
Medicações em uso	
Bloqueador do receptor de angiotensina n (%)	10 (21)
Inibidor da enzima conversora de angiotensina n (%)	11 (23)
Betabloqueador n (%)	34 (72)
Bloqueador do canal de cálcio n (%)	10 (21)
Vasodilatador n (%)	4 (9)
Nitrato n (%)	4 (9)
Diurético n (%)	26 (55)

Continua

	Conclusão
Estatina n (%)	30 (64)
Hipoglicemia n (%)	2 (4)
Insulina n (%)	19 (40)
Ácido acetilsalicílico n (%)	24 (51)
Corticoide n (%)	45 (96)
Antiagregante plaquetário n (%)	11 (23)
Anticoagulante oral n (%)	2 (4)
Heparina n (%)	39 (83)
Antibiótico n (%)	18 (38)
Oseltamivir n (%)	3 (6)
Amina n (%)	5 (11)
Vasodilatador venoso n (%)	2 (4)
Fatores de risco	
Hipertensão arterial sistêmica n (%)	38 (81)
Diabetes mellitus n (%)	22 (47)
Dislipidemia n (%)	17 (36)
Tabagismo n (%)	14 (30)
Fibrilação atrial n (%)	7 (15)
História familiar n (%)	6 (13)
Angioplastia coronariana n (%)	15 (32)
Cirurgia de revascularização do miocárdio n (%)	10 (21)
Exames laboratoriais	
Hematócrito (%) média±DP	32 ± 9
Hemoglobina (g/dL) média±DP	11 ± 3
Leucócitos (células/mm ³) média±DP	8 292 ± 3 668
Plaquetas (células/microlitro) média±DP	225 217 ± 114 674
Proteína C-reativa (mg/dL) média±DP	7,6 ± 8,8
Glicemia (mg/dL) média±DP	150 ± 51
Ureia (mg/dL) média±DP	70 ± 64
Creatinina (mg/dL) média±DP	1,3 ± 0,8
Sódio (mEq/L) média±DP	138,5 ± 5,2
Magnésio (mg/dL) média±DP	2,0 ± 0,2
Potássio (mEq/L) média±DP	4,6 ± 0,7
Tempo de atividade da protrombina (s)	18,5 ± 4,4
Tempo de tromboplastina parcial (s) média±DP	50,5 ± 13,4
INR média±DP	1,3 ± 0,2
Transaminase oxalacética (U/L) média±DP	77 ± 116
Transaminase pirúvica (U/L) média±DP	35 ± 26
D- Dímero (mg/L) média±DP	1648 ± 1327
Desidrogenase láctica (UI/L) média±DP	333 ± 235
Ferritina (ng/mL) média±DP	619 ± 64
Fração de ejeção do ventrículo esquerdo (%) média±DP	49,8 ± 15,7

Legenda: INR – *International Normalized Ratio*; DP – desvio-padrão

A média de idade foi 60 ± 14 anos e o sexo masculino correspondeu a 27/47 (57%).

Pouco mais da metade dos pacientes 24/47 (51%) com doenças cardiovasculares foi internada por COVID-19 e 30/47 (64%) apresentaram sintomas relacionados à infecção.

Dos pacientes submetidos ao LDPM na fase aguda ($n=47$), 14 (30%) estavam internados em pré-operatório, 13 (28%) estavam em pós-operatório tardio (mais de 6 meses de cirurgia) e 2 (4%) em pós-operatório recente (menos de 6 meses de cirurgia).

Em relação às comorbidades, a hipertensão arterial sistêmica (HAS) foi encontrada em 38 (81%) pacientes, a diabetes em 22 (47%), a dislipidemia em 17 (36%), a história familiar em 6 (13%) e o tabagismo em 14 (30%) pacientes.

A média e o desvio-padrão (DP) do índice de massa corpórea (IMC) foi $25,4 \pm 3,0$ kg/m². Dentre as principais etiologias de doenças cardiovasculares, 33 (70%) pacientes tinham doença arterial coronariana e 13 (28%) tinham valvulopatias.

Dentre os principais procedimentos de revascularização miocárdica, 15 (32%) pacientes tinham história de angioplastia transluminal percutânea coronariana (PTCA) e 10 (21%) de cirurgia de revascularização miocárdica (CRVM).

Dentre as principais variáveis hemodinâmicas, foram observados níveis pressóricos normais, com valores médios de pressão arterial. sistólica (PAS) de 118 ± 19 mmHg, pressão arterial diastólica (PAD) de 69 ± 11 mmHg e frequência cardíaca média de 77 ± 16 bpm. A maioria dos pacientes se encontrava em ar ambiente (72%) e a leitura da temperatura corporal foi de $36 \pm 1^\circ\text{C}$.

Uma pouco menos da metade dos pacientes (21/47, 43%) fazia uso de bloqueadores de receptor da angiotensina ou inibidores do receptor da angiotensina, 4/47 (51%) usavam aspirina regularmente, 11/47 (23%) usavam clopidogrel, e a grande maioria dos pacientes (83%) fazia uso de heparina não fracionada.

Durante a doença, 18/46 (38%) dos pacientes receberam antibióticos, e 45/47 (96%) estavam em uso de corticoide.

Em relação às análises laboratoriais, cabe ressaltar a média da proteína C-reativa de $7,6 \pm 8,8$ mg/dL (normal inferior a 0,3 mg/dL), do D-Dímero de 1648 ± 1327 ng/mL (normal inferior a 500 ng/mL), e da ferritina de 619 ± 64 ng/mL (normal 30 a 300 ng/mL).

A fração de ejeção prévia à avaliação da função microvascular foi analisada, encontrando-se a média de $49,8 \pm 15,7\%$. Apenas 9 (19%) pacientes tinham a fração de ejeção $<35\%$, 16 (34%) entre 35-55% e 22 (46%) pacientes tinham fração de ejeção $>55\%$ pelo método de Simpson. Dos pacientes que foram a óbito na fase

aguda, 7 foram por insuficiência respiratória aguda / infecção pelo coronavírus e apenas 1 paciente por choque cardiogênico.

O grupo de voluntários saudáveis (n=14), que se constituiu no grupo-controle, também foi avaliado com LDPM. A média de idade do grupo de voluntários foi $56,3 \pm 9,6$ anos e o sexo masculino correspondeu a 6 (43%) indivíduos. Dentre as variáveis hemodinâmicas analisadas neste grupo, foram observados valores médios dos níveis pressóricos de PAS: 133 ± 22 mmHg, PAD: 80 ± 9 mmHg e frequência cardíaca (FC): 98 ± 11 bpm.

6.1.1 Avaliação da função microvascular

A Figura 5 mostra os efeitos da LTH no fluxo microvascular cutâneo e reatividade em pacientes com COVID-19 leve a moderada (M-COVID) ou grave (S-COVID) e voluntários saudáveis: (A) Fluxo microvascular cutâneo basal; (B) Fluxo microvascular máximo durante LTH e (C) aumento percentual no fluxo microvascular induzido por LTH (da linha de base ao fluxo microvascular de pico).

Os valores estão expressos em diagramas de caixa, onde a linha central denota o valor mediano; a caixa contém os percentis 25 a 75 do conjunto de dados e as linhas extremas indicam os valores máximo e mínimo. Os resultados foram analisados usando ANOVA de uma via.

A avaliação do fluxo microvascular e reatividade (Figura 5A) mostrou que o fluxo basal foi semelhante entre os pacientes M-COVID e voluntários saudáveis ($p=0,69$), mas foi maior nos pacientes S-COVID do que nos voluntários saudáveis ($p=0,005$) e pacientes com M-COVID ($p=0,01$; Figura 5A).

A resposta vasodilatadora microvascular de pico induzida por LTH foi marcadamente diminuída em ambos os grupos de pacientes (M-COVID, $p=0,001$; S-COVID, $p<0,0001$) em comparação com o grupo de voluntários saudáveis (Figura 5B). O fluxo durante a LTH tendeu a ser menor nos pacientes S-COVID do que nos pacientes M-COVID ($p=0,09$). Finalmente, os aumentos percentuais no fluxo microvascular, desde a linha de base até o pico de fluxo durante a LTH, também foram significativamente reduzidos em ambos os grupos de pacientes (M-COVID, $p<0,0001$; S-COVID, $p<0,0001$) em comparação com o grupo de voluntários saudáveis (Figura 5C).

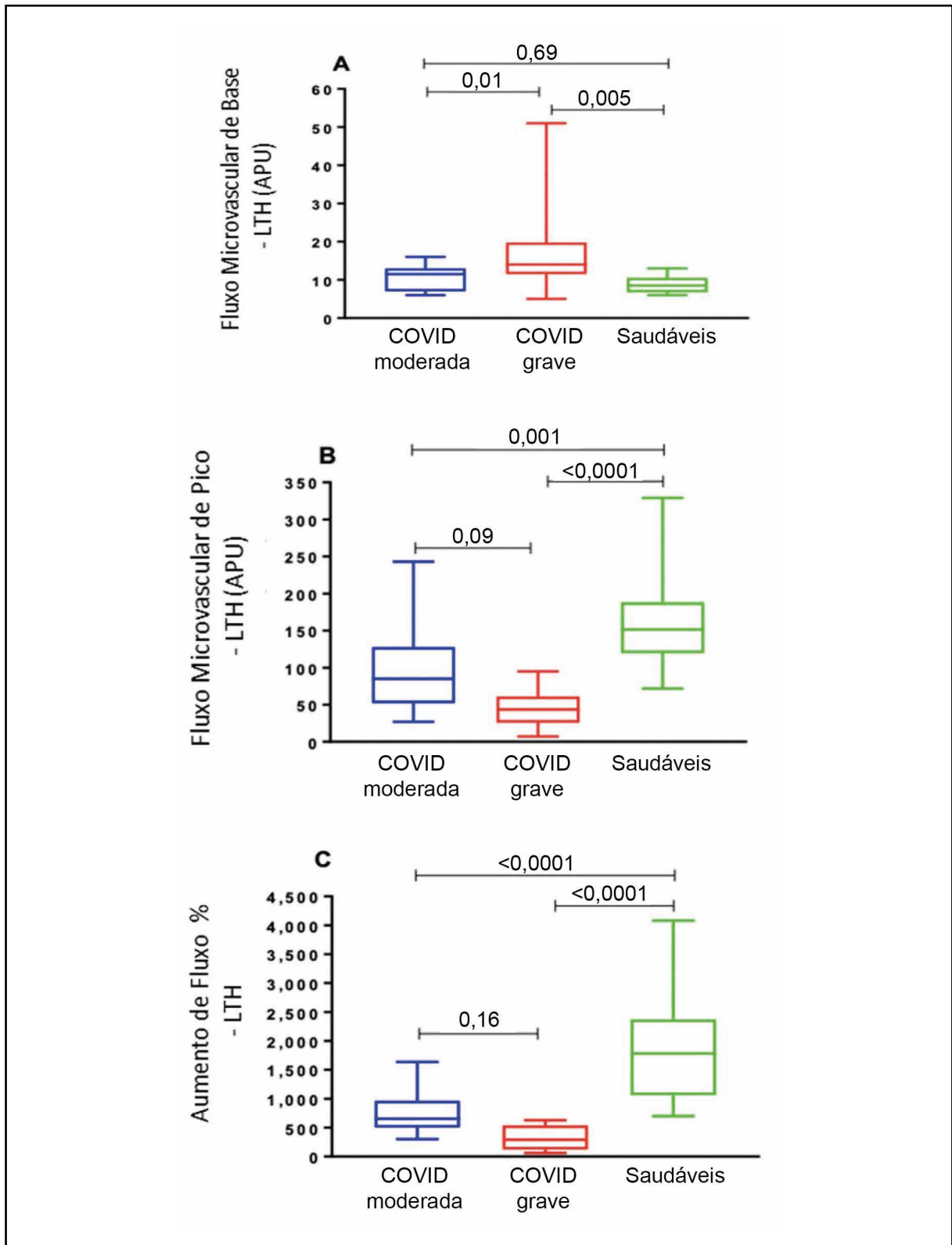


Figura 5 – Efeitos da LTH no fluxo microvascular cutâneo e reatividade em pacientes com COVID-19

Em A: Fluxo microvascular cutâneo basal

Em B: Fluxo microvascular máximo durante LTH

Em C: Aumento percentual induzido por LTH (da linha de base ao fluxo microvascular de pico)

Legenda: LTH – hiperemia térmica local

6.2 Fase Tardia: características clínicas e demográficas dos pacientes

Durante a fase de acompanhamento, os pacientes foram recrutados de forma ambulatorial, preferencialmente em datas que coincidisse com consultas ambulatoriais já previamente agendadas, 12-15 meses após a primeira análise do estudo, tendo sido reanalisados 20 pacientes após a recuperação da COVID-19. A média de idade foi $57,3 \pm 16,5$ anos e 44% eram do sexo masculino.

Dentre as principais variáveis hemodinâmicas, foram observados níveis pressóricos normais, com valores médios de PAS: 117 ± 20 mmHg, PAD: 72 ± 10 mmHg, PAM: 87 ± 13 mmHg, e FC: 79 ± 16 bpm.

Pouco menos da metade dos pacientes 8 (44,4%) fazia uso de bloqueadores de receptor da angiotensina ou inibidores do receptor da angiotensina; a grande maioria estava em uso de betabloqueador [n=13 (7,2)]; 4 (22,2) faziam uso de bloqueador de canal de cálcio; mais da metade [n=10 (55,5)] fazia uso de diuréticos e estatinas; 8 (44,4%) pacientes usavam aspirina regularmente.

Os níveis plasmáticos de proteína C-reativa de alta sensibilidade dos pacientes foram: 0,2 (0,2-0,4) mg/L, observando-se então expressiva queda em relação aos valores da fase aguda ($p=0,0001$; Figura 6).

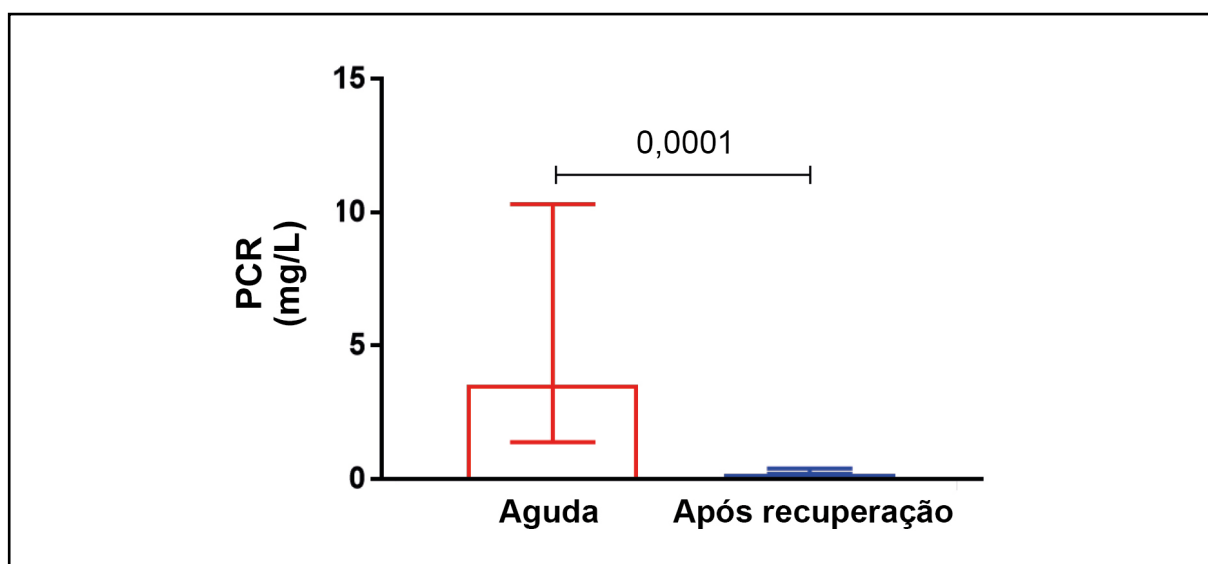


Figura 6 – Níveis sanguíneos de proteína C-reativa na fase aguda e no seguimento

Nota: Fase aguda em vermelho: 3,55 [1,4-10,3] mg/L; Seguimento (após 12-15 meses) em azul: 0,2 [0,2-0,4] mg/L

Legenda: PCR – proteína C-reativa

A Tabela 2 mostra as características demográficas e clínicas dos pacientes após a recuperação.

Tabela 2: Características clínicas dos pacientes após recuperação

Características	(n=20)
Sexo masculino n (%)	8 (44)
Idade (anos) média±DP	57,3 ± 16,5
Peso (kg) média±DP	75 ± 14
Índice de massa corpórea (kg\m ²) média±DP	26,3 ± 5,1
Pressão arterial sistólica (mmHg) média±DP	117 ± 20
Pressão arterial diastólica (mmHg) média±DP	72 ± 10
Pressão arterial média (mmHg) média±DP	87 ± 13
Frequência cardíaca (bpm) média±DP	79 ± 16
Hipertensão arterial sistêmica n (%)	13 (72,2)
Diabetes mellitus n (%)	6 (33,3)
Dislipidemia n (%)	5 (27,7)
Tabagismo n (%)	6 (33,3)
Doença arterial coronariana n (%)	8 (44,4)
Valvulopatia n (%)	6 (33,3)
Medicamentos	
Bloqueadores do sistema renina-angiotensina-aldosterona n (%)	8 (44,4)
Betabloqueador n (%)	13 (72,2)
Bloqueador do canal de cálcio n (%)	4 (22,2)
Vasodilatador direto n (%)	1 (5,5)
Nitrato n (%)	1 (5,5)
Diurético n (%)	10 (55,5)
Estatina n (%)	10 (55,5)
Hipoglicemiante oral n (%)	1 (5,5)
Insulina n (%)	6 (33,3)
Agente antiplaquetário n (%)	8 (44,4)

6.2.1 Sintomas na fase tardia

Durante a convocação para a análise da função microvascular na fase de seguimento, os pacientes foram questionados sobre a persistência de sintomas por mais de três a quatro semanas após o início dos sintomas de COVID-19, sendo caracterizado por uma combinação de sintomas inespecíficos, mais comumente: fadiga, dispneia, cefaleia, tosse, perda contínua do olfato, dor torácica, dor musculoesquelética, alterações cognitivas, distúrbios do sono, ansiedade e intolerância ao exercício.

Dos 20 pacientes analisados, 13 relataram persistência de sintomas tardios, sendo eles: fraqueza muscular (3/20), alteração de memória (5/20), insônia (2/20), alopecia (3/20), dores crônicas (3/20), alteração do olfato (1/20) e zumbido (1/20). Dentre os pacientes com queixas de sintomas tardios, 46% (6/13) relataram ter mais de um sintoma (Figura 7).

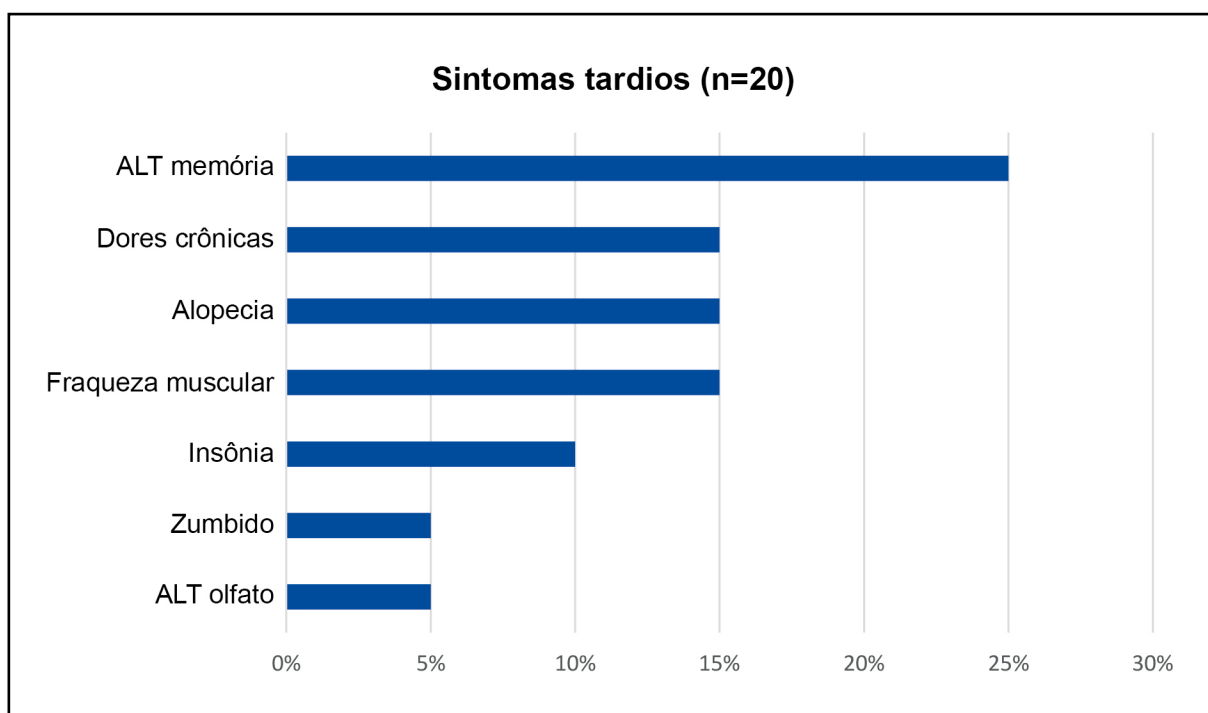


Figura 7 – Frequência de sintomas tardios nos pacientes recuperados

Legenda: ALT – alteração

A análise comparativa entre as curvas da função microvascular sistêmica, na fase de seguimento, dos pacientes com persistência de sintomas e os pacientes sem sintomas, não mostrou diferença estatística significativa entre os dois subgrupos (Figura 8).

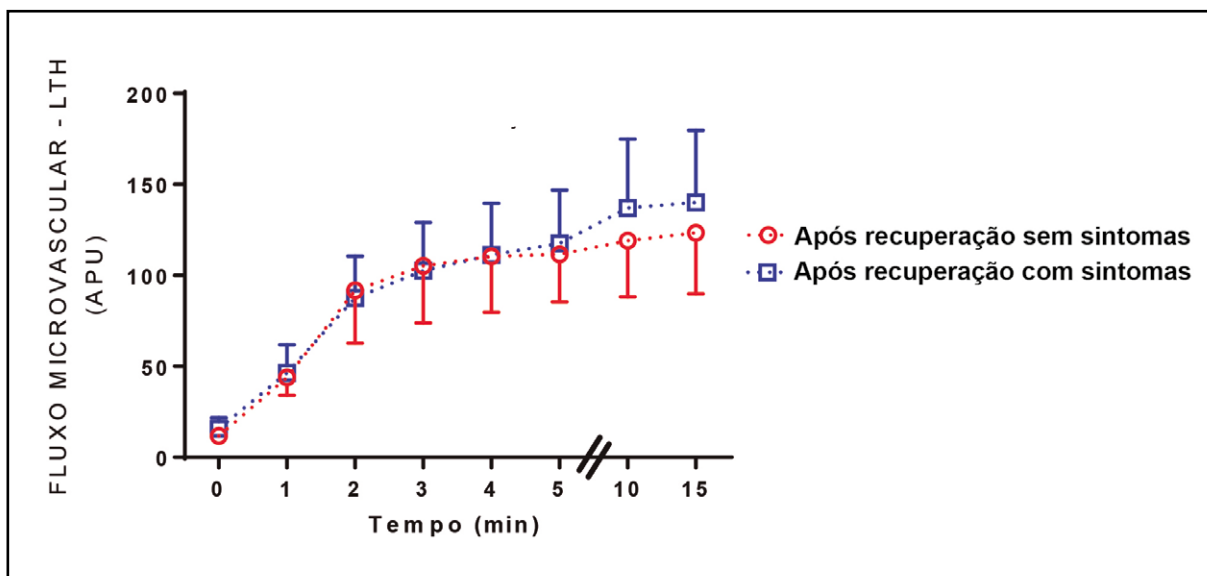


Figura 8 – Análise comparativa entre pacientes com e sem sintomas no seguimento após recuperação

Legenda: LTH – hiperemia térmica local

6.2.2 Avaliação da função microvascular

Os valores discrepantes dos parâmetros microvasculares de dois pacientes foram excluídos da análise, com base no método ROUT.

Uma primeira análise foi realizada entre os voluntários saudáveis, os pacientes em fase aguda e os pacientes após recuperação.

A Figura 9 mostra os efeitos da hiperemia térmica local (LTH) no fluxo microvascular cutâneo e reatividade nos pacientes estudados na fase aguda de COVID-19 (AGUDA), 12-15 meses após a recuperação (Pós-COVID-19) e em voluntários saudáveis: (A) curso de tempo de vasodilatação microvascular; (B) áreas sob as curvas de vasodilatação microvascular; e (C) pico de fluxo microvascular durante a HTL.

A avaliação da reatividade microvascular dependente do endotélio mostrou que a vasodilatação induzida pela LTH aumentou significativamente após a recuperação em comparação com os valores obtidos durante a fase aguda da COVID-19, e foi semelhante à dos voluntários saudáveis (Figura 9A).

Consequentemente, as AUC de vasodilatação aumentaram significativamente após a recuperação (95,415 (75,552-121,399) vs. 57,555 (40,509-78,310) APU/mmHg/s) ($p=0,009$), mas não foram diferentes dos valores obtidos em voluntários saudáveis [111,745 (78,112) -123,754) APU/mmHg/s, $p=0,85$], Figura 9B).

O pico de fluxo microvascular durante a LTH também foi significativamente aumentado [116,5 (96,5-144,5) vs. 84 (61,2-140,5) APU ($p=0,02$), mas não diferente dos valores obtidos em voluntários saudáveis [145,5 (119-173,3) APU, $p=0,55$; Figura 9C].

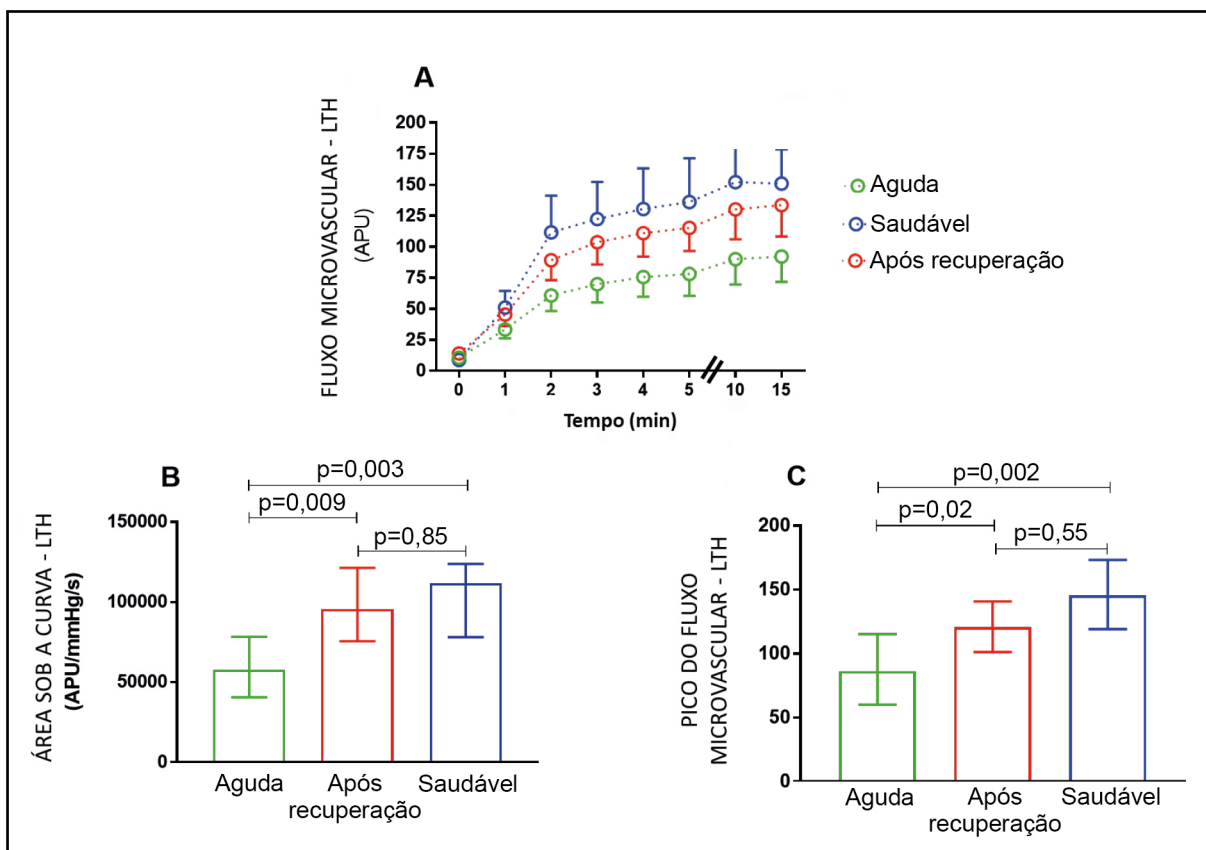


Figura 9 – Efeitos da LTH no fluxo microvascular cutâneo na fase aguda e após recuperação dos pacientes e nos voluntários saudáveis

Em A: Curso de tempo de vasodilatação microvascular

Em B: Áreas sob as curvas de vasodilatação microvascular

Em C: Pico de fluxo microvascular durante HTL

Legenda: LTH – hiperemia térmica local

Finalmente, os valores basais do fluxo microvascular não foram diferentes entre o período de recuperação e a fase aguda [12,5 (8,7-16) vs. 9,5 (7-12,7) APU; $p=0,52$] ou comparados com os de voluntários saudáveis [8,5 (6,7-10,5) APU; $p=0,08$].

A Figura 10 mostra os efeitos da hiperemia térmica local (LTH) no fluxo microvascular cutâneo e reatividade nos pacientes estudados na fase aguda de COVID-19 (AGUDA) e após a recuperação (Pós-COVID-19).

A avaliação da reatividade microvascular dependente do endotélio mostrou que a vasodilatação induzida pela LTH foi significativamente aumentada após a recuperação, quando comparada com os valores obtidos durante a fase aguda da COVID-19 (Figura 10A).

Assim, as áreas sob as curvas de vasodilatação aumentaram significativamente após a recuperação ($103,901 \pm 39,114$ vs. $62,240 \pm 31,823$ APU/mmHg/s; $p=0,0006$; Figura 10B).

O fluxo microvascular médio durante a LTH também aumentou significativamente [$116,5$ ($96,5-144,5$) vs. 84 ($61,2-140,5$) APU; $p=0,01$; Figura 10C). Por fim, os valores basais de fluxo microvascular não foram diferentes entre o período de recuperação e a fase aguda [$12,5$ ($8,7-16$) vs. $9,5$ ($7-12,7$) APU; $p=0,39$).

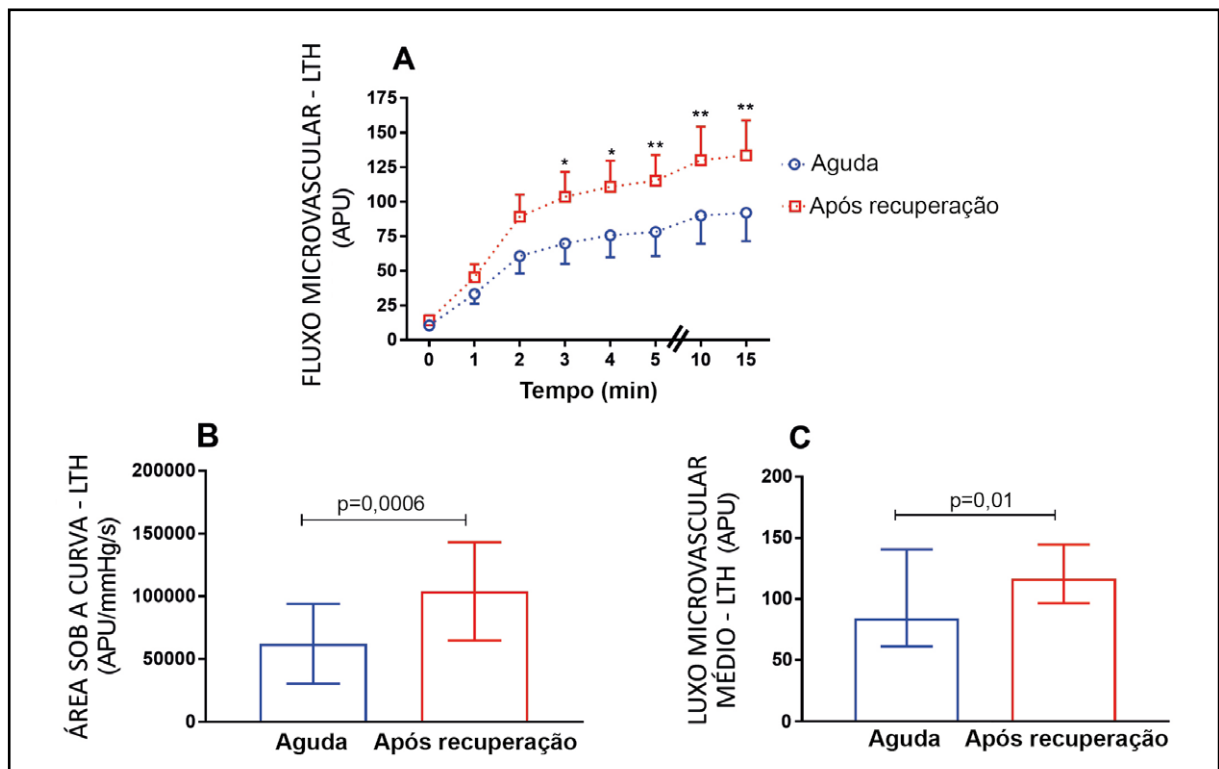


Figura 10 – Efeitos da LTH no fluxo microvascular cutâneo na fase aguda e após recuperação dos pacientes

Em A: Curso de tempo de vasodilatação microvascular

Em B: Áreas sob as curvas de vasodilatação microvascular

Em C: Fluxo microvascular médio

Legenda: LTH – hiperemia térmica local

7 DISCUSSÃO

A disfunção microvascular e o papel do endotélio vascular têm sido cada vez mais implicados na síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) e no impacto sistêmico da infecção por SARS-CoV-2. As células endoteliais são cruciais na regulação da homeostase vascular, prevenindo a coagulação, controlando o fluxo sanguíneo e regulando o estresse oxidativo e as reações inflamatórias.^{86,87}

Este estudo procurou avaliar, através de fluxometria *laser* Doppler (LDPM), a presença de alterações microvasculares sistêmicas em pacientes com COVID-19, hospitalizados em hospital de cardiologia do Rio de Janeiro, inicialmente na fase aguda da doença e, posteriormente, 12 a 15 meses após a recuperação.

Na população deste estudo, a maioria dos pacientes era do sexo masculino (57%), com média de idade 60 ± 14 anos, de forma semelhante a outras séries, como a de estudo chinês,⁸⁴ na qual a população tinha entre 30-69 anos (77,8%), e 51,4% eram do sexo masculino.^{84,85}

O IMC foi $25,4 \pm 3$ kg/m², demonstrando não ser um grupo com obesidade, o que poderia aumentar a chance de alterações da função endotelial.^{63,85}

A população estudada foi composta por pacientes com cardiopatias diversas, principalmente coronariopatias (70%) e valvulopatias (28%), e variadas comorbidades, como diabetes e hipertensão arterial.

De fato, HAS foi encontrada em 38 (81%) pacientes, diabetes em 22 (47%), dislipidemia em 17 (36%), história familiar em 6 (13%) e tabagismo em 14 (30%) pacientes. No estudo de Richardson et al.,⁸⁵ as comorbidades mais comuns foram hipertensão (56,6%), obesidade (41,7%) e diabetes (33,8%).

É importante ressaltar que a existência de condições patológicas subjacentes no momento da infecção pelo SARS-CoV-2 poderia ocasionar um viés na avaliação da associação entre as alterações microvasculares sistêmicas e a infecção pelo novo coronavírus. Todavia, a reavaliação tardia desses pacientes possibilitou reduzir esse viés, uma vez que, persistindo as doenças e comorbidades de base, a resolução das alterações microvasculares pode ser atribuída à ausência da infecção (COVID-19) ativa.

Há evidências crescentes de envolvimento vascular na patogênese da COVID-19 grave, com exames de imagem revelando anormalidades de perfusão no cérebro de pacientes com COVID-19, mostrando problemas neurológicos⁸⁸ além de anormalidades de perfusão nos pulmões de COVID-19 pacientes com pneumonia.⁸⁹

Relato de caso publicado por esta equipe de pesquisadores, logo após o início do estudo, demonstrou que uma mulher jovem com COVID-19, doença valvar cardíaca e esferocitose, apresentou importante disfunção microvascular durante a fase aguda da COVID-19, com melhora após a recuperação clínica e laboratorial, paralela à melhora da inflamação sistêmica e envolvimento pulmonar.⁹⁰ Interessante notar que a avaliação da função endotelial na COVID-19 sugere que não apenas indivíduos com comorbidades, mas também jovens sem qualquer comorbidade, podem ter a função endotelial afetada, conforme demonstrado.⁹¹ O seu relato de caso, com diferentes técnicas de avaliação de reatividade vascular, demonstrou que, numa mulher de 24 anos com infecção por COVID-19, a dilatação mediada por fluxo e por nitroglicerina encontravam-se reduzidas, e medições repetidas uma semana após a infecção revelaram melhora de todos os parâmetros.⁹¹

A disfunção da célula endotelial tem sido descrita como uma característica central da COVID-19. A apoptose de células endoteliais é um possível mecanismo pelo qual o endotélio pode se tornar disfuncional na vigência de infecção por COVID-19.⁷⁸ Além disso, a inflamação sistêmica pode ser responsável por anormalidades da função endotelial⁹² através da ação de citocinas circulantes e espécies reativas de oxigênio. Um exemplo é a sepse, na qual a liberação de mediadores inflamatórios e moléculas reativas para destruir patógenos pode, em última instância, causar dano endotelial.⁹³ A resposta inflamatória, impulsionada por várias citocinas, incluindo aquelas originadas de adipócitos perivasculares, pode agravar a disfunção endotelial por meio do desacoplamento endotelial da síntese do óxido nítrico e da produção de espécies reativas de oxigênio, interferindo na resposta vasodilatadora dependente do endotélio.⁹⁴

No presente trabalho, a avaliação do fluxo microvascular e reatividade na fase aguda da doença demonstrou que o fluxo basal foi semelhante entre os pacientes com COVID-19 moderada e voluntários saudáveis, mas foi maior nos pacientes com COVID-19 grave. Tais achados foram descritos em estudo deste grupo,⁹⁵ que mostrou ainda que os níveis de citocinas e quimiocinas séricas, envolvidas na regulação da função vascular e da inflamação, estão aumentados em pacientes com COVID-19 grave em comparação com aqueles com doença não grave.

A resposta vasodilatadora microvascular de pico induzida por hiperemia térmica local foi marcadamente diminuída em ambos os grupos de pacientes com COVID-19 em comparação com o grupo de voluntários saudáveis, e o fluxo durante a LTH tendeu a ser menor nos pacientes COVID-19 grave do que nos pacientes COVID-19 moderada.

Rovas et al.⁹⁶ demonstraram também alterações microvasculares em pacientes com COVID-19 moderada a grave com uma redução de até 90% na densidade vascular, especialmente, os pacientes graves em ventilação mecânica.⁹⁶ Com o uso de iontoforese de acetilcolina,⁹⁷ pacientes moderados a graves com COVID-19 mostraram uma reatividade endotelial prejudicada. Da mesma forma,⁹⁸ relataram prejuízo na reatividade microvascular, usando espectroscopia no infravermelho, em pacientes com COVID-19 em comparação com controles saudáveis, o que foi associado à gravidade da síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA).

Segundo Bourcier et al.⁹⁹ e Dumas et al.¹⁰⁰ as alterações microvasculares estão fortemente associadas à mortalidade e falência de órgãos na sepse e choque séptico. Cabe ressaltar que todos os pacientes com COVID-19 grave (e com as maiores alterações da resposta vasodilatadora da microcirculação) desta amostra evoluíram para óbito durante a internação. Assim, tendo em vista que a presença e a intensidade das alterações microvasculares sistêmicas durante a fase aguda da COVID-19 podem estar relacionadas à evolução e ao prognóstico da doença, deve-se destacar a importância da avaliação da reatividade microvascular nesses pacientes.

A avaliação da reatividade microvascular dependente do endotélio mostrou que a vasodilatação induzida por hiperemia térmica local aumentou significativamente após a recuperação em comparação com os valores obtidos durante a fase aguda da COVID-19, e foi semelhante aos controles saudáveis. O pico de fluxo microvascular durante a hiperemia térmica local também foi significativamente aumentado, mas não diferente dos valores obtidos em voluntários saudáveis. Por fim, os valores basais do fluxo microvascular não foram diferentes entre o período de recuperação e a fase aguda ou comparados com os de voluntários saudáveis.

A disfunção endotelial persistente foi demonstrada após a recuperação da COVID-19 em alguns estudos.¹⁰¹ Chioh et al.¹⁰² encontraram níveis elevados de células endoteliais circulantes, um biomarcador de lesão vascular, em pacientes que se recuperaram de COVID-19, especialmente naqueles com condições preexistentes, como hipertensão ou diabetes.

É possível hipotetizar que a disfunção microvascular sistêmica possa ocorrer em pacientes com COVID-19, paralelamente ao estado inflamatório da doença, apresentando melhora no seguimento a longo prazo. Durante o seguimento de longo prazo, 65% dos pacientes aqui estudados relataram persistência de sintomas, mais comumente: fadiga, dispneia, cefaleia, tosse, perda do olfato, dor torácica, dor musculoesquelética, alterações cognitivas, distúrbios do sono, ansiedade e intolerância ao exercício. Dentre os pacientes com queixas de sintomas tardios,

46% (6/13) relataram ter mais de um sintoma. Esse resultado se compara aos achados de Charfeddine et al.,¹⁰³ que relataram que 77,4% dos pacientes estudados apresentaram persistência de sintomas tardios, sendo os principais: fadiga, dispneia, dor torácica, dor articular, palpitação, anosmia e disgeusia, perda de cabelo, sintomas cognitivos e dificuldades neurocognitivas.

Com o aumento do conhecimento sobre a COVID-19 e a descrição da COVID longa,³⁷⁻³⁹ surgiu a hipótese de que sintomas e manifestações clínicas de longo prazo poderiam ser devidos à disfunção endotelial persistente.¹⁰³ No estudo de Charffedine et al.¹⁰³ houve associação entre sintomas persistentes e a presença de alterações microcirculatórias. Por outro lado, no presente trabalho, reatividade microvascular dependente do endotélio não foi significativamente diferente entre os grupos de sintomáticos e sem sintomas tardios. O pequeno número de pacientes avaliados, bem como diferenças entre métodos de avaliação microcirculatória são possíveis razões para explicar tal diferença.

De fato, características da amostra, como o número reduzido e a presença de cardiopatias podem ser vistas como limitações do estudo. Entretanto, este pode servir para ressaltar a importância da avaliação da reatividade microvascular nos pacientes com COVID-19, tendo em vista que a presença e a intensidade das alterações microvasculares sistêmicas durante a fase aguda da COVID-19 podem estar relacionadas à evolução e ao prognóstico da doença.

8 CONCLUSÕES

- Pacientes com COVID-19 grave ou moderada apresentaram disfunção endotelial microvascular sistêmica.
- Doze a quinze meses após a fase aguda da COVID-19, observou-se melhora das respostas vasodilatadoras microvasculares dependentes do endotélio.
- Na fase aguda, a resposta vasodilatadora microvascular de pico induzida por hiperemia térmica local foi marcadamente diminuída em ambos os grupos de pacientes com COVID-19 (moderada e grave), em comparação com o grupo de voluntários saudáveis.
- Na fase tardia, a avaliação da reatividade microvascular dependente do endotélio mostrou que a vasodilatação induzida pela hiperemia térmica local aumentou significativamente após a recuperação em comparação com os valores obtidos durante a fase aguda da COVID-19, e foi semelhante à dos controles saudáveis.
- Indivíduos com sintomas tardios (12 a 15 meses após a infecção) não apresentaram diferença da resposta microvascular dependente do endotélio quando comparados aos pacientes sem sintomas.

REFERÊNCIAS

1. Chan JF, Kok KH, Zhu Z, Chu H, To KK, Yuan S, et al. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerg Microbes Infect.* 2020;9(1):221-36. Erratum in: *Emerg Microbes Infect.* 2020;9(1):540.
2. Fehr AR, Perlman S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods Mol Biol.* 2015;1282:1-23.
3. Kreutz R, Algharably EAE, Azizi M, Dobrowolski P, Guzik T, Januszewicz A, et al. Hypertension, the renin–angiotensin system, and the risk of lower respiratory tract infections and lung injury: implications for COVID-19. *Cardiovasc Res.* 2020;116(10):1688-99.
4. Liu PP, Blet A, Smyth D, Li H. The science underlying COVID-19: implications for the cardiovascular system. *Circulation.* 2020;142(1):68-78.
5. Ciceri F, Beretta L, Scandroglio AM, Colombo S, Landoni G, Ruggeri A, et al. Microvascular COVID-19 lung vessels obstructive thromboinflammatory syndrome (MicroCLOTS): an atypical acute respiratory distress syndrome working hypothesis. *Crit Care Resusc.* 2020;22(2):95-7.
6. Boisramé-Helms J, Kremer H, Schini-Kerth V, Meziani F. Endothelial dysfunction in sepsis. *Curr Vasc Pharmacol.* 2013;11(2):150-60.
7. Nencioni A, Trzeciak S, Shapiro NI. The microcirculation as a diagnostic and therapeutic target in sepsis. *Intern Emerg Med.* 2009;4(5):413-8.
8. Bikdeli B, Madhavan MV, Jimenez D, Chuich T, Dreyfus I, Driggin E, et al. COVID-19 and thrombotic or thromboembolic disease: implications for prevention, antithrombotic therapy, and follow-up: JACC state-of-the-art review. *J Am Coll Cardiol.* 2020;75(23):2950-73.
9. Francischetti EA, Tibiriçá E, Silva EG, Rodrigues E, Celoria BM, Abreu VG. Skin capillary density and microvascular reactivity in obese subjects with and without metabolic syndrome. *Microvasc Res.* 2011;81(3):325-30.
10. Gomes MB, Matheus AS, Tibiriçá E. Evaluation of microvascular endothelial function in patients with type 1 diabetes using laser-Doppler perfusion monitoring: which method to choose? *Microvasc Res.* 2008;76(2):132-3.
11. Holowatz LA, Thompson-Torgerson CS, Kenney WL. The human cutaneous circulation as a model of generalized microvascular function. *J Appl Physiol.* 2008;105(1):370-2.
12. Ince C, Mayeux PR, Nguyen T, Gomez H, Kellum JA, Ospina-Tascón GA, et al. The endothelium in sepsis. *Shock.* 2016;45(3):259-70.

13. World Health Organization. [Internet]. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. 2022. [cited 2022 Jan 10]. Available from: <<https://covid19.who.int>>
14. Sreepadmanabh M, Sahu AK, Chande A. COVID-19: advances in diagnostic tools, treatment strategies, and vaccine development. *J Biosci*. 2020;45(1):148.
15. Umakanthan S, Sahu P, Ranade AV, Bukelo MM, Rao JS, Abrahao-Machado LF, et al. Origin, transmission, diagnosis and management of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Postgrad Med J*. 2020;96(1142):753-8.
16. Sharma A, Ahmad Farouk I, Lal SK. COVID-19: A review on the novel coronavirus disease evolution, transmission, detection, control and prevention. *Viruses*. 2021;13(2):202.
17. To KK, Sridhar S, Chiu KH, Hung DL, Li X, Hung IF, et al. Lessons learned 1 year after SARS-CoV-2 emergence leading to COVID-19 pandemic. *Emerg Microbes Infect*. 2021;10(1):507-35.
18. Anka AU, Tahir MI, Abubakar SD, Alsabbagh M, Zian Z, Hamedifar H, et al. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): an overview of the immunopathology, serological diagnosis and management. *Scand J Immunol*. 2021;93(4):e12998.
19. Seyed Hosseini E, Riahi Kashani N, Nikzad H, Azadbakht J, Hassani Bafrani H, Haddad Kashani H. The novel coronavirus Disease-2019 (COVID-19): Mechanism of action, detection and recent therapeutic strategies. *Virology*. 2020;551:1-9.
20. Wang F, Kream RM, Stefano GB. Long-term respiratory and neurological sequelae of COVID-19. *Med Sci Monit*. 2020;26:e928996-1.
21. Dixit NM, Churchill A, Nsair A, Hsu JJ. Post-acute COVID-19 syndrome and the cardiovascular system: what is known? *Am Heart J Plus*. 2021;5:100025.
22. Ramakrishnan RK, Kashour T, Hamid Q, Halwani R, Tleyjeh IM. Unraveling the mystery surrounding post-acute sequelae of COVID-19. *Front Immunol*. 2021;12:686029.
23. Walitt B, Bartrum E. A clinical primer for the expected and potential post-COVID-19 syndromes. *Pain Rep*. 2021;6(1):e887.
24. Yong SJ. Long COVID or post-COVID-19 syndrome: putative pathophysiology, risk factors, and treatments. *Infect Dis (Lond)*. 2021;53(10):737-54.
25. Lopez-Leon S, Wegman-Ostrosky T, Perelman C, Sepulveda R, Rebolledo PA, Cuapio A, et al. More than 50 long-term effects of COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*. 2021;11(1):16144.
26. Wang C, Horby PW, Hayden FG, Gao GF. A novel coronavirus outbreak of global health concern. *Lancet*. 2020;395(10223):470-3. Erratum in: *Lancet*. 2020 Jan 29.

27. Torres-Castro R, Vasconcello-Castillo L, Alsina-Restoy X, Solis-Navarro L, Burgos F, Puppo H, et al. Respiratory function in patients post-infection by COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Pulmonology*. 2021;27(4):328-37.
28. Shaw B, Daskareh M, Gholamrezanezhad A. The lingering manifestations of COVID-19 during and after convalescence: update on long-term pulmonary consequences of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Radiol Med*. 2021;126(1):40-6.
29. Calabrese F, Pezzuto F, Fortarezza F, Hofman P, Kern I, Panizo A, et al. Pulmonary pathology and COVID-19: lessons from autopsy. The experience of European Pulmonary Pathologists. *Virchows Arch*. 2020;477(3):359-72.
30. Nuzzo D, Vasto S, Scalisi L, Cottone S, Cambula G, Rizzo M, et al. Post-acute COVID-19 neurological syndrome: a new medical challenge. *J Clin Med*. 2021;10(9):1947.
31. Pezzini A, Padovani A. Lifting the mask on neurological manifestations of COVID-19. *Nat Rev Neurol*. 2020;16(11):636-44.
32. Lukiw WJ, Pogue A, Hill JM. SARS-CoV-2 infectivity and neurological targets in the brain. *Cell Mol Neurobiol*. 2022;42(1):217-24.
33. Aghagoli G, Gallo Marin B, Katchur NJ, Chaves-Sell F, Asaad WF, Murphy SA. Neurological involvement in COVID-19 and potential mechanisms: a review. *Neurocrit care*. 2021;34(3):1062-71.
34. Ramadan MS, Bertolino L, Zampino R, Durante-Mangoni E; Monaldi Hospital Cardiovascular Infection Study Group. Cardiac sequelae after coronavirus disease 2019 recovery: a systematic review. *Clin Microbiol Infect*. 2021;27(9):1250-61.
35. Rogers JP, Chesney E, Oliver D, Pollak TA, McGuire P, Fusar-Poli P, et al. Psychiatric and neuropsychiatric presentations associated with severe coronavirus infections: a systematic review and meta-analysis with comparison to the COVID-19 pandemic. *Lancet Psychiatry*. 2020;7(7):611-27.
36. Aiyegbusi OL, Hughes SE, Turner G, Rivera SC, McMullan C, Chandan JS, et al. Symptoms, complications and management of long COVID: a review. *J R Soc Med*. 2021;114(9):428-42.
37. Nabavi N. Long COVID: how to define it and how to manage it. *BMJ*. 2020;370:m3489.
38. Office for National Statistics. [Internet]. Our World in Data. The prevalence of long COVID symptoms and COVID-19 complications. 2020. [cited 2021 Dec 9]. Available from: <https://www.ons.gov.uk/news/statementsandletters/theprevalenceoflongcovidssymptomsandcovid19complication>
39. d'Ettorre G, Gentilini Cacciola E, Santinelli L, De Girolamo G, Spagnolello O, Russo A, et al. Covid-19 sequelae in working age patients: a systematic review. *J Med Virol*. 2022;94(3):858-68.

40. Miranda DAP, Gomes SVC, Filgueiras PS, Corsini CA, Almeida NBF, Silva RA, et al. Long COVID-19 syndrome: a 14-months longitudinal study during the two first epidemic peaks in Southeast Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2022;trac030. [Epub ahead of print].
41. Petersen MS, Kristiansen MF, Hanusson KD, et al. Long COVID in the Faroe Islands: a longitudinal study among nonhospitalized patients. *Clin Infect Dis.* 2021;73(11):e4058–63.
42. Aird WC. Vascular bed-specific hemostasis: role of endothelium in sepsis pathogenesis. *Crit Care Med.* 2001;29(7 Suppl):S28-34.
43. Libby P, Lüscher T. COVID-19 is, in the end, an endothelial disease. *European Heart J.* 2020;41(32):3038-44.
44. Lorenzo S, Minson CT. Human cutaneous reactive hyperaemia: role of BKCa channels and sensory nerves. *J Physiol.* 2007;585(Pt 1):295-303.
45. Roustit M, Cracowski JL. Non-invasive assessment of skin microvascular function in humans: an insight into methods. *Microcirculation.* 2012;19(1):47-64.
46. Mateos EA. Assembling the physiopathology puzzle of COVID-19. *An Fac Cienc Med (Asunción).* 2020;53(2):105-26.
47. Kuo PC, Schroeder RA. The emerging multifaceted roles of nitric oxide. *Ann Surg.* 1995;221(3):220-35.
48. Loscalzo J. Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis. *Circ Res.* 2001;88(8):756-62.
49. Cooke JP, Singer AH, Tsao P, Zera P, Rowan RA, Billingham ME. Antiatherogenic effects of L-arginine in the hypercholesterolemic rabbit. *J Clin Invest.* 1992;90(3):1168-72.
50. Cooke JP, Tsao PS. Cytoprotective effects of nitric oxide. *Circulation.* 1993;88(5):2451-4.
51. Arndt H, Russell JB, Kurose I, Kubes P, Granger DN. Mediators of leukocyte adhesion in rat mesenteric venules elicited by inhibition of nitric oxide synthesis. *Gastroenterology.* 1993;105(3):675-80.
52. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(11):4651-5.
53. Tomazini LN, Novais de Andrade WH, Máximo LNC. Óxido nítrico: uma breve revisão sobre aspectos históricos, estrutura química e algumas aplicações relevantes para o corpo humano. *Multi-Sci J.* 2019;2(2):82-8.
54. Zweier JL, Li H, Samouilov A, Liu X. Mechanisms of nitrite reduction to nitric oxide in the heart and vessel wall. *Nitric Oxide.* 2010;22(2):83-90.

55. Iok FA, Kruip MJHA, van der Meer NJM, Arbous MS, Gommers DAMPJ, Kant KM, et al. Incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19. *Thromb Res.* 2020;191:145-7.
56. Llitjos JF, Leclerc M, Chochois C, Monsallier JM, Ramakers M, Auvray M, et al. High incidence of venous thromboembolic events in anticoagulated severe COVID-19 patients. *J Thromb Haemost.* 2020;18(7):1743-6.
57. Mouncey PR, Osborn TM, Power GS, Harrison DA, Sadique MZ, Grieve RD, et al. Trial of early, goal-directed resuscitation for septic shock. *N Engl J Med.* 2015;372(14):1301-11.
58. 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.
59. Trzeciak S, Dellinger RP, Parrillo JE, Guglielmi M, Bajaj J, Abate NL, et al. Early microcirculatory perfusion derangements in patients with severe sepsis and septic shock: relationship to hemodynamics, oxygen transport, and survival. *Ann Emerg Med.* 2007;49(1):88-98, 98.e1-2.
60. 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.
61. Massey MJ, Shapiro NI. A guide to human in vivo microcirculatory flow image analysis. *Crit Care.* 2016;20:35.
62. de Jongh RT, Serné EH, IJzerman RG, Jørstad HT, Stehouwer CD. Impaired local microvascular vasodilatory effects of insulin and reduced skin microvascular vasomotion in obese women. *Microvasc Res.* 2008;75(2):256-62.
63. De Lorenzo A, Escobar S, Tibiriçá E. Systemic endothelial dysfunction: a common pathway for COVID-19, cardiovascular and metabolic diseases. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2020;30(8):1401.
64. Roustit M, Blaise S, Millet C, Cracowski JL. Reproducibility and methodological issues of skin post-occlusive and thermal hyperemia assessed by single-point laser Doppler flowmetry. *Microvasc Res.* 2010;79(2):102-8.
65. Salgado MA, Salgado-Filho MF, Reis-Brito JO, Lessa MA, Tibirica E. Effectiveness of laser Doppler perfusion monitoring in the assessment of microvascular function in patients undergoing on-pump coronary artery bypass grafting. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2014;28(5):1211-6.
66. Bonaventura A, Vecchié A, Dagna L, Martinod K, Dixon DL, Van Tassell BW, et al. Endothelial dysfunction and immunothrombosis as key pathogenic mechanisms in COVID-19. *Nat Rev Immunol.* 2021;21(5):319-29.
67. Bernard I, Limonta D, Mahal LK, Hobman TC. Endothelium infection and dysregulation by SARS-CoV-2: evidence and caveats in COVID-19. *Viruses.* 2020;13(1):29.

68. Siddiqi HK, Libby P, Ridker PM. COVID-19 - a vascular disease. *Trends Cardiovasc Med.* 2021;31(1):1-5.
69. Iba T, Connors JM, Levy JH. The coagulopathy, endotheliopathy, and vasculitis of COVID-19. *Inflamm Res.* 2020;69(12):1181-9.
70. Amraei R, Rahimi N. COVID-19, renin-angiotensin system and endothelial dysfunction. *Cells.* 2020;9(7):1652.
71. Perico L, Benigni A, Casiraghi F, Ng LFP, Renia L, Remuzzi G. Immunity, endothelial injury and complement-induced coagulopathy in COVID-19. *Nat Rev Nephrol.* 2021;17(1):46-64.
72. Song WC, FitzGerald GA. COVID-19, microangiopathy, hemostatic activation, and complement. *J Clin Invest.* 2020;130(8):3950-3.
73. Messner CB, Demichev V, Wendisch D, Michalick L, White M, Freiwald A, et al. Ultra-high-throughput clinical proteomics reveals classifiers of COVID-19 infection. *Cell Syst.* 2020;11(1):11-24.e4.
74. Noris M, Benigni A, Remuzzi G. The case of complement activation in COVID-19 multiorgan impact. *Kidney Int.* 2020;98(2):314-22.
75. Teuwen LA, Geldhof V, Pasut A, Carmeliet P. COVID-19: the vasculature unleashed. *Nature Rev Immunol.* 2020;20(7):389-91. Erratum in: *Nat Rev Immunol.* 2020 Jun 4.
76. Evans PC, Rainger GE, Mason JC, Guzik TJ, Osto E, Stamataki Z, et al. Endothelial dysfunction in COVID-19: a position paper of the ESC Working Group for Atherosclerosis and Vascular Biology, and the ESC Council of Basic Cardiovascular Science. *Cardiovasc Res.* 2020;116(14):2177-84.
77. Del Turco S, Vianello A, Ragusa R, Caselli C, Basta G. COVID-19 and cardiovascular consequences: is the endothelial dysfunction the hardest challenge? *Thromb Res.* 2020;196:143-51.
78. Varga Z, Flammer AJ, Steiger P, Haberecker M, Andermatt R, Zinkernagel AS, et al. Endothelial cell infection and endothelitis in COVID-19. *Lancet.* 2020;395(10234):1417-8.
79. Marini JJ, Gattinoni L. Management of COVID-19 respiratory distress. *JAMA.* 2020;323(22):2329-30.
80. Wool GD, Miller JL. The impact of COVID-19 disease on platelets and coagulation. *Pathobiology.* 2021;88(1):15-27.
81. Martini R. The compelling arguments for the need of microvascular investigation in COVID-19 critical patients. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2020;75(1):27-34.
82. Norooznezhad AH, Mansouri K. Endothelial cell dysfunction, coagulation, and angiogenesis in coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Microvasc Res.* 2021;137:104188.

83. Guan WJ, Ni ZY, Hu Y, Liang WH, Ou CQ, He JX, et al. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *N Engl J Med*. 2020;382(18):1708-20.
84. Epidemiology Working Group for NCIP Epidemic Response, Chinese Center for Disease Control and Prevention. [The epidemiological characteristics of an outbreak of 2019 novel coronavirus diseases (COVID-19) in China]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*. 2020 Feb 10;41(2):145-151. Chinese. doi: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2020.02.003. PMID: 32064853.
85. Richardson S, Hirsch JS, Narasimhan M, Crawford JM, McGinn T, Davidson KW, et al. Presenting characteristics, comorbidities, and outcomes among 5700 patients hospitalized with COVID-19 in the New York City Area. *JAMA*. 2020;323(20):2052-9.
86. Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:803-15.
87. van Hinsbergh VW. Endothelium-role in regulation of coagulation and inflammation. *Semin Immunopathol*. 2012;34(1):93-106.
88. Helms J, Kremer S, Merdji H, Clere-Jehl R, Schenck M, Kummerlen C, et al. Neurologic features in severe SARS-CoV-2 infection. *N Engl J Med*. 2020;382(23):2268-70.
89. Liang W, Liang H, Ou L, Chen B, Chen A, Li C, et al. Development and validation of a clinical risk score to predict the occurrence of critical illness in hospitalized patients with COVID-19. *JAMA Intern Med*. 2020;180(8):1081-9.
90. Sabioni LR, Tibiriçá E, Lamas CC, Amorim GD, De Lorenzo A. Systemic microvascular dysfunction in COVID-19. *Am J Cardiovasc Dis*. 2020;10(4):386-91.
91. Jud P, Kessler HH, Brodmann M. Case Report: Changes of vascular reactivity and arterial stiffness in a patient with Covid-19 infection. *Front. Cardiovasc. Med*. 2021;8:671669.
92. Paulus WJ, Tschöpe C. A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(4):263-71.
93. 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.
94. Kim HW, Belin de Chantemèle EJ, Weintraub NL. Perivascular adipocytes in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2019;39(11):2220-7.
95. Sabioni L, De Lorenzo A, Lamas C, Muccillo F, Castro-Faria-Neto HC, Estado V, et al. Systemic microvascular endothelial dysfunction and disease severity in COVID-19 patients: evaluation by laser Doppler perfusion monitoring and cytokine/chemokine analysis. *Microvasc Res*. 2021;134:104119.

96. Rovas A, Osiaevi I, Buscher K, Sackarnd J, Tepasse PR, Fobker M, et al. Microvascular dysfunction in COVID-19: the MYSTIC study. *Angiogenesis*. 2021;24(1):145-57.
97. Tehrani S, Gille-Johnson P. Microvascular dysfunction in patients with critical COVID-19, a pilot study. *Shock*. 2021;56(6):964-8.
98. Mesquida J, Caballer A, Cortese L, Vila C, Karadeniz U, Pagliuzzi M, et al. Peripheral microcirculatory alterations are associated with the severity of acute respiratory distress syndrome in COVID-19 patients admitted to intermediate respiratory and intensive care units. *Crit Care*. 2021;25(1):381.
99. Bourcier S, Joffre J, Dubée V, Preda G, Baudel JL, Bigé N, et al. Marked regional endothelial dysfunction in mottled skin area in patients with severe infections. *Crit Care*. 2017;21(1):155.
100. Dumas G, Lavillegrand JR, Joffre J, Bigé N, de-Moura EB, Baudel JL, et al. Mottling score is a strong predictor of 14-day mortality in septic patients whatever vasopressor doses and other tissue perfusion parameters. *Crit Care*. 2019;23(1):211.
101. Gavriilaki E, Anyfanti P, Gavriilaki M, Lazaridis A, Douma S, Gkaliagkousi E. Endothelial dysfunction in COVID-19: lessons learned from coronaviruses. *Curr Hypertens Rep*. 2020;22(9):63.
102. Chioh FW, Fong SW, Young BE, Wu KX, Siau A, Krishnan S, et al. Convalescent COVID-19 patients are susceptible to endothelial dysfunction due to persistent immune activation. *Elife*. 2021;10:e64909.
103. Charfeddine S, Ibn Hadj Amor H, Jdidi J, Torjmen S, Kraiem S, Hammami R, et al. Long COVID 19 syndrome: is it related to microcirculation and endothelial dysfunction? Insights from TUN-EndCOV Study. *Front Cardiovasc Med*. 2021;8:745758.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA

Nome: _____

Sexo: Masculino () Feminino () Data Nascimento:/...../.....

Endereço: _____

Cidade: _____

Telefone: () _____

Email: _____

Título do Protocolo de Pesquisa: INVESTIGAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MICROCIRCULATORIAS SISTÊMICAS EM PACIENTES EM FASE AGUDA DA COVID-19: CORRELAÇÕES COM VARIÁVEIS CLÍNICAS E LABORATORIAIS E COM O PROGNÓSTICO.

Pesquisadores Responsáveis: Eduardo Tibiriçá (21) 99914-6075, Andrea de Lorenzo (21) 99531-6994, Letícia Sabioni (21) 99769-2555, no Instituto Nacional de Cardiologia.

Contatos do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Cardiologia:

Endereço: Rua das Laranjeiras 374, Laranjeiras, 22.240-002, Rio de Janeiro, 5º andar, telefone (21) 3037-2307, endereço eletrônico: cepinclaranjeiras@gmail.com.

Prezado (a),

Você está sendo convidado para participar de um estudo clínico. Antes de fornecer seu consentimento, solicitamos que você leia estas informações com atenção. É importante que você leia e compreenda os procedimentos propostos. Leve o tempo que for necessário para fazer todas as perguntas que você queira. O médico/equipe de estudo lhe explicará todas as palavras ou informações que não estejam claros para você.

Objetivos do estudo:

O objetivo do presente estudo é verificar, em pessoas com a doença do coronavírus, como está o funcionamento dos seus vasos sanguíneos.

Para a realização desse estudo o seguinte exame será realizado:

- Exame do funcionamento dos seus vasos sanguíneos superficiais da pele com uma técnica de luz laser, sendo que sua pele não vai ser perfurada, nenhuma substância será injetada e você não vai sentir nenhuma dor ou desconforto, apenas uma sensação de calor na pele. Uma pequena sonda vai ser colocada em contato com a sua pele e fixada com esparadrapo.

Riscos e inconveniências:

Não existem riscos significativos decorrentes das técnicas de estudo do funcionamento dos seus vasos sanguíneos da pele, apenas uma sensação de calor local durante 20 minutos.

Informações Adicionais

- Os seus dados obtidos durante o estudo são confidenciais e o acesso aos dados é exclusivo dos pesquisadores responsáveis pela pesquisa.
- O presente estudo não traz benefícios diretos para você. Ele tem a função de gerar conhecimentos sobre o funcionamento dos seus vasos sanguíneos, que serão úteis no diagnóstico e tratamento da doença causada pelo novo coronavírus (2019).

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: "Investigação das alterações microcirculatórias sistêmicas em pacientes em fase aguda da covid-19: correlações com variáveis clínicas e laboratoriais e com o prognóstico"

Os objetivos desta pesquisa são claros para mim. Do mesmo modo, estou ciente dos procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes.

Concordo voluntariamente na minha participação, sabendo que poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízos.

Este termo será assinado em 02 (duas) vias de igual teor, uma para o participante da pesquisa e outra para o responsável pela pesquisa.

As informações obtidas sobre você neste estudo só serão utilizados para os objetivos do presente estudo.

Rio de Janeiro, _____ / _____ / _____

Assinatura do Participante da Pesquisa

Assinatura do Responsável pela Pesquisa

Assinatura do Familiar do Representante Legal (paciente impossibilitado de assinar)

APÊNDICE B – TERMO DE COMPROMISSO DE UTILIZAÇÃO DE DADOS

Termo de Compromisso de Utilização de Dados (TCUD)

Eu, Letícia Roberto Sabioni, médica do Instituto Nacional de Cardiologia, no âmbito do projeto de pesquisa intitulado “AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MICROVASCULAR SISTÊMICA DE PACIENTES CARDIOPATAS NA FASE AGUDA DE COVID-19 E NO SEGMENTO DE LONGO PRAZO PÓS RECUPERAÇÃO.”, comprometo-me com a utilização dos dados contidos no banco de dados da pesquisa, a fim de obtenção dos objetivos previstos, e somente após receber a aprovação do sistema CEP-CONEP.

Comprometo-me a manter a confidencialidade dos dados coletados, bem como com a privacidade de seus conteúdos.

Esclareço que os dados a serem coletados se referem a pesquisa no período de 15/05/2020 a 28/11/2021.

Declaro entender que é minha a responsabilidade de cuidar da integridade das informações e de garantir a confidencialidade dos dados e a privacidade dos indivíduos que terão suas informações acessadas.

Também é minha a responsabilidade de não repassar os dados coletados ou o banco de dados em sua íntegra, ou parte dele, a pessoas não envolvidas na equipe da pesquisa.

Por fim, comprometo-me com a guarda, cuidado e utilização das informações apenas para cumprimento dos objetivos previstos nesta pesquisa aqui referida. Qualquer outra pesquisa em que eu precise coletar informações serão submetidas a apreciação do CEP/INC

Rio de Janeiro, 01/05/2020.

APÊNDICE C – ARTIGOS

Microvascular Research 134 (2021) 104119



Contents lists available at ScienceDirect

Microvascular Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ymvre



Systemic microvascular endothelial dysfunction and disease severity in COVID-19 patients: Evaluation by laser Doppler perfusion monitoring and cytokine/chemokine analysis

Letícia Sabioni^a, Andrea De Lorenzo^a, Cristiane Lamas^a, Fabiana Muccillo^a, Hugo Caire Castro-Faria-Neto^b, Vanessa Estado^b, Eduardo Tibirica^{a,*}

^a Instituto Nacional de Cardiologia, Ministério da Saúde, Rio de Janeiro, Brazil

^b Laboratório de Imunofarmacologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Laser Doppler perfusion monitoring
COVID-19
Endothelial dysfunction
Proinflammatory cytokines

ABSTRACT

Background: Microvascular dysfunction, serum cytokines and chemokines may play important roles in pathophysiology of coronavirus disease 2019 (COVID-19), especially in severe cases.

Methods: Patients with COVID-19 underwent non-invasive evaluation of systemic endothelium-dependent microvascular reactivity - using laser Doppler perfusion monitoring in the skin of the forearm - coupled to local thermal hyperemia. Maximal microvascular vasodilatation (44 °C thermal plateau phase) was used as endpoint. A multiplex biometric immunoassay was used to assess a panel of 48 serum cytokines and chemokines. Severe COVID-19 (S-COVID) was defined according to WHO criteria, while all other cases of COVID-19 were considered mild to moderate (M-COVID). A group of healthy individuals who tested negative for SARS-CoV-2 served as a control group and was also evaluated with LDPM.

Results: Thirty-two patients with COVID-19 (25% S-COVID) and 14 controls were included. Basal microvascular flow was similar between M-COVID and controls ($P = 0.69$) but was higher in S-COVID than in controls ($P = 0.005$) and M-COVID patients ($P = 0.01$). The peak microvascular vasodilator response was markedly decreased in both patient groups (M-COVID, $P = 0.001$; S-COVID, $P < 0.0001$) compared to the healthy group. The percent increases in microvascular flow were markedly reduced in both patient groups (M-COVID, $P < 0.0001$; S-COVID, $P < 0.0001$) compared to controls. Patients with S-COVID had markedly higher concentrations of dissimilar proinflammatory cytokines and chemokines, compared to patients with M-COVID.

Conclusions: In patients with COVID-19, especially with S-COVID, endothelium-dependent microvascular vasodilator responses are reduced, while serum cytokines and chemokines involved in the regulation of vascular function and inflammation are increased.

Abbreviations: β -NGF, nerve growth factor; CCL2/MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; CCL3/MIP-1 α , human macrophage inflammatory protein-1- α ; CCL4/MIP-1 β , macrophage inflammatory protein-1 β ; CCL5/RANTES, regulated upon activation normal T cell expressed and secreted; CCL7/MCP-3, monocyte-specific chemokine-3; CCL24/CTACK, cutaneous T cell-attracting chemokine; COVID-19, coronavirus disease 2019; CXCL10/IP-10, IFN- γ -inducible protein-10; LDPM, laser Doppler perfusion monitoring; LTH, local thermal hyperemia; FGF basic, basic fibroblast growth factor; G-CSF, granulocyte colony-stimulating factor; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; GRO- α , growth-related oncogene- α ; IFN, interferon; IL, interleukins; IL-1Ra, IL-1 receptor antagonist; IL-2R α , soluble IL-2 receptor α ; IL-12p40, IL-12 subunit p40; IL-12 subunit p70; LIF, leukemia inhibitory factor; M-COVID, mild to moderate COVID-19; M-CSF, macrophage colony-stimulating factor; Mers-CoV, middle east respiratory syndrome coronavirus; MIF, migration inhibitory factor; MIG, monokine induced by interferon- γ ; PDGF-BB, platelet-derived growth factor; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; S-COVID, severe COVID-19; SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; SCF, stem cell factor; SCGF- β , stem cell growth factor- β ; SDF-1 α , stromal cell-derived factor-1 α ; TNF, tumor necrosis factor; TRAIL, TNF-related apoptosis inducing ligand; VEGF, vascular endothelial growth factor.

* Corresponding author at: Instituto Nacional de Cardiologia, Rua das Laranjeiras, 374, 22240-006 Rio de Janeiro, Brazil.

E-mail address: etibi@uol.com.br (E. Tibirica).

<https://doi.org/10.1016/j.mvr.2020.104119>

Received 6 October 2020; Received in revised form 25 November 2020; Accepted 28 November 2020

Available online 3 December 2020

0026-2862/© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Coronavirus disease 2019, or COVID-19, is an acute viral illness caused by the Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV2) (Meyerowitz et al., 2020). It has affected all regions of the world, and as of 23rd November 2020, there have been 58,425,681 confirmed cases and 1,385,218 deaths, reported to the World Health Organization (WHO, 2020). It is transmitted by respiratory droplets, with an R0 of 2–3, and has a mean incubation time of five days (Meyerowitz et al., 2020). Most cases (80%), when symptomatic, present with fever and upper respiratory and gastrointestinal tract symptoms (Casas-Rojo et al., 2020; Richardson et al., 2020; Wu and McGoogan, 2020), many of which with olfactory and gustatory dysfunctions (Passali and Bentivoglio, 2020). Most importantly, around 15% of patients present a severe form of disease, that evolves over 7 to 10 days with dyspnea, a respiratory rate of over 30/min, blood oxygen saturation less than 93%, partial pressure of arterial oxygen to inspired oxygen fraction ratio < 300, and/or lung infiltrates occupying over 50% within 24 to 48 h; around 5% become critically ill, with respiratory failure, septic shock, and/or multiple organ dysfunction (Grasselli et al., 2020; Richardson et al., 2020; Wu and McGoogan, 2020). This imposes a heavy burden on intensive care beds, even in high-income countries, as recognized early on (Grasselli et al., 2020).

Two main features are noticed in the severe form: intense systemic inflammation and hypercoagulability (Connors and Levy, 2020). The expression “cytokine storm” has been proposed to depict this clinical situation (Mehta et al., 2020; Ruan et al., 2020). A multicenter study in 150 severe COVID-19 cases showed that high levels of ferritin and IL-6 were associated to death (Ruan et al., 2020). High C-reactive protein levels and d-dimer were also related to disease severity (Mehta et al., 2020).

Therapeutic measures to address the systemic inflammatory syndrome depicted have been studied. So far, there is an established role for steroids. They have been used with success in the severe forms of pulmonary disease, with a significant impact on decreasing the need for invasive ventilation and death, and rapid improvement in PaO₂/FiO₂ and a drop in CRP levels (Salton et al., 2020). The benefit of using steroids has been proved by a randomized trial that was conducted with a total of 2104 patients given dexamethasone 6 mg once per day for ten days and compared with 4321 patients randomized to usual care alone (Horby et al., 2020). Among the patients who received usual care alone, 28-day mortality was highest in those who required ventilation (41%), intermediate in those patients who required oxygen only (25%), and lowest among those who did not require any respiratory intervention (13%). Dexamethasone reduced deaths by one-third in ventilated patients and by one fifth in other patients receiving oxygen only. However, there was no benefit among those patients who did not require respiratory support (Horby et al., 2020).

Tocilizumab, a humanized monoclonal antibody that binds human interleukin-6 receptors, has a less clear role in severe COVID-19, as results from randomized trials reported to have failed to show mortality benefit at 28 or 30 days (Parr, 2020).

Since the beginning of the pandemic, a large number of studies have attempted to investigate the pathophysiology, clinical course and treatment options of COVID-19 (Aguilar et al., 2020; Petrilli et al., 2020; Psotka et al., 2020; Stratton et al., 2020). Understanding the pathophysiology of COVID-19 is crucial for scientific knowledge, the ability to identify clinical correlations, and the development of therapeutic strategies. In that context, microvascular dysfunction has been shown to play a key role in the pathophysiology of COVID-19 (Damiani et al., 2020; De Lorenzo et al., 2020a; Pons et al., 2020; Sardu et al., 2020). In fact, it has been suggested that vascular endothelial cells are a common link between the invasion of the body by SARS-CoV-2 and pre-existing cardiometabolic diseases (De Lorenzo et al., 2020b; Tibirica and De Lorenzo, 2020a,b). In addition, patients diagnosed with moderate or severe COVID-19 present increased levels of proinflammatory cytokines,

particularly interleukin-6 and tumor necrosis factor- α (G. Chen et al., 2020). Cytokine release syndrome (“cytokine storm”), which is characterized by a massive increase in the levels of proinflammatory cytokines, is known to be the major cause of morbidity and mortality in patients infected by SARS-CoV-2 (G. Chen et al., 2020).

Clinical studies on microcirculatory physiology have been performed for a long time, in the context of several conditions (Roustit and Cracowski, 2012), and using different methods (Cracowski and Roustit, 2016). Of note, the cutaneous microcirculation is an accessible and representative vascular bed that can be used for the evaluation of systemic microcirculatory flow and reactivity (Holowatz et al., 2008). Laser Doppler perfusion monitoring (LDPM) is a noninvasive method for the evaluation of systemic microvascular endothelial function, and LDPM has already proven useful in many clinical conditions (Turner et al., 2008), including cardiovascular and metabolic diseases (de Moraes et al., 2016; Gomes et al., 2008; Kaiser et al., 2013), rheumatologic diseases (Ruaro et al., 2017; Weibel et al., 2007) and circulatory shock (either septic or cardiogenic) (Mongkolpun et al., 2020; Orbegozo et al., 2018). Most published data concerning LDPM have validated the site of the skin of the forearm for the measurements, which is more accessible and more representative of general skin microvascular function (Cracowski and Roustit, 2016). Systemic microvascular reactivity can be evaluated using LDPM combined with cutaneous local thermal hyperemia (LTH), as the vasodilatory response in the skin due to LTH represents, fundamentally, endothelium-dependent microvascular reactivity (Roustit and Cracowski, 2012; Ugenti et al., 2018). In fact, LTH induces a biphasic curve of cutaneous microvascular vasodilation; the initial peak (2–5 min) represents the local sensory nerve axon reflex (Roustit and Cracowski, 2013), while the second peak (15 min) characterizes the release of endothelial vasodilators, predominantly nitric oxide (Roustit and Cracowski, 2013). This methodology has already been used in the description of endothelial dysfunction and altered microvascular reactivity in different cardiovascular and metabolic diseases, including arterial hypertension (Rossi et al., 2008; Ulliot, 1990; Virdis and Taddei, 2011) type 1 diabetes (Sorelli et al., 2019), hypercholesterolemia (Holowatz and Kenney, 2011; Holowatz et al., 2011) polycystic ovary syndrome and metabolic syndrome (Ketel et al., 2008). Furthermore, LTH has been used as a clinical surrogate marker in various diseases, such as Raynaud's phenomenon and systemic sclerosis (Boignard et al., 2005; Roustit et al., 2008). In the present study, maximal endothelium-dependent microvascular vasodilation (44 °C thermal plateau phase) was measured during the last 5 min of the second peak of microvascular flow resulting from LTH (a representative example of the recordings is presented in Fig. 1).

Given that the presence and intensity of systemic microvascular changes during the acute phase of COVID-19 may be related to disease progression and prognosis, the evaluation of microvascular reactivity in COVID-19 patients may offer relevant information. Thus, we used LDPM, which provides a noninvasive, simple and repeatable evaluation of tissue perfusion (Tibirica and De Lorenzo, 2020a), combined with LTH, to compare the systemic microvascular flow and reactivity in patients with mild-to-moderate or severe COVID-19 with that in age-matched healthy volunteers who tested negative for SARS-CoV-2. We also evaluated the plasma levels of different cytokines and chemokines with pro- or anti-inflammatory effects or with biological effects on vascular function, as these molecules might be involved in the pathophysiology of endothelial dysfunction in the context of acute COVID-19.

2. Methods

Patients with COVID-19 who were admitted to the National Institute of Cardiology, Ministry of Health, Rio de Janeiro, Brazil, were included after signing an informed consent form. A responsible family member signed the informed consent form when the patients were unable to sign it themselves. All the patients had underlying cardiac disease. The study was approved by the Institutional Review Board and was registered and

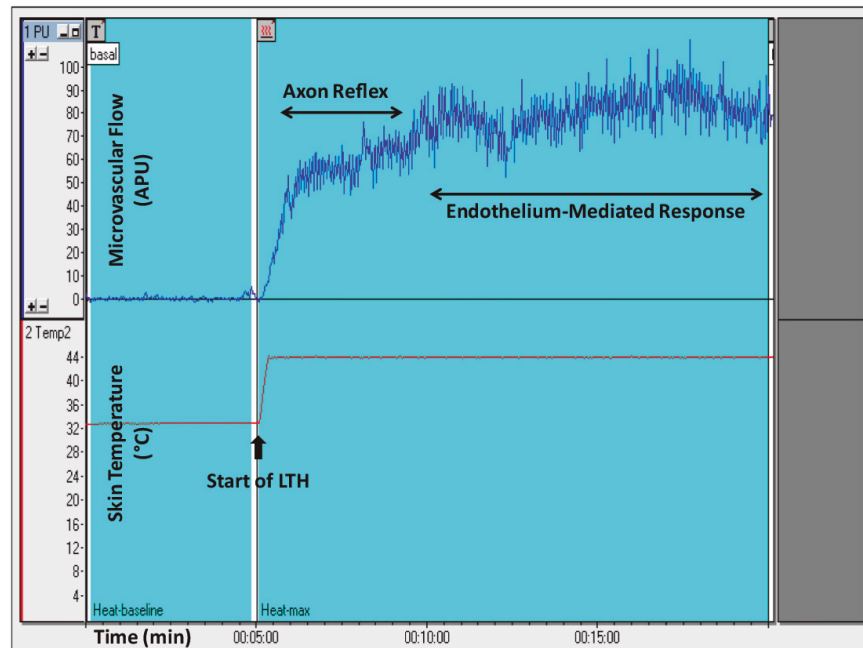


Fig. 1. Representative recording of skin microvascular flow using laser Doppler perfusion monitoring coupled with local thermal hyperemia (LTH) of a healthy volunteer.

APU, arbitrary perfusion units.

made public at [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov) (NCT4406545).

The patients had SARS-CoV-2, which was detected by RT-PCR analysis of nasopharyngeal swabs, and met the criteria for hospitalization either due to their underlying condition or due to COVID-19 (Berlin et al., 2020; Wiersinga et al., 2020). The demographic, clinical and laboratory data were recorded. The laboratory data included in this study were obtained within 24 h of the assessment of microvascular reactivity, and the serum cytokine levels were evaluated on the same day when LDPM was performed.

Severe COVID-19 (S-COVID) was defined according to the WHO criteria, while all the other cases of COVID-19 were considered mild to moderate (M-COVID) (<https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/who-china-joint-mission-on-covid-19-final-report.pdf>). Due to the very distinct characteristics and management (especially the need for vasoactive drugs), the groups were analyzed separately: patients without severe disease (M-COVID) and patients with severe disease (S-COVID).

A group of healthy volunteers (without chronic diseases or cardiac risk factors) was recruited from hospital staff members who tested negative for SARS-CoV-2. This group was also evaluated with LDPM and served as a control group. This group did not undergo cytokine assessment.

2.1. Evaluation of microvascular flow and reactivity

The evaluation of the microvascular flow and reactivity was performed within one week after admission, during the acute phase of disease, using a single-point laser Doppler perfusion monitoring (LDPM) system (Periflux 5001, Perimed, Järfälla, Sweden) to noninvasively measure systemic microvascular perfusion changes (in arbitrary perfusion units [APU = 10 mV]), as previously described (Cracowski and Roustit, 2016; Salgado et al., 2014), using heating laser probes (PF 457,

Perimed). The probes were attached to the skin with adhesive tapes, thus limiting movement artifacts. Moreover, patients were asked not to move during the recording period. After measuring the resting microvascular flow on the skin of the forearm for 5 min, the maximal microvascular vasodilatation was assessed using prolonged (20 min) local heating of the laser probe to 44 °C (local thermal hyperemia, LTH, Fig. 1), as previously described in detail (Salgado et al., 2014; Ugenti et al., 2018). Maximal vasodilatation (44 °C thermal plateau phase) corresponds to the mean microvascular flow during the last 5 min of the second peak. Data were digitized and stored on a computer and analyzed off-line with signal processing software (PeriSoft, Perimed, Järfälla, Sweden). We also compared the individual percentage increase of endothelium-dependent microvascular conductance (Fig. 2C), to normalize the results to baseline values of microvascular flow, which is measure in arbitrary perfusion units.

2.2. Multiplex immunoassay

Blood samples were collected from a peripheral vein and stored on ice. Plasma was obtained by centrifugation at 800g for 15 min at 4 °C, aliquoted, and stored at −70 °C until the day of analysis. A multiplex biometric immunoassay, using fluorescently dyed microspheres conjugated to monoclonal antibodies specific for a target protein, was used to measure 48 cytokine and chemokine cell signaling molecules according to the manufacturer's instructions (Bio-Plex Human Cytokine Assay; Bio-Rad Inc., Hercules, CA, USA). The cytokines measured were interleukins, including IL-1 α , IL-1 β , IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra), IL-2, soluble IL-2 receptor α (IL-2R α), IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12 subunit p40 (IL-12p40), IL-12 subunit p70 (IL-12p70), IL-13, IL-15, IL-16, IL-17A, and IL-18; interferons, including IFN- α 2 and IFN- γ ; tumor necrosis factors (TNF- α , TNF- β , and TNF-related apoptosis inducing ligand [TRAIL]); growth factors, including stem cell factor

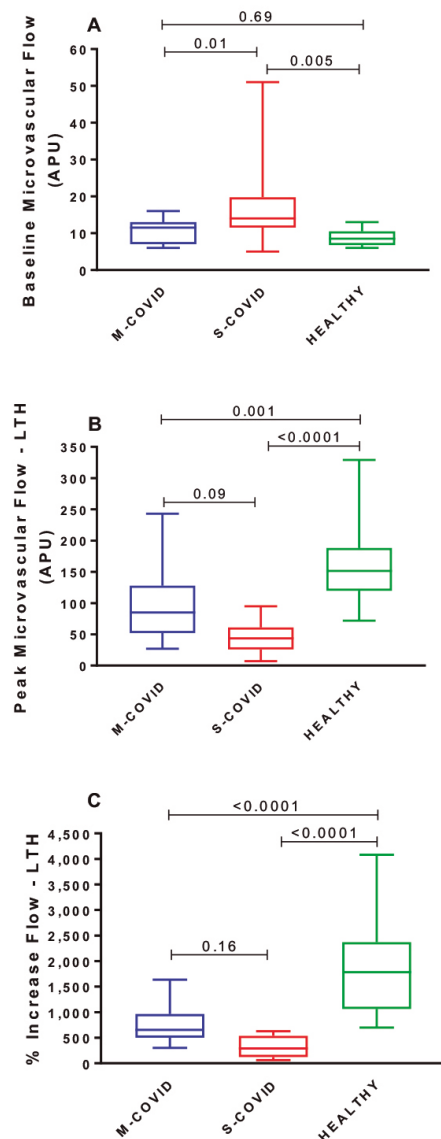


Fig. 2. Effects of local thermal hyperemia (LTH) on cutaneous microvascular flow and reactivity in patients with mild-to-moderate (M-COVID) or severe (S-COVID) COVID-19 and in COVID-19-negative age-matched healthy volunteers: (A) Baseline cutaneous microvascular flow; (B) Maximum microvascular flow during LTH and (C) percent increase in microvascular flow induced by LTH (from baseline to peak microvascular flow). The values are expressed as box and whisker plots, where the centerline denotes the median value, the box contains the 25th to 75th percentiles of the dataset and the whiskers indicate the maximum and minimum values. The results were analyzed using one-way ANOVA. APU, arbitrary perfusion units.

(SCF), basic fibroblast growth factor (FGF basic), nerve growth factor (β -NGF), hepatocyte growth factor (HGF), leukemia inhibitory factor (LIF), platelet-derived growth factor (PDGF-BB), vascular endothelial growth factor (VEGF), stem cell growth factor- β (SCGF- β), granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF); and finally chemokines, including cutaneous T cell-attracting chemokine (CCL24/CTACK), eotaxin, growth-related oncogene- α (GRO- α), IFN- γ -inducible protein-10 (CXCL10/IP-10), monocyte chemoattractant protein-1 (CCL2/MCP-1), monocyte-specific chemokine-3 (CCL7/MCP-3), migration inhibitory factor (MIF), monokine induced by interferon- γ (MIG), macrophage inflammatory protein (CCL3/MIP-1 α and CCL4/MIP-1 β), regulated upon activation normal T cell expressed and secreted (CCL5/RANTES), and stromal cell-derived factor-1 α (SDF-1 α). The cytokine levels were determined using a multiplex array reader from Luminex™ Instrumentation System (Bio-Plex Workstation from Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA). The analyte concentrations were calculated using software provided by the manufacturer (Bio-Plex Manager Software).

2.3. Statistical analysis

The results are presented as the mean $\pm$ SD or median (25th–75th percentiles) for the parametric or nonparametric parameters, respectively, according to the Shapiro-Wilk normality test. The statistical analyses were performed using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. The cytokine and chemokine data were analyzed using the two-tailed unpaired Mann-Whitney test. Contingency tables were analyzed using chi-square tests. *P* values < 0.05 were considered statistically significant. All the statistical analyses were performed using Prism, version 7.0 (GraphPad Software Inc. La Jolla, CA, USA).

3. Results

3.1. Clinical and demographic characteristics

Thirty-two COVID-19 patients and 14 healthy volunteers were included. Table 1 depicts the demographic and clinical characteristics of these individuals. Twenty-four (75%) patients had mild-to-moderate disease and were managed in regular hospital beds, while 8 (25%) required admission to the ICU for mechanical ventilation and/or hemodynamic support. The mean age of the patients with M-COVID was 58.2 ± 14.1 years, and that of the patients with S-COVID was 65.6 ± 6.5 years; in these groups, 54% and 100% of the patients were male, respectively.

3.2. Microvascular function evaluation

Evaluation of the microvascular flow and reactivity (Fig. 2) showed that the basal flow was similar between the M-COVID patients and healthy volunteers ($P = 0.69$) but was higher in the S-COVID patients than in the healthy volunteers ($P = 0.005$) and M-COVID patients ($P = 0.01$; Fig. 2A). The peak microvascular vasodilator response induced by LTH was markedly decreased in both the patient groups (M-COVID, $P = 0.001$; S-COVID, $P < 0.0001$) compared to the healthy volunteer group (Fig. 2B). The flow during LTH tended to be lower in the S-COVID patients than in the M-COVID patients ($p = 0.09$). Finally, the percent increases in the microvascular flow, from baseline to peak flow during LTH, were also markedly decreased in both the patient groups (M-COVID, $P < 0.0001$; S-COVID, $P < 0.0001$) compared to the healthy volunteer group (Fig. 2C).

3.3. Serum cytokine and chemokine levels

Of the 48 cytokines and chemokines tested, several displayed

Table 1
The clinical characteristics of healthy controls and mild-to-moderate COVID-19 (M-COVID) or severe COVID-19 (S-COVID) patients.

Parameter	M-COVID (n = 24)	S-COVID (n = 8)	HEALTHY (n = 14)	P-value
Age (years)	58.2 ± 14.1	65.6 ± 6.5	56.3 ± 9.6	0.20
Male n (%)	13 (54)	8 (100)	6 (43)	0.03
SAP (mmHg)	115 ± 14	131 ± 28	133 ± 22	0.01
DAP (mmHg)	69 ± 10	68 ± 15	80 ± 9	0.01
MAP (mmHg)	86 ± 11	89 ± 18	98 ± 11	0.02
BMI (kg/m ²)	28.3 ± 5.5	29.5 ± 2.1	N/D	0.55
Heart rate (bpm)	73 ± 13	93 ± 24	N/D	0.003
SaO ₂ (%)	96.4 ± 2.3	98.5 ± 1.8	N/D	0.02
Hypertension n (%)	18 (75)	8 (100)	N/A	0.30
Diabetes n (%)	12 (50)	5 (62.5)	N/A	0.73
Dyslipidemia n (%)	7 (29.2)	0 (0)	N/A	0.15
Smoking n (%)	7 (29.2)	2 (25)	N/A	>0.99
Coronary artery disease n (%)	17 (70.8)	6 (75)	N/A	>0.99
Valvular heart disease n (%)	5 (20.8)	0 (0)	N/A	0.30
Usual medications				
Angiotensin receptor blockers/ACE inhibitors n (%)	14 (58.3)	0 (0)	N/A	0.004
Beta-blockers n (%)	21 (87.5)	1 (12.5)	N/A	0.003
Calcium channel blockers n (%)	5 (20.8)	1 (12.5)	N/A	>0.99
Direct vasodilators n (%)	2 (8.3)	1 (12.5)	N/A	>0.99
Nitrates n (%)	2 (8.3)	0 (0)	N/A	>0.99
Diuretics n (%)	16 (66.7)	2 (25)	N/A	0.09
Statins n (%)	17 (70.8)	1 (12.5)	N/A	0.01
Oral antidiabetic agents n (%)	2 (8.3)	0 (0)	N/A	>0.99
Insulin n (%)	10 (41.7)	7 (87.5)	N/A	0.04
Antiplatelet agents n (%)	20 (83.3)	2 (25.0)	N/A	0.005
Oral anticoagulant agents n (%)	1 (4.2)	0 (0)	N/A	>0.99
Inpatient management				
Antibiotics n (%)	6 (25)	5 (62.5)	N/A	0.09
Oseltamivir n (%)	2 (8.3)	1 (12.5)	N/A	>0.99
Hydroxychloroquine n (%)	0 (0)	0 (0)	N/A	>0.99
Vasoactive amines n (%)	0 (0)	5 (62.5)	N/A	0.0003
Heparin n (%)	20 (83.3)	7 (87.5)	N/A	>0.99
Supplementary oxygen (nasal cannula) n (%)	5 (20.8)	0 (0)	N/A	0.30
Mechanical ventilation n (%)	0 (0)	7 (87.5)	N/A	<0.0001
Laboratory data				
Hematocrit (%)	36.7 (33.6–40.1)	24.2 (21.8–30.8)	N/D	<0.0001
Hemoglobin (g/dL)	11.9 ± 2.1	8.4 ± 1.7	N/D	0.0001
Leukocytes (mm ³)	7687 ± 3267	11,774 ± 3237	N/D	0.004
Platelets (mm ³)	238,297 ± 99,642	218,500 ± 107,980	N/D	0.64
hs-CRP (mg/L)	4.2 (1.2–10.3)	14.7 (5.6–27.6)	N/D	0.02
Glycemia (mg/dL)	135 (125–175)	168 (133–187)	N/D	0.37
Urea (mg/dL)	44 (29.5–77.5)	117.5 (43.2–240.8)	N/D	0.05
Creatinine (mg/dL)	1.05 (0.86–1.61)	1.99 (1.01–3.26)	N/D	0.10

SAP, systolic arterial pressure; DAP, diastolic arterial pressure; MAP, mean arterial pressure; ACE, angiotensin-converting enzyme; BMI, body mass index; SaO₂, oxygen saturation; hs-CRP, high sensitivity C-reactive protein; N/D, not determined; N/A, not applicable.

The results are presented as the mean ± SD or the median (25th–75th percentile) for values that follow or do not follow a Gaussian distribution, respectively

(Shapiro-Wilk normality test).

P-values were estimated using two-tailed unpaired Student's *t*-tests (comparisons of two groups for parameters with Gaussian distribution), two-tailed unpaired Mann-Whitney tests (comparisons of two groups for parameters with non-Gaussian distribution), or chi-square (Fisher's exact test), for categorical parameters. The parameters evaluated in the three groups of individuals (M-COVID, S-COVID and HEALTHY) were analyzed using one-way ANOVA.

significantly different serum concentrations between the patients with M-COVID and the patients with S-COVID. Regarding proinflammatory cytokines, the patients with S-COVID had higher serum concentrations of IL-1α, IL-2Rα, IL-6, IL-15, IL-17, IFNα2 and IL-2p40 (Fig. 3).

The patients with S-COVID also had higher serum concentrations of proinflammatory chemokines, including MCP-1, MIP1β, RANTES, and IP-10 (Fig. 3). Finally, the anti-inflammatory cytokine IL-5 was also increased in the patients with S-COVID compared to the patients with M-COVID (Fig. 3).

4. Discussion

The main findings of this study are as follows: (i) endothelium-dependent microvascular vasodilator responses evaluated using LDPM combined with LTH are reduced in patients with COVID-19, especially in those with severe COVID-19, and (ii) the levels of serum cytokines and chemokines involved in the regulation of vascular function and inflammation are increased in patients with severe COVID-19 compared to those with nonsevere disease.

In our study, the baseline microvascular flow was higher in the patients with S-COVID than in the healthy volunteers. The marked inflammatory response observed in patients with S-COVID, demonstrated by the higher plasma concentrations of cytokines and chemokines, compared to M-COVID patients, most likely induced systemic vasodilation that resulted in increased microvascular conductance. Moreover, in the severely ill patients, systemic vasodilation and decreased tissue perfusion, which are associated with cellular and metabolic abnormalities, require the use of vasopressors to improve tissue perfusion and microvascular alterations by restoring the perfusion pressure in vital organs (De Backer and Foulon, 2019). In our study sample, five out of eight S-COVID patients were being treated with vasopressor agents, which could have increased the perfusion pressure and, consequently, the baseline systemic microvascular flow. Of note, the mean arterial pressure of the S-COVID patients was maintained in the normal range (89 ± 18 mmHg) during the study procedures.

In this series of patients, during the acute phase of COVID-19, the systemic endothelium-dependent microvascular reactivity in both the severe and mild-to-moderate patients was impaired compared with that in the sex- and age-matched healthy volunteers. In fact, both maximum microvascular vasodilation and increase in microvascular conductance induced by LTH, compared to baseline values, were markedly impaired in patients with S-COVID, compared with healthy volunteers. Moreover, the impairment was more pronounced in the patients with S-COVID and occurred in parallel with the increased plasma levels of proinflammatory cytokines and chemokines in these patients.

In our study, mild to moderate COVID-19 patients (M-COVID) were admitted to a clinical ward and received less intensive support than those with severe COVID-19 (S-COVID), who were all in the Intensive Care Unit (ICU) and 7 out of 8 on mechanical ventilation. Therefore, the SaO₂ was (marginally, 98 vs. 96%) higher in S-COVID likely due to ventilation with high oxygen concentrations, versus only oxygen supplementation through facial mask or nasal cannula in M-COVID. Regarding medications, we should note that most patients with S-COVID, in the ICU, were on vasopressor medications, and due to hemodynamic instability had their blood pressure-lowering medications withdrawn, contributing to a lower number of medications than in patients with M-COVID.

Importantly, our results demonstrated that increased levels of

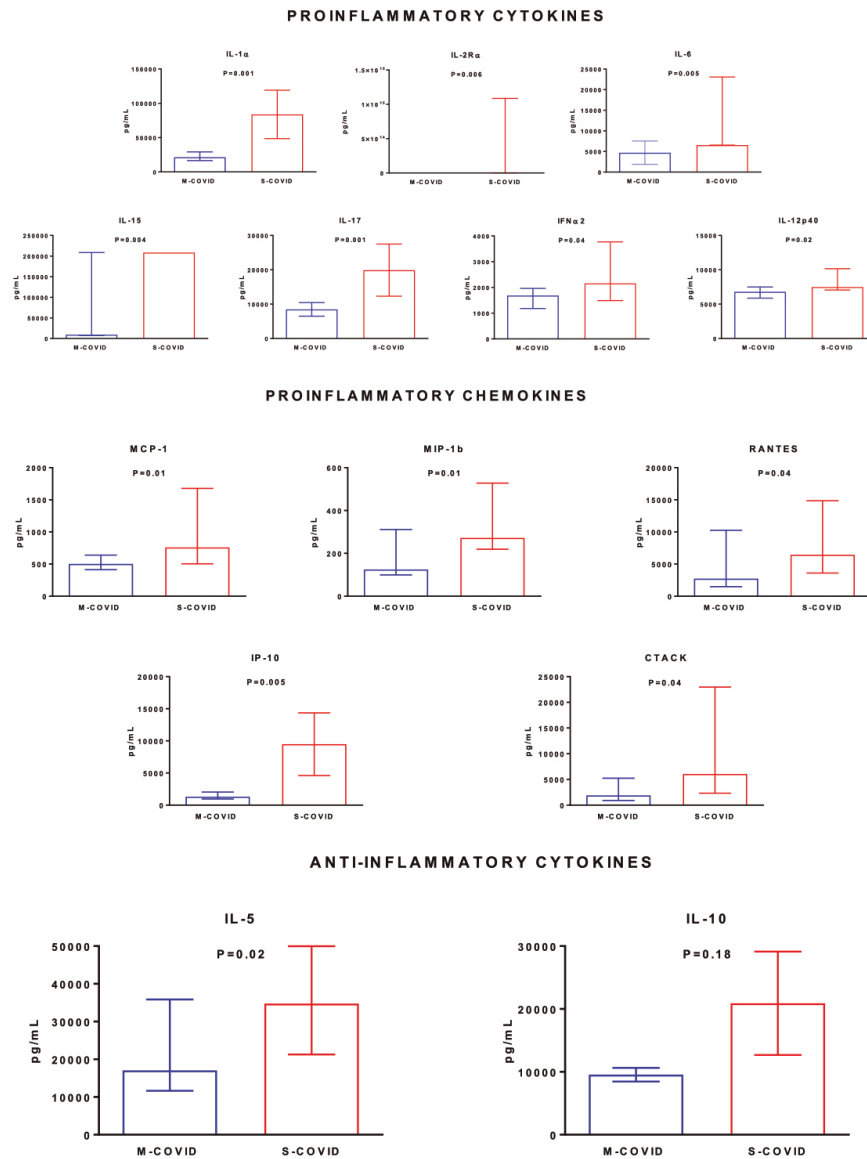


Fig. 3. Plasma concentrations of proinflammatory cytokines, proinflammatory chemokines and anti-inflammatory cytokines in patients with mild-to-moderate (M-COVID) or severe (S-COVID) COVID-19.

The values are expressed as the medians (25th to 75th percentiles) and were analyzed using the two-tailed unpaired Mann-Whitney test.

proinflammatory cytokines, chemokines, and anti-inflammatory interleukins are associated with COVID-19 severity. Consistent with our findings, a recent experimental study of SARS-CoV-2-infected mice and MERS-CoV-infected human microvascular endothelial cells demonstrated that the expression of the genes encoding the interleukins IL-1 α and IL-6, the chemokines MCP-1, RANTES, and IP-10, and IFN- α 2 was significantly increased within 24 h of infection, and this increased expression was related to the high infiltration of T cells, NK cells and monocytes (Yao et al., 2020).

Regarding individual cytokines, interleukins 1 α , 2R α , 6, 15, 17,

12p40, interferon α 2, IP 10, MCP1, MIP 1b, RANTES and CTACK, all with proinflammatory activities, were increased in patients with S-COVID compared to M-COVID, as well as the anti-inflammatory cytokines IL5 and IL10 (the latter, non significantly).

IL-1 α is closely linked to the innate immune response and assists in host defense against infection (Dinarello, 2009). Soluble IL-2R α is found at high levels in the circulation of healthy individuals but is further increased in patients with infection, inflammation and autoimmune diseases (Damoiseaux, 2020). Soluble IL-2R α and IL-6 are significantly correlated with the severity of lung injury and the ratio of arterial

oxygen partial pressure to fractional inspired oxygen ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) in COVID-19 patients with pneumonia. In addition, IL-6 is considered an independent predictor of adverse prognosis in COVID-19 patients (N. Chen et al., 2020; Ruan et al., 2020; Zhou et al., 2020).

IL-15 is involved in the early, innate immune defense against viral infections in humans. Macrophage-derived IL-15 contributes with other monokines (especially IL-12) to the proinflammatory cascade leading to innate immune IFN- γ production (Fehniger and Caligiuri, 2001).

Interferons are essential in the response to viral infections, and the IFN- α response in SARS-CoV has been demonstrated in ferrets (Danesh et al., 2011). Recently, the administration of IFN- α has been tested to negativize viral RNA in COVID-19 patients (Idelsis et al., 2020).

MCP-1 is a predictor of the outcome of severe sepsis and is associated with the activated protein C pathway and the genes it induces (N. Chen et al., 2020). Our results are consistent with a recent study that showed that chemokines, such as IP-10 and MCP-1, are upregulated in monocytes/macrophages infected with SARS-CoV and are highly involved in the clinical progression of MERS (Yao et al., 2020). Additionally, IP-10 and MCP-1 were found to be elevated in COVID-19 patients who needed intensive care treatment (Liu et al., 2020; Wang et al., 2020).

MIP-1 β has been shown to be induced by dengue virus infection (Spain-Santana et al., 2001). MIP-1 β is produced by human monocytes and dendritic cells upon different stimuli and is a chemoattractant for NK cells, recruiting them to inflammatory sites. NK cells have been associated with mild dengue (Azeredo et al., 2006). In the study by Bozza et al. (2008), a correlation between MIP-1 β plasma levels and NK cells was observed, suggesting their role in dengue protective mechanisms. On the contrary, in our study, MIP-1 β was higher in patients with severe COVID-19; larger studies may elucidate if there is a different pattern of MIP-1 β action in COVID-19 compared to dengue infection.

IL-12 and IL-17A were shown to upregulate ACE2 mRNA expression in the airway epithelial cells of patients with severe COVID-19 and chronic obstructive pulmonary disease (Ruan et al., 2020). Some of the biological activities of IL-12 include enhancement of cytotoxic T cells, generation and activation of lymphokine-activated killer cells, increase in natural killer (NK) cell cytotoxicity, induction of activated T cell and NK cell proliferation, and induction of IFN- γ production by T and NK cells. IL-12 is secreted by activated B cells, macrophages, and other antigen-presenting cells, and its production is inhibited by IL-4 and IL-10. Therefore, IL-12 plays an important role in cell-mediated inflammation and contributes to the regulation of immunoglobulin production (Zundler and Neurath, 2015). The increased levels of IL-12 in S-COVID patients may reflect the ongoing immune response to SARS-CoV-2 infection.

IL-17, another proinflammatory cytokine that is expressed at higher levels in S-COVID patients, is a product of activated T lymphocytes, and its biological activities include stimulation of IL-6 and IL-8 production. IL-17 is highly produced in patients with chronic inflammatory diseases but is also involved in the pathophysiology of the cardiovascular complications associated with autoimmune and inflammatory diseases (Maione, 2016). Interestingly, elevated IL-17A levels correlate with vascular dysfunction in rheumatoid arthritis patients (Marder et al., 2011). Thus, the elevation of IL-17 might be one of the causative factors of the microvascular dysfunction observed in our study. Finally, IL-17 has been shown to increase platelet activation and arterial thrombus formation (Maione et al., 2011), which might help to explain the thrombotic phenomena found in COVID-19 patients (Raucci et al., 2020).

RANTES, also known as chemokine ligand CCL5, is involved in vascular dysfunction by modulating perivascular inflammation. RANTES is an important chemoattractant for inflammatory cells that seems to be involved in the pathogenesis of atherosclerosis in humans and in experimental mouse models (Maione, 2016; Marder et al., 2011). RANTES can be produced by resident cells in vessels and atherosclerotic plaques, and in *in vitro* experiments, its expression is increased by angiotensin II in the arteriolar and venular endothelium (Maione et al.,

2011). Experimental findings also suggest that RANTES is involved in obliterative changes in the pulmonary arteries of patients with pulmonary arterial hypertension (Raucci et al., 2020). In addition, studies have shown that RANTES inhibitors significantly decreased viremia in SARS-CoV-2 patients (Raucci et al., 2020).

CTACK is constitutively expressed in normal skin and is upregulated in wound sites. This chemokine is elevated in the cerebrospinal fluid samples of HIV-1-positive patients and is correlated with non-neurological disorders (Kopf et al., 1996). However, our study is the first to demonstrate the increase in the CTACK levels in patients with COVID-19. The significance of this finding has yet to be determined.

The complexity of the cytokine/chemokine responses in COVID-19 patients is noteworthy. Huang et al. (2020) showed that patients infected with SARS-CoV-2 had high levels of IL1 β , IFN γ , IP10, and MCP1, probably leading to activated T helper 1 (Th1) cell responses, and patients requiring ICU admission had higher concentrations of G-CSF, IP10, MCP1, MIP1 α , and TNF α than those not requiring ICU admission, suggesting that the cytokine storm was associated with disease severity. However, COVID-19 patients also exhibited increased secretion of T helper 2 (Th2) cytokines (e.g., IL-4 and IL-10), which suppress inflammation. This observation is consistent with our results, as anti-inflammatory cytokines such as IL-5, which has a very narrow set of cellular targets, such as human eosinophils, basophils and a subset of mast cells, and, thus far, has not been described in COVID-19 patients (Kopf et al., 1996) and IL-10, which play a central role in limiting the host immune response to pathogens, thereby limiting damage to the host (Iyer and Cheng, 2012), were increased (although not significantly in the case of IL-10) in patients with S-COVID. Further studies may elucidate the interplay between proinflammatory/anti-inflammatory mediators, as well as their vascular effects, in COVID-19 patients.

Limitations to this study must be considered. The M-COVID and S-COVID groups are imbalanced for number, age and sex. This is due to the “real-world” nature of the study, which was performed with incoming patients amidst the COVID-19 pandemic; therefore, the differences reflect epidemiologic characteristics of the pandemic, such as the higher number of male patients with severe disease, as well as increased age in this subgroup.

In conclusion, endothelium-dependent microvascular vasodilator responses evaluated using LDPM combined with LTH are decreased in patients with COVID-19, especially in those with severe COVID-19. The levels of serum cytokines and chemokines involved in the regulation of vascular function and inflammation are increased in patients with severe COVID-19 compared to those with mild-to-moderate COVID.

Funding sources

This investigation was supported by grants from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, E.T. grant # 305234/2017-0 and H.C.C.F.N grant # 4017000/2020-8), FAPERJ (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, E.T. grant # E-26/202.822/2018 and H.C.C.F.N grant # E26/210.181/2020).

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

The authors would like to thank Marcio Marinho Gonzalez for his excellent technical assistance with laser speckle recordings and Edson Fernandes de Assis for performing the cytokine assays with the multiplex platform of the Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro. We would also like to thank Adriana Bastos Carvalho, Izabella Pereira da Silva Bezerra, Raiana Andrade Quintanilha Barbosa, Taís Hanae Kasai

Brunswick and Glauber Monteiro Dias, for technical assistance in the procedures of blood processing and deep-freeze storage.

References

- Aguilar, R. B., et al., 2020. Current understanding of COVID-19 clinical course and investigational treatments. *Front Med (Lausanne)*. 7, 555301.
- Azeredo, E.L., et al., 2006. NK cells, displaying early activation, cytotoxicity and adhesion molecules, are associated with mild dengue disease. *Clin. Exp. Immunol.* 143, 345–356.
- Berlin, D.A., et al., 2020. Severe Covid-19. *N. Engl. J. Med.* <https://doi.org/10.1056/NEJMcip2009575> [Online ahead of print].
- Boignard, A., et al., 2005. Local hyperemia to heating is impaired in secondary Raynaud's phenomenon. *Arthritis Res. Ther.* 7, R1103–R1112.
- Bozza, F.A., et al., 2008. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. *BMC Infect. Dis.* 8, 86.
- Casas-Rojo, J.M., et al., 2020. Clinical characteristics of patients hospitalized with COVID-19 in Spain: results from the SEMI-COVID-19 Registry. *Rev. Clin. Esp.* 220, 480–494.
- Chen, G., et al., 2020a. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *J. Clin. Invest.* 130, 2620–2629.
- Chen, N., et al., 2020b. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*. 395, 507–513.
- Connors, J.M., Levy, J.H., 2020. Thromboinflammation and the hypercoagulability of COVID-19. *J. Thromb. Haemost.* 18, 1559–1561.
- Cracowski, J.L., Roustit, M., 2016. Current methods to assess human cutaneous blood flow: an updated focus on laser-based techniques. *Microcirculation*. 23, 337–344.
- Damiani, E., et al., 2020. Microvascular alterations in patients with SARS-CoV-2 severe pneumonia. *Ann. Intensive Care* 10, 60.
- Damoiseaux, J., 2020. The IL-2 - IL-2 receptor pathway in health and disease: the role of the soluble IL-2 receptor. *Clin. Immunol.* 218, 108515.
- Danesh, A., et al., 2011. Early gene expression events in ferrets in response to SARS coronavirus infection versus direct interferon-alpha2b stimulation. *Virology*. 409, 102–112.
- De Backer, D., Foulon, P., 2019. Minimizing catecholamines and optimizing perfusion. *Crit. Care* 23, 149.
- De Lorenzo, A., et al., 2020a. Systemic endothelial dysfunction: a common pathway for COVID-19, cardiovascular and metabolic diseases. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 30 (8), 1401–1402.
- De Lorenzo, A., et al., 2020b. Systemic endothelial dysfunction: a common pathway for COVID-19, cardiovascular and metabolic diseases. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 30, 1401–1402.
- de Moraes, R., et al., 2016. Effects of non-supervised low intensity aerobic exercise training on the microvascular endothelial function of patients with type 1 diabetes: a non-pharmacological interventional study. *BMC Cardiovasc. Disord.* 16, 23.
- Dinarello, C.A., 2009. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 519–550.
- Fehniger, T.A., Caligiuri, M.A., 2001. Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood*. 97, 14–32.
- Gomes, M.B., et al., 2008. Evaluation of microvascular endothelial function in patients with type 1 diabetes using laser-Doppler perfusion monitoring: which method to choose? *Microvasc. Res.* 76, 132–133.
- Grasselli, G., et al., 2020. Critical care utilization for the COVID-19 outbreak in Lombardy, Italy: early experience and forecast during an emergency response. *JAMA*. 323, 1545–1546.
- Holowatz, L.A., Kenney, W.L., 2011. Acute localized administration of tetrahydrobiopterin and chronic systemic atorvastatin treatment restore cutaneous microvascular function in hypercholesterolaemic humans. *J. Physiol.* 589, 4787–4797.
- Holowatz, L.A., et al., 2008. The human cutaneous circulation as a model of generalized microvascular function. *J. Appl. Physiol.* 105, 370–372 (1985).
- Holowatz, L.A., et al., 2011. Oral atorvastatin therapy restores cutaneous microvascular function by decreasing arginase activity in hypercholesterolaemic humans. *J. Physiol.* 589, 2093–2103.
- Horby, P., et al., 2020. Dexamethasone in hospitalized patients with Covid-19 - preliminary report. *N. Engl. J. Med.* <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2021436> [Online ahead of print].
- Huang, C., et al., 2020. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 395, 497–506.
- Idelsis, E.-M., et al., 2020. Effect and safety of combination of interferon alpha-2b and gamma or interferon alpha-2b for negativization of SARS-CoV-2 viral RNA. Preliminary results of a randomized controlled clinical trial. *medRxiv*. 2020.07.29.20164251.
- Iyer, S.S., Cheng, G., 2012. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Crit. Rev. Immunol.* 32, 23–63.
- Kaiser, S.E., et al., 2013. Antihypertensive treatment improves microvascular rarefaction and reactivity in low-risk hypertensive individuals. *Microcirculation*. 20, 703–716.
- Ketel, I.J., et al., 2008. Obese but not normal-weight women with polycystic ovary syndrome are characterized by metabolic and microvascular insulin resistance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93, 3365–3372.
- Kopf, M., et al., 1996. IL-5-deficient mice have a developmental defect in CD5+ B-1 cells and lack eosinophilia but have normal antibody and cytotoxic T cell responses. *Immunity*. 4, 15–24.
- Liu, K., et al., 2020. Clinical characteristics of novel coronavirus cases in tertiary hospitals in Hubei Province. *Chin. Med. J.* 133, 1025–1031.
- Maione, F., 2016. Commentary: IL-17 in chronic inflammation: from discovery to targeting. *Front. Pharmacol.* 7, 250.
- Maione, F., et al., 2011. IL-17A increases ADP-induced platelet aggregation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 408, 658–662.
- Marder, W., et al., 2011. Interleukin 17 as a novel predictor of vascular function in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 70, 1550–1555.
- Mehta, P., et al., 2020. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet*. 395, 1033–1034.
- Meyerowitz, E.A., et al., 2020. Transmission of SARS-CoV-2: a review of viral, host, and environmental factors. *Ann. Intern. Med.* <https://doi.org/10.7326/M20-5008> [Online ahead of print].
- Mongkolpun, W., et al., 2020. Alterations in skin blood flow at the fingertip are related to mortality in patients with circulatory shock. *Crit. Care Med.* 48, 443–450.
- Orbegozo, D., et al., 2018. Skin microcirculatory reactivity assessed using a thermal challenge is decreased in patients with circulatory shock and associated with outcome. *Ann. Intensive Care* 8, 60.
- Parr, J.B., 2020. Time to reassess tocilizumab's role in COVID-19 pneumonia. *JAMA Intern. Med.* <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2020.6557> [Online ahead of print].
- Passali, G.C., Bentivoglio, A.R., 2020. Comment to the article "Olfactory and gustatory dysfunctions as a clinical presentation of mild-to-moderate forms of the coronavirus disease (COVID-19): a multicenter European study". *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 277, 2391–2392.
- Petrilli, C.M., et al., 2020. Factors associated with hospital admission and critical illness among 5279 people with coronavirus disease 2019 in New York City: prospective cohort study. *BMJ*. 369, m1966.
- Pons, S., et al., 2020. The vascular endothelium: the cornerstone of organ dysfunction in severe SARS-CoV-2 infection. *Crit. Care* 24, 353.
- Psotka, M.A., et al., 2020. Conduct of clinical trials in the era of COVID-19: JACC scientific expert panel. *J. Am. Coll. Cardiol.* 76, 2368–2378.
- Rauci, F., et al., 2020. Interleukin-17A (IL-17A), a key molecule of innate and adaptive immunity, and its potential involvement in COVID-19-related thrombotic and vascular mechanisms. *Autoimmun. Rev.* 19, 102572.
- Richardson, S., et al., 2020. Presenting characteristics, comorbidities, and outcomes among 5700 patients hospitalized with COVID-19 in the New York City area. *JAMA*. 323, 2052–2059.
- Rossi, M., et al., 2008. Skin vasodilator effect of exogenous urokinase-II in hypertensives not exposed to antihypertensive medication. *Blood Press.* 17, 18–25.
- Roustit, M., Cracowski, J.L., 2012. Non-invasive assessment of skin microvascular function in humans: an insight into methods. *Microcirculation*. 19, 47–64.
- Roustit, M., Cracowski, J.L., 2013. Assessment of endothelial and neurovascular function in human skin microcirculation. *Trends Pharmacol. Sci.* 34, 373–384.
- Roustit, M., et al., 2008. Discrepancy between simultaneous digital skin microvascular and brachial artery macrovascular post-occlusive hyperemia in systemic sclerosis. *J. Rheumatol.* 35, 1576–1583.
- Ruan, Q., et al., 2020. Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China. *Intensive Care Med.* 46, 846–848.
- Ruaro, B., et al., 2017. Microvascular damage evaluation in systemic sclerosis: the role of nailfold videocapillaroscopy and laser techniques. *Rheumatismo*. 69, 147–155.
- Salgado, M.A., et al., 2014. Effectiveness of laser Doppler perfusion monitoring in the assessment of microvascular function in patients undergoing on-pump coronary artery bypass grafting. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* 28, 1211–1216.
- Salton, F., et al., 2020. Prolonged low-dose methylprednisolone in patients with severe COVID-19 pneumonia. *Open Forum Infect Dis.* 7, ofaa421.
- Sardu, C., et al., 2020. Hypertension, thrombosis, kidney failure, and diabetes: is COVID-19 an endothelial disease? A comprehensive evaluation of clinical and basic evidence. *J. Clin. Med.* 9.
- Sorelli, M., et al., 2019. Assessment of cutaneous microcirculation by laser Doppler flowmetry in type 1 diabetes. *Microvasc. Res.* 124, 91–96.
- Spain-Santana, T.A., et al., 2001. MIP-1 alpha and MIP-1 beta induction by dengue virus. *J. Med. Virol.* 65, 324–330.
- Stratton, C.W., et al., 2020. Pathogenesis-directed therapy of 2019 novel coronavirus disease. *J. Med. Virol.* <https://doi.org/10.1002/jmv.26610> [Online ahead of print].
- Tibirica, E., De Lorenzo, A., 2020a. Importance of the evaluation of systemic microvascular flow and reactivity in critically ill patients with coronavirus disease 2019 - COVID-19. *Microvasc. Res.* 131, 104028.
- Tibirica, E., De Lorenzo, A., 2020b. Increased Severity of COVID-19 in People With Obesity: Are We Overlooking Plausible Biological Mechanisms? *Obesity (Silver Spring)*.
- Turner, J., et al., 2008. Current concepts in assessment of microvascular endothelial function using laser Doppler imaging and iontophoresis. *Trends Cardiovasc. Med.* 18, 109–116.
- Ugenti, V., et al., 2018. Microvascular endothelial dysfunction during cardiopulmonary bypass in surgery for correction of cyanotic and acyanotic congenital heart disease. *Microvasc. Res.* 120, 55–58.
- Ulliot, D.J., 1990. Surgical standby for coronary angioplasty. *Ann. Thorac. Surg.* 50, 3–4.
- Virdis, A., Taddei, S., 2011. How to evaluate microvascular organ damage in hypertension: assessment of endothelial function. *High Blood Press. Cardiovasc. Prev.* 18, 163–167.
- Wang, W., et al., 2020. Definition and risks of cytokine release syndrome in 11 critically ill COVID-19 patients with pneumonia: analysis of disease characteristics. *J. Infect. Dis.* 222, 1444–1451.

L. Sabioni et al.

Microvascular Research 134 (2021) 104119

- Weibel, L., et al., 2007. Laser Doppler flowmetry for assessing localized scleroderma in children. *Arthritis Rheum.* 56, 3489–3495.
- WHO, 2020. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Dashboard. November 23rd.
- Wiersinga, W.J., et al., 2020. Pathophysiology, transmission, diagnosis, and treatment of coronavirus disease 2019 (COVID-19): a review. *JAMA.* 324, 782–793.
- Wu, Z., McGoogan, J.M., 2020. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72314 cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA.* 323, 1239–1242.
- Yao, Z., et al., 2020. Immune environment modulation in pneumonia patients caused by coronavirus: SARS-CoV, MERS-CoV and SARS-CoV-2. *Aging (Albany NY)* 12, 7639–7651.
- Zhou, F., et al., 2020. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet.* 395, 1054–1062.
- Zundler, S., Neurath, M.F., 2015. Interleukin-12: functional activities and implications for disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 26, 559–568.

Am J Cardiovasc Dis 2020;10(4):386-391
www.AJCD.us /ISSN:2160-200X/AJCD0116551

Case Report

Systemic microvascular dysfunction in COVID-19

Leticia R Sabioni, Eduardo Tibirica, Cristiane C Lamas, Guilherme D Amorim, Andrea De Lorenzo

Instituto Nacional de Cardiologia, Rio de Janeiro, Brazil

Received June 18, 2020; Accepted August 22, 2020; Epub October 15, 2020; Published October 30, 2020

Abstract: COVID-19, caused by the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), while having lung injury as its most prominent feature, has been increasingly shown to affect endothelial cell function and the microvasculature. In this report, a woman with COVID-19, cardiac valve disease and spherocytosis was assessed with laser Doppler perfusion monitoring. Systemic microvascular reactivity was impaired during a worsening phase of COVID-19, but improved after clinical recovery; microcirculatory dysfunction paralleled systemic inflammation and pulmonary involvement. The assessment of systemic microcirculatory function may therefore provide insights on COVID-19 pathophysiology.

Keywords: COVID-19, laser Doppler perfusion imaging, endothelial dysfunction, microvascular reactivity, cardiac valve disease

Introduction

COVID-19 is the disease caused by the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), characterized by a flu-like illness, evolving to a severe systemic inflammatory syndrome in 5 to 15% of those affected [1-3]. Lung injury with hypoxemia is the most prominent feature, and may lead to the need for supplementary oxygen or even mechanical ventilation. Mortality is higher among those over 60 and those with diabetes, hypertension, cardiovascular disease, chronic kidney disease, chronic pulmonary disease, liver disease and obesity [1, 2]. Pathophysiology is not fully understood but endothelial cell dysfunction plays a major role [4], and few treatment resources have proven effective [5, 6]. Steroids have recently been shown to be beneficial in those with moderate to severe forms of the disease [7]. Herein we describe a case of severe microcirculatory dysfunction in a patient with valvular heart disease and COVID-19.

Case report

A 32-year-old woman with a history of rheumatic valve disease, metallic prosthetic valves in the mitral and aortic positions (three prior valve replacement surgeries), a cardiac pacemaker

implant for complete heart block, and hereditary spherocytosis, was evaluated at the Cardiology outpatient clinic due to mild shortness of breath, fever (38.5°C), rhinorrhea and dry cough in the previous five days. Her ECG showed pacemaker rhythm, heart rate of 80 bpm, with left bundle branch block pattern and a ventricular spike. The corrected QT interval was of 430 msec. The echocardiogram showed left atrial enlargement, mild systolic left ventricular dysfunction (left ventricular ejection fraction of 48% by the Simpson method), and normally functioning mitral and aortic prostheses. After a chest CT (**Figure 1A**) was obtained and a nasopharyngeal swab for RT-PCR of SARS-CoV2 was collected, oral azithromycin and amoxicillin + clavulanate were started, and the patient was discharged, with instructions for clinical monitoring.

After three days (on day 8 after the beginning of symptoms), she returned for emergency evaluation due to bloody sputum, diarrhea and increased dyspnea. The nasopharyngeal swab was positive and COVID-19 was diagnosed. Chest CT (**Figure 1B**) showed a worsening pattern of viral pneumonia, and C-reactive protein (CRP) was 29 mg/dL. The patient was admitted and amoxicillin + clavulanate was changed to ceftriaxone. Azithromycin was maintained, and

COVID-19 and microvascular reactivity

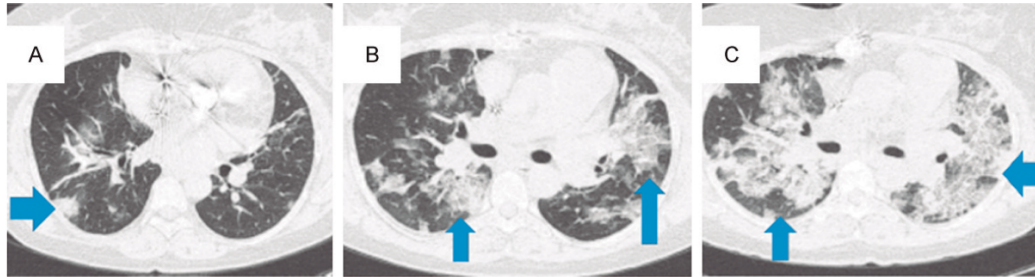


Figure 1. Chest CT images performed on three different moments of clinical evolution. A: Outpatient study, showing bilateral, rounded foci of consolidation and ground-glass images, in <50% of the lung fields. B: At admission, showing bilateral consolidations and ground-glass images, occupying >50% of the lung fields. C: On the worst day after admission, with an increase of the ground-glass opacities, which became confluent and associated with interlobular septal thickening and bilateral consolidation. Arrows point out some of the pulmonary lesions of the patient.

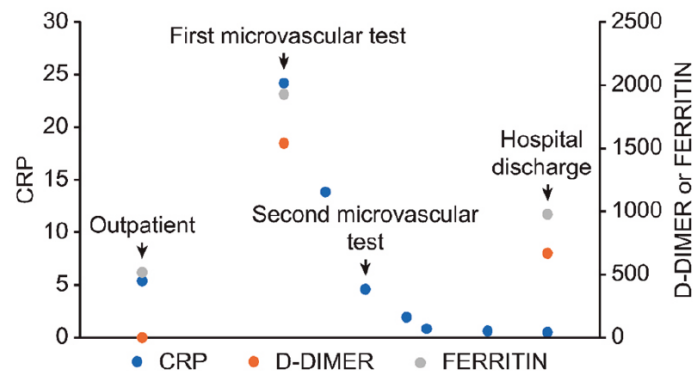


Figure 2. Evolution of C-reactive protein (CRP, mg/dL), d-dimer (ng/mL) and ferritin (µg/L) serum levels.

oseltamivir was added to the therapeutic regimen. Warfarin (used chronically) was changed to full-dose IV heparine, and oxygen therapy was delivered by face mask.

On the following four days, the patient required increasing oxygen concentrations, and had persisting fever and worsening dyspnea, with tachypnea (44 breaths/min). CRP was elevated (24.2 mg/dL), as well as ferritin (1,930 µg/L), and d-dimer (154,000 ng/mL); the chest CT also showed deterioration (**Figure 1C**). Blood cultures were negative. Piperacillin + tazobactam and IV methylprednisolone were initiated; oseltamivir, ceftriaxone and azythromycin were stopped (the latter due to QT interval prolongation). High-flux continuous supplemental oxygen maintained saturation at 97%, and mechanical ventilation was not necessary.

The patient improved on the following days: she became afebrile on the 16th day after the onset of symptoms, and was weaned from supplemental oxygen. CRP decreased to 4.4 mg/dL (**Figure 2**).

The evaluation of microvascular flow and reactivity was performed on two different occasions, the first on day 12 (when the patient presented the worst clinical features since hospital admission) and the second on day 16 (after clinical and laboratory improvement).

Endothelium-dependent vasodilation of skin microcirculation was evaluated using a single-point laser doppler perfusion monitoring (LDPM) system (Periflux 5001, Perimed, Järfälla, Sweden), for noninvasive measurement of systemic microvascular perfusion changes (in arbitrary perfusion units [APU = 10 mV]), as previously described [8, 9]. After measuring the resting microvascular flow on the skin of the forearm, the maximal microvascular vasodilatation was assessed using prolonged (20 minutes) local heating of the laser probe to 44°C (local thermal hyperemia, LTH) (**Figure 3**).

This case report is part of a prospective study, which investigates systemic microvascular flow and reactivity in patients in the acute phase of COVID-19. The study was approved by the Institutional Review Board (IRB) of the National Institute of Cardiology and was registered and

COVID-19 and microvascular reactivity

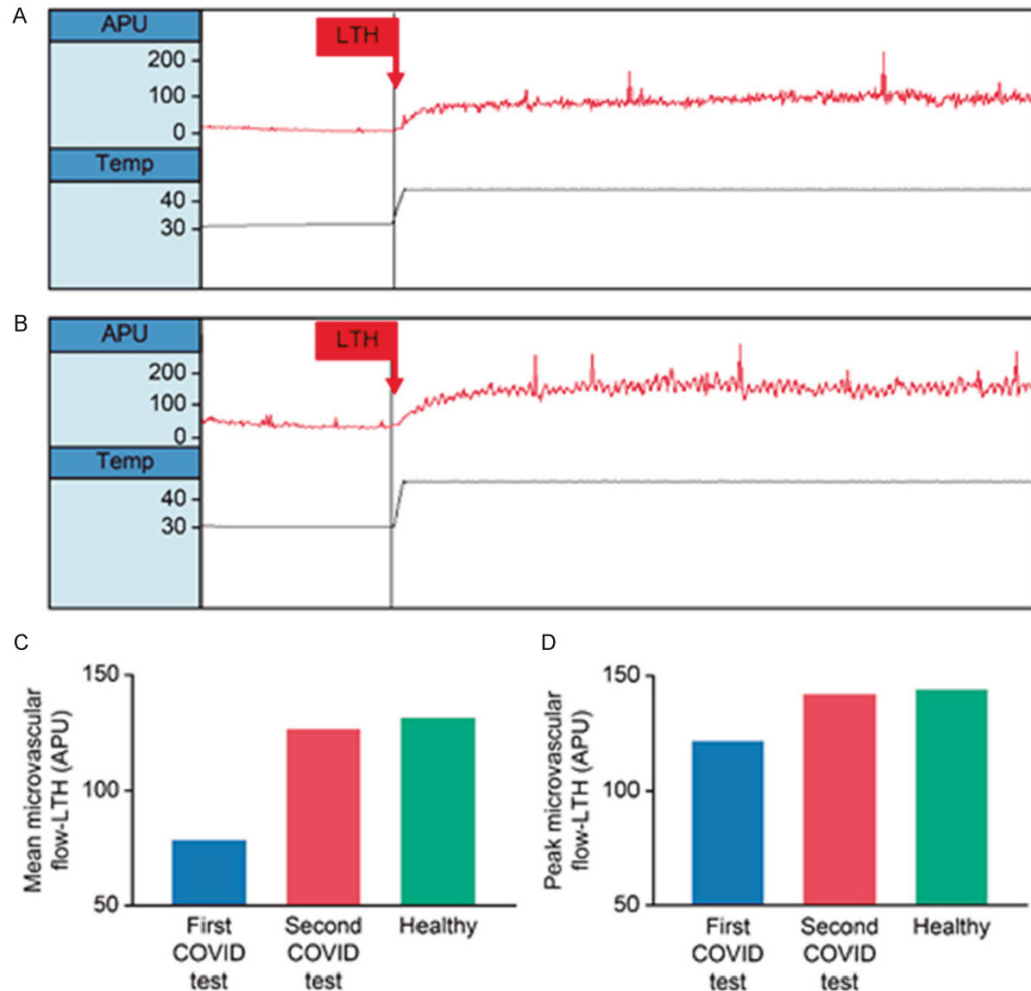


Figure 3. Upper panels: Recordings of skin microvascular flow using laser doppler perfusion monitoring, with local thermal hyperemia (LTH) stimulus. (A) Patient with COVID-19, first test (worst day during clinical evolution). (B) Same patient, second test, after clinical and laboratory improvement. There is higher baseline flow, as well as post-LTH flow on the second test. Lower panels: Bar graphs showing the effect of LTH on mean (C) and peak (D) cutaneous microvascular flow of the patient, in the first test (blue bars) and on the second test (red bars), compared to a sex- and age-matched healthy control (green bars). APU, arbitrary perfusion units; LTH, start of local thermal hyperemia; TEMP, skin temperature.

made public at ClinicalTrials.gov (NCT44065-45). The subject included in this case report read and signed the informed consent form approved by the IRB before inclusion.

Discussion

An association between the presence of cardiovascular disease or myocardial injury and adverse prognosis has been demonstrated in patients with COVID-19, with increases of up to

10 times in mortality [10, 11]. As an initial process, SARS-CoV-2 virus, anchored in the transmembrane angiotensin-converting enzyme 2 (ECA2) receptor, penetrates host cells, including endothelial cells [12, 13]. The ensuing endothelial dysfunction may contribute-together with the chronic endothelial dysfunction present in comorbidities such as hypertension, diabetes, coronary artery disease and obesity [14, 15]- to more severe presentations, faster evolution and worse outcomes.

COVID-19 and microvascular reactivity

Table 1. Summary of the case report

Case description	A 32-year-old woman with cardiac valve disease and spherocytosis, diagnosed with COVID-19. Systemic microvascular reactivity assessed with cutaneous laser doppler perfusion monitoring, with thermal hyperemia
First microcirculation test	Performed in the worst day of clinical evolution-severely impaired microvascular vasodilation, compared to a healthy control
Second microcirculation test	Performed after clinical and laboratory improvement-marked increase in baseline microvascular flow and endothelial-dependent vasodilation

The cutaneous microcirculation is an accessible and representative vascular bed for the evaluation of systemic microcirculatory flow and reactivity [16]. LDPM, which was employed in this study, is a noninvasive method for the evaluation of systemic microvascular endothelial function in diverse clinical or surgical conditions [9, 17, 18]. The skin vasodilatory response resulting from LTH assesses microvascular function and reactivity, and consists of a biphasic response. The initial peak mediated by a calcitonin gene-related peptide, dependent on the axonal reflex of the sensory nerves, is followed by long-term plateau phase, mediated primarily by substances produced by the vascular endothelium, such as nitric oxide and hyperpolarizing factors derived from the endothelium [8].

In this patient, systemic endothelium-dependent microvascular reactivity was severely impaired on day 12, but recovered to levels similar to those of a sex- and age-matched healthy control on day 16 (Figure 2). Both resting microvascular flow, as well as mean and peak flows during LTH, were higher in the second test, when the patient was improved (Table 1). These changes occurred in parallel with improvements of CRP. This biomarker is increased in patients with COVID-19, most likely due to systemic inflammation [19, 20]. Systemic inflammation may account for endothelial function abnormalities [21], as endothelial cells and microvascular function are known to be affected by circulating inflammatory cytokines and reactive oxygen species, for example, which are increased in sepsis- the release of inflammatory mediators and reactive molecules to destroy pathogens may ultimately cause endothelial damage [22, 23].

Bearing in mind that the presence and intensity of systemic microvascular changes during the acute phase of COVID-19 may be related to disease progression and prognosis, the impor-

tance of the evaluation of microvascular reactivity in these patients should be underscored. To the best of our knowledge, this is the first report on the detrimental effect of COVID-19 on endothelium-dependent systemic microvascular reactivity in human beings. The current findings may point towards a unique opportunity for further evaluation of the microcirculation in this patient population, with a fast, simple and noninvasive method.

Conclusions

Systemic microvascular dysfunction may occur in patients with COVID-19, paralleling the inflammatory status of the disease. Laser doppler perfusion monitoring with local thermal hyperemia on the skin may be valuable to non-invasively evaluate the systemic microcirculation in COVID-19, offering useful information, which may have therapeutic and prognostic implications.

Acknowledgements

The work was funded by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; grant # 305234/2017-0) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ; grant # E26/202.822/2018). The authors thank Marcio Gonzalez for technical assistance.

Disclosure of conflict of interest

None.

Address correspondence to: Andrea De Lorenzo, Instituto Nacional de Cardiologia, Rua das Laranjeiras 374, Rio de Janeiro, ZIP 22240-006, Brazil. E-mail: andlorenzo@hotmail.com

References

- [1] Docherty AB, Harrison EM, Green CA, Hardwick HE, Pius R, Norman L, Holden KA, Read JM,

COVID-19 and microvascular reactivity

- Dondelinger F, Carson G, Merson L, Lee J, Plotkin D, Sigfrid L, Halpin S, Jackson C, Gamble C, Horby PW, Nguyen-Van-Tam JS, Ho A, Russell CD, Dunning J, Openshaw PJ, Baillie JK and Semple MG; ISARIC4C investigators. Features of 20 133 UK patients in hospital with covid-19 using the ISARIC WHO clinical characterisation protocol: prospective observational cohort study. *BMJ* 2020; 369: 1985.
- [2] Richardson S, Hirsch JS, Narasimhan M, Crawford JM, McGinn T, Davidson KW, Barnaby DP, Becker LB, Chelico JD, Cohen SL, Cookingham J, Coppa K, Diefenbach MA, Dominello AJ, Duer-Hefele J, Falzon L, Gitlin J, Hajizadeh N, Harvin TG, Hirschwerk DA, Kim EJ, Kozel ZM, Marra LM, Mogavero JN, Osorio GA, Qiu M and Zanos TP. Presenting characteristics, comorbidities, and outcomes among 5700 patients hospitalized with COVID-19 in the New York city area. *JAMA* 2020; 323: 2052-2059.
 - [3] Cevik M, Bamford CGG and Ho A. COVID-19 pandemic-a focused review for clinicians. *Clin Microbiol Infect* 2020; 26: 842-847.
 - [4] Teuwen LA, Geldhof V, Pasut A and Carmeliet P. COVID-19: the vasculature unleashed. *Nat Rev Immunol* 2020; 20: 389-391.
 - [5] Beigel JH, Tomashek KM, Dodd LE, Mehta AK, Zingman BS, Kalil AC, Hohmann E, Chu HY, Lutkemeyer A, Kline S, Lopez de Castilla D, Finberg RW, Dierberg K, Tapson V, Hsieh L, Patterson TF, Paredes R, Sweeney DA, Short WR, Touloumi G, Lye DC, Ohmagari N, Oh MD, Ruiz-Palacios GM, Benfield T, Fätkenheuer G, Kortepeter MG, Atmar RL, Creech CB, Lundgren J, Babiker AG, Pett S, Neaton JD, Burgess TH, Bonnett T, Green M, Makowski M, Osinusi A, Nayak S and Lane HC; ACTT-1 Study Group Members. Remdesivir for the treatment of covid-19 - preliminary report. *N Engl J Med* 2020; 383: 994.
 - [6] Rose MR, Hiltz KA, Stephens RS and Hager DN. Novel viruses, old data, and basic principles: how to save lives and avoid harm amid the unknown. *Lancet Respir Med* 2020; 8: 661-663.
 - [7] Horby P, Lim WS, Emberson J, Mafham M, Bell J, Linsell L, Staplin N, Brightling C, Ustianowski A, Elmahi E, Prudon B, Green C, Felton T, Chadwick D, Rege K, Fegan C, Chappell LC, Faust SN, Jaki T, Jeffery K, Montgomery A, Rowan K, Juszczak E, Baillie JK, Haynes R and Landray MJ. Effect of dexamethasone in hospitalized patients with COVID-19: preliminary report. *N Engl J Med* 2020; [Epub ahead of print].
 - [8] Cracowski JL and Roustit M. Current methods to assess human cutaneous blood flow: an updated focus on laser-based-techniques. *Microcirculation* 2016; 23: 337-344.
 - [9] Salgado MA, Salgado-Filho MF, Reis-Brito JO, Lessa MA and Tiberica E. Effectiveness of laser Doppler perfusion monitoring in the assessment of microvascular function in patients undergoing on-pump coronary artery bypass grafting. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2014; 28: 1211-1216.
 - [10] Ruan Q, Yang K, Wang W, Jiang L and Song J. Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China. *Intensive Care Med* 2020; 46: 846-848.
 - [11] Wei JF, Huang FY, Xiong TY, Liu Q, Chen H, Wang H, Huang H, Luo YC, Zhou X, Liu ZY, Peng Y, Xu YN, Wang B, Yang YY, Liang ZA, Lei XZ, Ge Y, Yang M, Zhang L, Zeng MQ, Yu H, Liu K, Jia YH, Prendergast BD, Li WM and Chen M. Acute myocardial injury is common in patients with covid-19 and impairs their prognosis. *Heart* 2020; 106: 1154-1159.
 - [12] Kreutz R, Algharably EAE, Azizi M, Dobrowolski P, Guzik T, Januszewicz A, Persu A, Prejbisz A, Riemer TG, Wang JG and Burnier M. Hypertension, the renin-angiotensin system, and the risk of lower respiratory tract infections and lung injury: implications for COVID-19. *Cardiovasc Res* 2020; 116: 1688-1699.
 - [13] Pons S, Fodil S, Azoulay E and Zafrani L. The vascular endothelium: the cornerstone of organ dysfunction in severe SARS-CoV-2 infection. *Crit Care* 2020; 24: 353.
 - [14] De Lorenzo A, Escobar S and Tiberica E. Systemic endothelial dysfunction: a common pathway for COVID-19, cardiovascular and metabolic diseases. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2020; 30: 1401-1402.
 - [15] Tiberica E and De Lorenzo A. Increased severity of COVID-19 in people with obesity: are we overlooking plausible biological mechanisms? *Obesity (Silver Spring)* 2020; 28: 1374.
 - [16] Holowatz LA, Thompson-Torgerson CS and Kenney WL. The human cutaneous circulation as a model of generalized microvascular function. *J Appl Physiol* (1985) 2008; 105: 370-372.
 - [17] de Moraes R, Van Bavel D, Gomes MB and Tiberica E. Effects of non-supervised low intensity aerobic exercise training on the microvascular endothelial function of patients with type 1 diabetes: a non-pharmacological interventional study. *BMC Cardiovasc Disord* 2016; 16: 23.
 - [18] Ugenti V, Romano AC and Tiberica E. Microvascular endothelial dysfunction during cardiopulmonary bypass in surgery for correction of cyanotic and acyanotic congenital heart disease. *Microvasc Res* 2018; 120: 55-58.
 - [19] Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Y, Qiu Y, Wang J, Liu Y, Wei Y, Xia J, Yu T, Zhang X and Zhang L. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet* 2020; 395: 507-513.

COVID-19 and microvascular reactivity

- [20] Guan WJ, Ni ZY, Hu Y, Liang WH, Ou CQ, He JX, Liu L, Shan H, Lei CL, Hui DSC, Du B, Li LJ, Zeng G, Yuen KY, Chen RC, Tang CL, Wang T, Chen PY, Xiang J, Li SY, Wang JL, Liang ZJ, Peng YX, Wei L, Liu Y, Hu YH, Peng P, Wang JM, Liu JY, Chen Z, Li G, Zheng ZJ, Qiu SQ, Luo J, Ye CJ, Zhu SY and Zhong NS; China Medical Treatment Expert Group for Covid-19. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *N Engl J Med* 2020; 382: 1708-1720.
- [21] Paulus WJ and Tschope C. A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation. *J Am Coll Cardiol* 2013; 62: 263-271.
- [22] Ait-Oufella H, Maury E, Lehoux S, Guidet B and Offenstadt G. The endothelium: physiological functions and role in microcirculatory failure during severe sepsis. *Intensive Care Med* 2010; 36: 1286-1298.
- [23] Ince C, Mayeux PR, Nguyen T, Gomez H, Kellum JA, Ospina-Tascon GA, Hernandez G, Murray P and De Backer D. The endothelium in sepsis. *Shock* 2016; 45: 259-270.

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



INSTITUTO NACIONAL DE
CARDIOLOGIA - INC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: INVESTIGAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MICROCIRCULATORÍAS SISTÊMICAS EM PACIENTES EM FASE AGUDA DA COVID-19: CORRELAÇÕES COM VARIÁVEIS CLÍNICAS E LABORATORIAIS E COM O PROGNÓSTICO

Pesquisador: Eduardo Vera Tibiriçá

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 31237220.1.0000.5272

Instituição Proponente: Instituto Nacional de Cardiologia - INC

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.025.575

Apresentação do Projeto:

Trata-se de estudo transversal observacional.

A Hipótese é que a intensidade das alterações microvasculares sistêmicas em pacientes em fase aguda da COVID-19 poderia estar relacionada com a progressão e com o prognóstico da doença, o presente estudo, transversal e observacional, objetiva investigar a presença de disfunção endotelial nestes pacientes, buscando também avaliar associações entre a presença de disfunção endotelial e variáveis demográficas, clínicas e laboratoriais

Critérios de inclusão: Idade > 18 anos internados no do Instituto Nacional de Cardiologia • Teste molecular por PCR em tempo real positivo para SARS-CoV-2

Critérios de exclusão

• Presença de infecção não-COVID com repercussão sistêmica com documentada microbiologicamente

Tamanho da amostra = 25 pacientes.

Os pacientes serão submetidos uma única vez ao procedimento doppler na testa.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: avaliar, através do laser doppler, a presença de alterações da função endotelial microvascular sistêmica em pacientes em fase aguda da COVID-19.

Endereço: Rua das Laranjeiras 374 - 5º andar

Bairro: Laranjeiras

CEP: 22.240-006

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3037-2307

E-mail: cepinclaranjeiras@gmail.com



INSTITUTO NACIONAL DE
CARDIOLOGIA - INC



Continuação do Parecer: 4.025.575

Objetivo Secundário é Correlacionar as variáveis obtidas no estudo da microcirculação com variáveis demográficas, clínicas e laboratoriais em pacientes em fase aguda da COVID-19.- Correlacionar as variáveis obtidas no estudo da microcirculação com níveis de citocinas plasmáticas em pacientes em fase aguda da COVID-19.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos mínimos em relação da avaliação da função endotelial na pele através de fluxometria laser Doppler. O estudo da fisiopatologia desta doença infecciosa causada por um vírus de identificação recente, teria repercussões no manejo dos pacientes e no desenvolvimento de tratamentos apropriados. O estudo tem valor prognóstico e na evolução da COVID 19.. Poderia gerar novos conhecimentos com benefício para a ciência e o planeta como um todo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa interessante e relevante, nestas circunstâncias especiais de pandemia por um vírus ainda parcialmente desconhecido

Toda e qualquer informação adicional é importante.

Análise estatística dentro dos padrões científicos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termo de ciência das chefias incluído

Parecer da comissão científica incluído

TCLE bem elaborado, de fácil compreensão

Recomendações:

Não há

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Respostas às pendências emitidas pelo CEP/INC:

- (1) Apresentar termo de ciência das chefias: A anuências das chefias dos serviços envolvidos no desenvolvimento do projeto foram anexadas à Plataforma Brasil. atendida
- (2) Apresentar TCLE: O TCLE do estudo foi anexado à Plataforma Brasil. ATENDIDA
- (3) esclarecer quando o sangue será colhido para armazenamento: O sangue será coletado no

Endereço: Rua das Laranjeiras 374 - 5º andar

Bairro: Laranjeiras

CEP: 22.240-006

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3037-2307

E-mail: cepinclaranjeiras@gmail.com



INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA - INC



Continuação do Parecer: 4.025.575

momento da coleta de rotina nos diferentes serviços, no máximo 24 horas após a realização da avaliação da reatividade vascular por fluxometria laser Doppler.

Os tubos de coleta serão enviados diretamente ao CTC na Coordenação de Ensino e Pesquisa do INC, para processamento de obtenção de plasma e armazenamento em ultrafreezer -80° C. ATENDIDA

(4) Falta parecer da comissão científica: O parecer da Comissão Científica foi anexado à Plataforma Brasil. ATENDIDA

Todas as pendências foram respondida a contento

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme Resolução CNS/MS 466/12 Capítulo XI Item 2.d cabe ao pesquisador responsável elaborar e apresentar os relatórios parciais e final ao Comitê de Ética em que foi submetido o projeto.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1548516.pdf	12/05/2020 14:05:20		Aceito
Outros	CC_COVID.pdf	12/05/2020 14:05:03	Eduardo Vera Tibiriçá	Aceito
Outros	resposta_pendencias_CEP.pdf	12/05/2020 14:03:52	Eduardo Vera Tibiriçá	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Formularios_Ciencia.pdf	12/05/2020 14:03:26	Eduardo Vera Tibiriçá	Aceito
Declaração de Pesquisadores	anuencia_centro_cirurgico.jpg	12/05/2020 14:01:54	Eduardo Vera Tibiriçá	Aceito
Declaração de concordância	Ciencia_Chefia.pdf	12/05/2020 13:59:37	Eduardo Vera Tibiriçá	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_doppler_COVID.pdf	12/05/2020 13:56:34	Eduardo Vera Tibiriçá	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_microcirculacao_COVID_19.docx	30/04/2020 14:57:13	Eduardo Vera Tibiriçá	Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto_COVID_Tibirica.pdf	30/04/2020 14:55:39	Eduardo Vera Tibiriçá	Aceito

Endereço: Rua das Laranjeiras 374 - 5º andar

Bairro: Laranjeiras

CEP: 22.240-006

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3037-2307

E-mail: cepinclaranjeiras@gmail.com



INSTITUTO NACIONAL DE
CARDIOLOGIA - INC



Continuação do Parecer: 4.025.575

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 13 de Maio de 2020

Assinado por:

monica moura de vasconcellos
(Coordenador(a))

Endereço: Rua das Laranjeiras 374 - 5º andar

Bairro: Laranjeiras

CEP: 22.240-006

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3037-2307

E-mail: cepinclaranjeiras@gmail.com



INSTITUTO NACIONAL DE
CARDIOLOGIA - INC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: INVESTIGAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MICROCIRCULATORIAS SISTÊMICAS EM PACIENTES EM FASE AGUDA DA COVID-19: CORRELAÇÕES COM VARIÁVEIS CLÍNICAS E LABORATORIAIS E COM O PROGNÓSTICO

Pesquisador: Eduardo Vera Tibiriçá

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 31237220.1.0000.5272

Instituição Proponente: Instituto Nacional de Cardiologia - INC

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.580.227

Apresentação do Projeto:

A presente emenda propõe a avaliação, através do laser doppler, da presença de presumíveis alterações crônicas da função endotelial microvascular sistêmica em pacientes recuperados da COVID-19. De acordo com o projeto de pesquisa original, a primeira avaliação foi efetuada na fase aguda de COVID-19, em pacientes internados no INC; a segunda avaliação ocorreria de 6 a 12 meses após alta hospitalar, no momento em que os pacientes comparecerem ao hospital para avaliação ambulatorial. As modificações do protocolo foram feitas no projeto de pesquisa e na Plataforma Brasil. O cronograma de execução foi atualizado, assim como o orçamento, incluindo o custo dos eletrodos adicionais para testes com laser Doppler. Finalmente, o número de pacientes previsto inicialmente, que era de vinte e cinco, foi modificado para o número final de trinta e dois pacientes em fase aguda recrutados para o estudo.

Objetivo da Pesquisa:

Ver parecer anterior

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Ver parecer anterior

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante e atual, podendo contribuir para o esclarecimento desta doença ainda com

Endereço: Rua das Laranjeiras 374 - 5º andar

Bairro: Laranjeiras

CEP: 22.240-006

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3037-2307

E-mail: cepinclaranjeiras@gmail.com



INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA - INC



Continuação do Parecer: 4.580.227

tantas questões a descobrir.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos foram atualizados

Recomendações:

Não ha

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1711720_E2.pdf	03/03/2021 09:51:15		Aceito
Declaração de Pesquisadores	emenda_cronico.docx	03/03/2021 09:50:02	Eduardo Vera Tibiriçá	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_emenda_cronicos.docx	03/03/2021 09:49:25	Eduardo Vera Tibiriçá	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_microcirculacao_COVID_19_emenda1.pdf	17/06/2020 12:34:31	Eduardo Vera Tibiriçá	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_doppler_emenda1.pdf	17/06/2020 12:32:46	Eduardo Vera Tibiriçá	Aceito
Outros	CC_COVID.pdf	12/05/2020 14:05:03	Eduardo Vera Tibiriçá	Aceito
Outros	resposta_pendencias_CEP.pdf	12/05/2020 14:03:52	Eduardo Vera Tibiriçá	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Formularios_Ciencia.pdf	12/05/2020 14:03:26	Eduardo Vera Tibiriçá	Aceito
Declaração de Pesquisadores	anuencia_centro_cirurgico.jpg	12/05/2020 14:01:54	Eduardo Vera Tibiriçá	Aceito
Declaração de concordância	Ciencia_Chefia.pdf	12/05/2020 13:59:37	Eduardo Vera Tibiriçá	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_doppler_COVID.pdf	12/05/2020 13:56:34	Eduardo Vera Tibiriçá	Aceito

Endereço: Rua das Laranjeiras 374 - 5º andar

Bairro: Laranjeiras

CEP: 22.240-006

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3037-2307

E-mail: cepinclaranjeiras@gmail.com



INSTITUTO NACIONAL DE
CARDIOLOGIA - INC



Continuação do Parecer: 4.580.227

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_microcirculacao_COVID_19.doc x	30/04/2020 14:57:13	Eduardo Vera Tibiriçá	Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto_COVID_Tibirica.pdf	30/04/2020 14:55:39	Eduardo Vera Tibiriçá	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 09 de Março de 2021

Assinado por:
monica mouro de vasconcellos
(Coordenador(a))

Endereço: Rua das Laranjeiras 374 - 5º andar

Bairro: Laranjeiras

CEP: 22.240-006

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3037-2307

E-mail: cepinclaranjeiras@gmail.com

ANEXO B – TERMO DE ANUÊNCIA DE CHEFIAS

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA SAÚDE
SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA

FORMULÁRIO DE CIÊNCIA DO PROJETO DE PESQUISA PELAS CHEFIAS

3. **Pesquisador Principal:** Dr. Eduardo Tibiriçá

2. **Título do Projeto de Pesquisa:** INVESTIGAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MICROCIRCULATÓRIAS SISTÊMICAS EM PACIENTES EM FASE AGUDA DA COVID-19: CORRELAÇÕES COM VARIÁVEIS CLÍNICAS E LABORATORIAIS E COM O PROGNÓSTICO

3. **Setor (es) do Hospital onde a Pesquisa será realizada:** ENF. DOENÇA CONGENITA/AORTA

Itens Básicos para Avaliação do Projeto de Pesquisa:

- () tem relevância científica
- () sua execução é operacionalmente viável neste Setor
- () não traz risco adicional à saúde ou à vida do paciente
- () não expõe o paciente a desconfortos desnecessários
- () não expõe o paciente a gastos adicionais

A não observância de qualquer dos itens acima impede o encaminhamento do projeto para o CEP.

Rio de Janeiro, 30 de março de 2020.

Chefe do Serviço