



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

Amanda Ferreira Barcelos

Avaliação da função endotelial microvascular em pacientes com endocardite
infeciosa utilizando a técnica de fluxometria microvascular a laser.

Rio de Janeiro

2017

Amanda Ferreira Barcelos

Avaliação da função endotelial microvascular em pacientes com endocardite infecciosa utilizando a técnica de fluxometria microvascular a laser.

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

Orientador: Eduardo Vera Tibiriçá

Co-orientadora: Cristiane da Cruz Lamas

Rio de Janeiro

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

B242a Barcelos, Amanda Ferreira

Avaliação da função endotelial microvascular em pacientes com endocardite infecciosa utilizando a técnica de fluxometria microvascular a laser / Amanda Ferreira Barcelos. – Rio de Janeiro, 2017.

52 f.

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

1. Endocardite infecciosa. 2. Microcirculação. 3. Disfunção microvascular. 4. Fluxometria microvascular a laser. I. Título.

CDU 616.126

Amanda Ferreira Barcelos

Avaliação da função endotelial microvascular em pacientes com endocardite infecciosa utilizando a técnica de fluxometria microvascular a laser.

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

Aprovada em _____ de _____ de 2017.

Prof. Dr. Daniel Arthur Barata Kasal- Instituto Nacional de Cardiologia
Presidente e membro interno

Prof. Dr. Glauber Monteiro Dias - Instituto Nacional de Cardiologia
Membro interno

Profa. Dra. Andrea Rocha de Lorenzo- Instituto Nacional de Cardiologia
Membro interno (suplente)

Prof. Dr. Flávio Eduardo Nacul- Universidade Federal do Rio de Janeiro
Membro externo

Prof. Dr. André Miguel Japiassu- INI Evandro Chagas, Fiocruz, Rio de Janeiro

Membro externo (suplente)

DEDICATÓRIA

Dedico esse mestrado aos meus pais, Marlene Ferreira e José Expedito e meu marido Wille Lopes pelo incentivo e apoio em todas as minhas escolhas e decisões.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por estar sempre ao meu lado.

A Prof^a. Dr^a. Cristiane Lamas pelo incentivo a realização do mestrado, dedicação, comprometimento e auxílio no desenvolvimento da dissertação.

Ao Prof. Dr. Eduardo Tibiriçá por ter aceitado ser meu orientador e por ter me auxiliado em todas as etapas do estudo, e sem o qual o desenvolvimento do trabalho não seria possível.

Ao Enfermeiro Márcio Gonzalez pela extrema presteza na realização do estudo da microcirculação dos pacientes.

A minha família pelo apoio e estímulo durante o mestrado.

EPÍGRAFE

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”.

Cora Coralina

RESUMO

INTRODUÇÃO: A endocardite infecciosa (EI) é uma condição grave com incidência crescente e alta taxa de mortalidade intrahospitalar e em cinco anos. Poucos estudos tratam da avaliação da microcirculação em pacientes com EI, e até agora nenhum deles utilizou tecnologia a laser. O objetivo deste estudo é avaliar as alterações presentes na microcirculação cutânea de pacientes com EI. **MÉTODOS:** Trata-se de um estudo comparativo que incluiu pacientes com EI definida pelos critérios de Duke modificados admitidos em nosso centro para tratamento. O grupo referência foi formado por voluntários saudáveis pareados por sexo e idade. O fluxo microvascular foi avaliado no antebraço usando um sistema de imagem de fluxometria microvascular a laser, para medição não invasiva e contínua de alterações de perfusão microvascular cutânea. Esse sistema foi utilizado em combinação com micro iontoforese de acetilcolina, um vasodilatador dependente do endotélio e nitroprussiato de sódio (independente do endotélio), para testar a reatividade microvascular. **RESULTADOS:** Estudamos 22 pacientes com EI; sendo 15 do sexo masculino e sete do sexo feminino. A idade média e o desvio padrão (SD) foram de $45,5 \pm 17,3$ anos. A apresentação clínica foi aguda em 13,6% e subaguda em 86,3%. Os agentes etiológicos foram divididos em estreptococos do grupo *viridans* presente em 10 pacientes (45,4%), estafilococos agressivos em 4 (18,2%), estafilococos coagulase negativos de menor virulência em 4 (18,2%) e enterococos 4 (18,2%). A condutância microvascular da pele basal foi significativamente aumentada em pacientes com EI, em comparação com indivíduos saudáveis ($0,36 \pm 0,13$ versus $0,21 \pm 0,08$ APU / mmHg; $p < 0,0001$). A vasodilatação microvascular dependente e independente do endotélio foi reduzida em pacientes com EI. O aumento da condutância microvascular induzida pela acetilcolina em pacientes foi de $0,21 \pm 0,17$ e no grupo referência de $0,37 \pm 0,14$ APU / mmHg ($p = 0,0012$). Além disso, o aumento da condutância microvascular induzida pelo nitroprussiato de sódio em pacientes foi de $0,18 \pm 0,14$ e em saudáveis de $0,29 \pm 0,15$ APU / mmHg ($p = 0,0140$). **Conclusão:** As alterações principais da microcirculação cutânea em pacientes com EI encontradas foram uma maior vasodilatação microcirculatória basal e uma redução da reatividade microvascular dependente e independente do endotélio.

Palavras-chave: Endocardite infecciosa, microcirculação, disfunção microvascular, fluxometria microvascular a laser.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Infective endocarditis (IE) is a severe condition with a high in-hospital and 5-year mortality. Few studies have evaluated the microcirculation in patients with IE, and so far, none have utilized laser-based technology. The aim of the study is to evaluate the changes in the cutaneous microvascular bed of patients with IE. **METHODS:** This is a comparative study of patients with definite IE by the modified Duke criteria admitted to our center for treatment. A reference group of sex- and age-matched healthy volunteers was included. Microvascular flow was evaluated in the forearm using a laser speckle contrast imaging system, for noninvasive and continuous measurement of cutaneous microvascular perfusion changes. Laser speckle contrast imaging system was used in combination with skin iontophoresis of acetylcholine, an endothelium dependent vasodilator, and sodium nitroprusside (endothelium independent), to test microvascular reactivity. **RESULTS:** We studied 22 patients with IE; 15 were male and seven female. The mean age and standard deviation (SD) was 45.5 ± 17.3 years. Clinical presentation was acute in 13.6% and subacute in 86.3%. The etiological agents were divided into *viridans* group streptococci, present in 10 patients (45.4%), aggressive staphylococci, in four (18.2%), indolent coagulase negative staphylococci in four (18.2%) and enterococcus in four (18.2%). Basal skin microvascular conductance was significantly increased in patients with IE, compared to healthy individuals (0.36 ± 0.13 versus 0.21 ± 0.08 APU/mmHg; $p < 0.0001$). Endothelial-dependent and-independent microvascular vasodilation was reduced in patients with IE. The increase in microvascular conductance induced by acetylcholine in patients was of 0.21 ± 0.17 and in the reference group it was 0.37 ± 0.14 APU/mmHg ($p = 0.0012$). Moreover, the increase in microvascular conductance induced by sodium nitroprusside in patients was of 0.18 ± 0.14 and in healthy volunteers it was 0.29 ± 0.15 APU/mmHg ($p = 0.0140$). **Conclusion:** The most prominent alterations of the cutaneous microcirculation in patients with IE found were greater basal vasodilation and a reduction of the endothelium-dependent and -independent microvascular reactivity.

Keywords: Infective endocarditis, microcirculation, microvascular dysfunction, speckle contrast imaging.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

1	Figura 1- Representação do sistema farmacológico de microiontoforese de substâncias vasoativas.....	17
2	Figura 2- Sistema de fluxometria laser <i>speckle</i> cutâneo acoplado à micro iontoforese de substâncias vasoativas.....	23
3	Figura 3- Registro representativo do efeito vasodilatador dependente de endotélio observado na microcirculação cutânea de indivíduos jovens e saudáveis.....	25
4	Figura 4 - Comparação entre fluxo microvascular e hematócrito dos pacientes com endocardite infecciosa.....	27
5	Figura 5 – Condutância microvascular cutânea basal e efeitos da iontoforese cutânea de Ach e NPS na reatividade microvascular sistêmica de voluntários saudáveis e pacientes com endocardite infecciosa.....	28
6	Figura 6 – Efeitos da iontoforese cutânea de Ach e nitroprussiato de sódio na reatividade microvascular sistêmica de voluntários saudáveis e pacientes com endocardite infecciosa.....	29
7	Tabela 1 – Características clínicas dos pacientes com EI e grupo referência.....	32
8	Tabela 2 – Comparação da AUC NPS e as variáveis do estudo.....	33
9	Tabela 3 – Comparação da AUC Ach e as variáveis do estudo.....	34
10	Tabela 4 – Comparação do valor de pico da CMC de pacientes com EI após iontoforese de Ach e as variáveis do estudo.....	35
11	Tabela 5 – Comparação do valor de pico da CMC de pacientes com EI após a iontoforese de NPS e as variáveis do estudo.....	36
12	Tabela 6 – Comparação da CMC pico-basal Ach dos pacientes com EI e as variáveis do estudo.....	37
13	Tabela 7 – Comparação da CMC pico-basal NPS dos pacientes com EI e as variáveis do estudo.....	38
14	Tabela 8 – Comparação da CMC pico HRPO de pacientes com EI e as variáveis do estudo.....	39
15	Tabela 9 – Comparação da CMC pico-basal HRPO de pacientes com EI e as variáveis do estudo.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ach	Acetilcolina
AUC Ach	Área sob a curva para a vasodilatação induzida pela acetilcolina
AUC NPS	Área sob a curva para a vasodilatação induzida pelo nitroprusssiato
BRA	Bloqueador do receptor de angiotensina
CEC	Circulação extracorpórea
CMC	Condutância microvascular cutânea
CMC Ach pico	Valor de pico da condutância microvascular cutânea durante iontoforese de acetilcolina
CMC NPS pico	Valor de pico da condutância microvascular cutânea durante iontoforese de nitroprusssiato de sódio
CMC pico-basal Ach	Aumento da condutância microvascular cutânea resultante da iontoforese de acetilcolina
CMC pico-basal NPS	Aumento da condutância microvascular cutânea resultante da iontoforese de nitroprusssiato
CMC pico HRPO	Condutância microvascular cutânea máxima durante a HRPO.
CMC pico-basal HRPO	Aumento da CMC durante a HRPO
EI	Endocarite infecciosa
eNOS	Óxido Nítrico sintetase endotelial
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HRPO	Hiperemia reativa pós-oclusiva
IECA	Inibidor da enzima conversora de angiotensina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NO	Óxido nítrico
NPS	Nitroprusssiato de sódio
PCR	Proteína C reativa
PSAP	Pressão sistólica da artéria pulmonar
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment Score
SD	Desvio padrão
SRIS	<i>Systemic inflammatory response syndrome</i>
UAP	Unidades arbitrárias de perfusão
VE	Ventrículo esquerdo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	16
4 OBJETIVO PRIMÁRIO	20
6 OBJETIVO SECUNDÁRIO	20
7 METODOLOGIA	21
8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
9 RESULTADOS	27
10 DISCUSSÃO	41
11 LIMITAÇÕES DO ESTUDO	47
12 CONCLUSÕES	47
13 REFERÊNCIAS	48

Introdução

A endocardite infecciosa é uma doença em que agentes infecciosos invadem as superfícies endocárdicas, produzindo inflamação e danos. Geralmente são decorrentes da turbulência do fluxo sanguíneo em torno da superfície de uma válvula defeituosa (por exemplo, por dano reumático, por alteração congênita, como a valva aórtica bicúspide, ou em uma prótese valvar disfuncionante), as cordas tendíneas, defeitos estruturais (como comunicação interventricular, cardiomiopatia hipertrófica obstrutiva, coarctação aórtica), o endocárdio mural ou dispositivo intracardíaco (Habib G, et al., 2015, Baddour LM, et al., 2015). A infecção frequentemente produz vegetações, que são estruturas compostas de plaquetas, fibrina e microrganismos (Moreillon P, Que YA, 2004).

As consequências fisiopatológicas e as manifestações clínicas da endocardite surgem devido a: a) lesão de estruturas intracardíacas, com destruição valvar resultando principalmente em regurgitação, evidenciada por sopro novo ou agravamento de sopro já existente, que pode levar a insuficiência cardíaca aguda ou insuficiência cardíaca crônica agudizada, sobretudo quando válvulas do lado esquerdo são afetadas; b) embolização de fragmentos das vegetações, levando a infecção ou infarto dos tecidos afetados (cérebro, artérias coronárias, rim, baço, pulmão, intestino, extremidades); c) estado séptico resultante de bacteremia ou fungemia; d) lesão tecidual devido à deposição de imunocomplexos circulantes, por exemplo, no rim, com conseqüente hematúria microscópica, e/ou glomerulonefrite, no olho (manchas de Roth), ou na pele (nódulos de Osler e manchas de Janeway) (Habib G, et al 2015, Baddour LM, et al., 2015).

É uma doença que, apesar de avanços, tanto nos procedimentos diagnósticos como terapêuticos, ainda possui uma alta mortalidade e morbidade. Apresenta incidência de 3-7 casos para cada 100.000 pessoas ao ano em países desenvolvidos (Baddour LM, et al., 2015). Tem um perfil variável e dinâmico, com mudanças importantes nos últimos anos, variando de acordo com a manifestação clínica inicial, a doença cardíaca subjacente, o microrganismo envolvido, a presença ou ausência de complicações e características do paciente. Houve uma mudança do perfil epidemiológico, principalmente em países desenvolvidos. Havia um predomínio de acometimento em adultos jovens com doença valvar reumática, mas nas duas

últimas décadas ocorreu um aumento do aparecimento da doença em indivíduos idosos e infecções associadas à saúde (incluindo dispositivos intracardíacos, prótese valvar e hemodiálise) e a etiologia estafilocócica tornou-se mais freqüente (Habib G, et al 2015, Baddour LM, et al., 2015). Nos países em desenvolvimento, incluindo o Brasil, ainda predomina a cardiopatia reumática como predisposição para endocardite, e a etiologia estreptocócica (Brandao TJ, et al., 2017).

O uso de técnicas não invasivas no diagnóstico precoce dessa enfermidade e de suas complicações pode ser útil. A avaliação da reatividade microvascular sistêmica revelou-se essencial para a investigação da fisiopatologia das doenças cardiovasculares, metabólicas (Rizzoni D, et al., 2011; Struijker-Boudier HA, et al., 2007) e sepse (Vincent JL & Taccone FS, 2016). Entre as doenças cardiovasculares podemos citar a hipertensão arterial sistêmica (HAS), caracterizada pelo aumento da resistência vascular periférica, que reflete em mudanças na microcirculação havendo um prejuízo na vasodilatação dependente do endotélio e rarefação microvascular cutânea (De Boer MP, et al., 2012; Kaiser SE, et al., 2013).

Já a insuficiência cardíaca é caracterizada por redução do débito cardíaco, induzindo como resposta compensatória o aumento da resistência vascular periférica e reduzida capacidade de vasodilatação dependente e independente do endotélio (Andersson SE, et al., 2005, Green DJ, et al., 2006). Os pacientes com insuficiência cardíaca crônica também apresentam distúrbios na resposta termorreguladora da circulação periférica, incluindo a pele (Mahé G, et al., 2012).

É importante compreender melhor a fisiopatologia da endocardite, dada a sua crescente incidência e sua gravidade (Baddour LM, et al., 2015). A taxa de mortalidade intra-hospitalar da EI varia de 15-30%, podendo chegar a 79% em pacientes com insuficiência cardíaca, complicações perianulares e infecção por *S. aureus* (Baddour LM, et al., 2015). A sua principal complicação é a insuficiência cardíaca (presente em 42-60% dos casos que acometem a valva nativa) sendo esta a mais comum indicação de cirurgia (Habib G, et al., 2015). Aproximadamente 50% dos pacientes são submetidos à cirurgia valvar durante a fase ativa da doença, (Habib G, et al., 2015, Baddour LM, et al., 2015). Além disso, eventos embólicos sistêmicos ocorrem em 20 a 50% dos casos, podendo se apresentar antes do diagnóstico, durante o tratamento ou até mesmo depois da terapêutica. Até 65% dessas embolizações ocorrem para o sistema nervoso central (Baddour LM, et al., 2015). Quando analisada a casuística da nossa instituição, a frequência de

embolização é de 50%, sendo 23% para SNC e 33% para baço. Possui taxa de mortalidade de 24% e 74% dos pacientes são submetidos à cirurgia, uma vez que somos um centro de referência em cirurgia cardíaca (Monteiro TS, et al.,2017).

Referencial teórico

No levantamento bibliográfico utilizando os descritores *endocarditis AND microcirculation; e endocarditis AND endothelial dysfunction*, pelo PubMed, Scopus e Cochrane, e os descritores endocardite bacteriana AND microcirculação no LILACS, só foi encontrado um artigo que estudou as alterações da microcirculação cutânea em pacientes com endocardite infecciosa. Neste artigo, a avaliação microvascular foi realizada através da capilaroscopia periungueal, um método diferente do que foi utilizado no nosso estudo, pois fornece informações essencialmente sobre a morfologia capilar. Nesse artigo foram incluídos 26 pacientes com endocardite infecciosa e em 13 deles foi encontrado um padrão microvascular anormal, que mostrou uma correlação estatisticamente significativa entre o número de anormalidades capilares, envolvimento sistêmico e distúrbios imunológicos. Porém, devido à falta de especificidade, a microscopia capilar periungueal não pôde ser considerada como uma ferramenta útil para o diagnóstico da endocardite infecciosa (Piette JC, et al., 1989).

A técnica de fluxometria microvascular a laser oferece uma abordagem inovadora para avaliação não invasiva da função endotelial microvascular cutânea, já comprovada em pacientes que apresentam doenças cardiometabólicas (Roustit M, et al., 2010; Cordovil I, et al., 2012; Millet C, et al., 2011).

A microcirculação cutânea pode ser considerada um espelho da microcirculação sistêmica (Mahé G, et al., 2012). A reatividade microvascular cutânea tem sido correlacionada com a função microvascular em diferentes leitos vasculares, tanto em relação à magnitude quanto aos mecanismos subjacentes (De Boer MP, et al., 2012; Holowatz LA, et al., 2008; Roustit M and Cracowski JL, 2013).

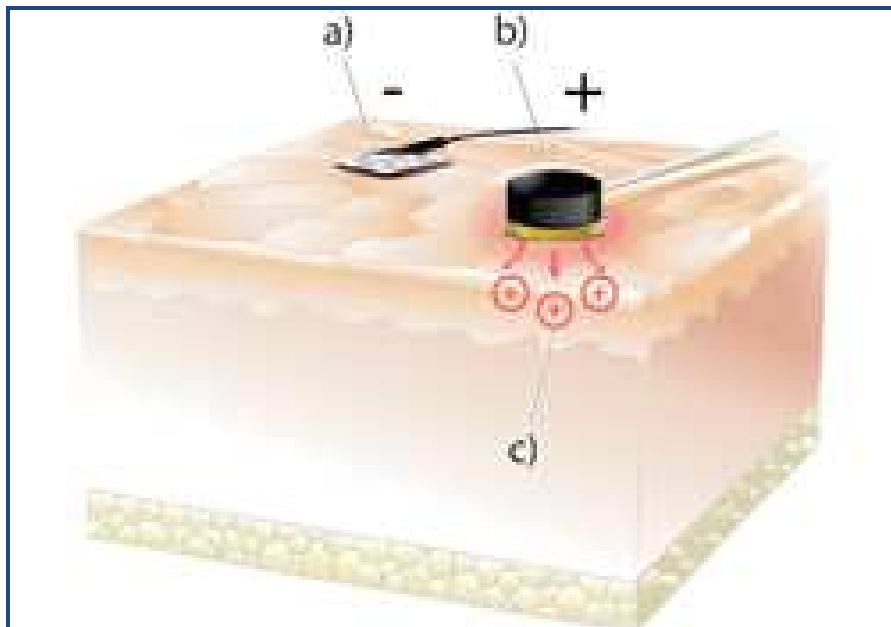
A pele, por ser um sítio acessível, foi usada como modelo de circulação para investigar mecanismos vasculares em uma variedade de doenças, incluindo hipercolesterolemia (Khan F, et al., 1999), HAS (De Boer MP, et al., 2012, Kaiser SE, et al., 2013), hiper-homocisteinemia (Abahji TN, et al., 2007), doença renal (Stewart J, et al., 2004), diabetes (Gomes MB, et al., 2008; Sokolnicki LA, et al., 2006) e doença arterial coronariana (Tibiriça EV, et al., 2014; Souza EG, et al., 2014).

A hiperemia reativa pós-oclusiva (HRPO), induzida pela vasodilatação, é considerada um índice útil da reatividade microvascular global, pelo menos parcialmente dependente da função endotelial. Diferentes mediadores endoteliais

parecem estar envolvidos na resposta hiperêmica que se segue a oclusão arterial, incluindo o óxido nítrico, metabólitos da ciclo-oxigenase, e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio. Este é também o caso para a vasodilatação dos microvasos resultante da iontoforese de acetilcolina, que está claramente relacionada com a função endotelial. Em contraste, a vasodilatação que resulta da iontoforese de nitroprussiato de sódio, que é um doador direto de óxido nítrico, é aparentemente independente da função endotelial (Roustit M, et al., 2010).

A técnica de iontoforese (figura1) avalia de forma não invasiva, estímulos farmacológicos no endotélio, através de administração transdérmica de substâncias vasoativas através de correntes elétricas de baixa intensidade. O princípio que rege essa técnica está no fato das moléculas da droga de solução se encontrarem carregadas positivamente ou negativamente, migrando através da pele sob a influência de uma corrente monopolar aplicada (Alam TA, et al. 2005) .

FIGURA 1: Representação do sistema farmacológico de microiontoforese de substâncias vasoativas. a) Eletrodo de dispersão; b) Eletrodo de infusão; c) Migração transdérmica de íons.



Fonte: Adaptado de Souza EG, De Lorenzo A, Huguenin G, Oliveira GM, Tibiriçá E. 2014

Na literatura são encontrados estudos demonstrando as alterações microvasculares presentes na sepse (Ospina-Tascon G, et al.,2010; De Backer D, et al.,2010) . Kiss e colaboradores (Kiss F et al,2015) publicaram um artigo demonstrando que a disfunção microcirculatória está presente já nas fases iniciais da sepse, antes mesmo da deterioração de parâmetros hemodinâmicos.

O paciente com endocardite pode apresentar vários espectros da doença, dependendo do agente etiológico, do momento em que é diagnosticado, das comorbidades, das complicações (como insuficiência cardíaca, com ou sem choque cardiogênico, ou ainda choque séptico associado) e da resposta imunológica. Deste modo; possivelmente no caso dos pacientes com endocardite aguda estafilocócica poderiam ser encontrados achados semelhantes aos modelos de sepse estudados.

A microcirculação é formada por arteríola, capilar e vênulas, vasos sanguíneos com diâmetro inferior a 150 μm . Esses vasos, chamados em seu conjunto de microcirculação, são os principais carreadores de oxigênio e nutrientes do sangue para os tecidos. Esse sistema garante a adequação da oferta tecidual de oxigênio à demanda celular (Roustit M & Cracowski JL, 2013). No caso de disfunção deste sistema, sobrevém a má distribuição do fluxo sanguíneo e a hipóxia tecidual. As células endoteliais desempenham um papel central no sistema de controle do funcionamento da microcirculação por regularem a trombose e fibrinólise microvascular, a adesão e migração leucocitária, o tônus arteriolar, a permeabilidade e o recrutamento capilar, todos determinantes do fluxo sanguíneo capilar e, por conseguinte, da oferta de oxigênio aos tecidos (Ince C,et al., 2016).

Na sepse, as células endoteliais microvasculares não são mais capazes de desempenhar a sua função reguladora. O óxido nítrico (NO) é um ativador da enzima guanilato ciclase, responsável pela produção de monofosfato cíclico de guanosina (cGMP), que é o mediador do relaxamento da musculatura lisa. Esse sistema é modificado por uma expressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) heterogênea em diferentes órgãos, resultando no desvio patológico de fluxo. Neste evento distributivo, há áreas que apresentam deficiência da iNOS tendo menos vasodilatação induzida por NO e tornando-se subperfundidas (Polat G, et al., 2017; Ince C, 2005).

Na sepse, além da alteração de expressão da iNOS, ocorre maior produção de radicais livres de oxigênio pela enzima nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato (NADPH) oxidase, que interferem com a produção de NO pela óxido nítrico sintase

endotelial (eNOS) e reagem com o NO já formado, reduzindo ainda mais a sua concentração (Ince C, et al., 2016).

A liberação de radicais livres leva a maior adesão de leucócitos, plaquetas e hemácias ao endotélio vascular. Estes e outros mediadores inflamatórios alteram a função de barreira na microcirculação, levando a edema do tecido e mais déficit de extração de oxigênio. Esses distúrbios não corrigidos levam a disfunção microvascular e a falência de órgãos (Polat G, et al., 2017; Penna, G L, et al., 2011).

As células do músculo liso que revestem as arteríolas e regulam a perfusão, perdem na sepse a sensibilidade adrenérgica e o tônus. As hemácias desempenham um papel importante na regulação do fluxo sanguíneo microcirculatório, pela sua capacidade de liberação de NO na presença de hipóxia causando vasodilatação. Esta propriedade reguladora dos glóbulos vermelhos também pode ser afetada. Essas alterações, juntamente com os distúrbios na coagulação, afetam ainda mais a perfusão na microcirculação (Polat G, et al., 2017; Ince C, 2005).

Através do sistema de fluxometria laser existe a possibilidade de se demonstrar se há redução da resposta ao vasodilatador microvascular dependente do endotélio e as respostas vasodilatadoras dependentes do músculo liso (Roustit M, et al., 2010). Essas alterações, que serão avaliadas nos pacientes com diagnóstico de endocardite, caso presentes, poderão ser correlacionadas com o envolvimento sistêmico da microcirculação nesta doença.

Justificativa

A endocardite infecciosa é uma infecção endovascular em que os pacientes muitas vezes se apresentam sépticos e com disfunção cardíaca. Apesar disso, estudos sobre a avaliação da microcirculação em pacientes acometidos por endocardite são escassos na literatura e nenhum utilizou a técnica de fluxometria microvascular a laser cutânea, que pode ser transposta para a microcirculação sistêmica. Portanto, faz-se interessante o estudo de pacientes com endocardite infecciosa quanto à disfunção endotelial microvascular, quando comparados com indivíduos sem endocardite infecciosa ou outras doenças cardiovasculares, utilizando a técnica de fluxometria microvascular a laser, juntamente com estímulos vasodilatadores locais. Este estudo traria a possibilidade de investigar um método para auxiliar na avaliação de alterações microvasculares decorrentes da endocardite infecciosa e correlacionar esses achados com as suas complicações, agentes etiológicos e desfecho.

Objetivo primário

O objetivo desse estudo é descrever as alterações presentes na microcirculação sistêmica de pacientes com endocardite infecciosa pela técnica de fluxometria microvascular a laser.

Objetivos secundários

Correlacionar os achados da avaliação da microcirculação sistêmica com variáveis do estudo, tais como o sexo dos pacientes, as comorbidades e condições associadas (HAS, tabagismo e insuficiência renal), dados referentes ao episódio de endocardite infecciosa como apresentação clínica, agente etiológico, válvula afetada ou estrutura, disfunção sistólica do ventrículo esquerdo, dados ecocardiográficos (pressão sistólica da artéria pulmonar, PSAP), complicações embólicas e não embólicas, número de dias de antibiótico, tratamento cirúrgico, dados laboratoriais (proteína C reativa) e uso de medicações (inibidor da enzima conversora de angiotensina (IECA), bloqueador do receptor de angiotensina (BRA), diuréticos e estatina).

Metodologia

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Cardiologia sob o protocolo nº 52871216.0.0000.5272 e registrado no ClinicalTrials.gov (NCT02940340). Os voluntários da pesquisa foram devidamente informados sobre os procedimentos aos quais seriam submetidos, sendo seu consentimento formalizado através do termo de consentimento livre e esclarecido.

Trata-se de um estudo comparativo que incluiu pacientes com diagnóstico definitivo de endocardite infecciosa pelos critérios modificados de Duke (Li JS, et al., 2000) internados no Instituto Nacional de Cardiologia entre janeiro de 2016 e abril de 2017 e que apresentavam, no momento da inclusão, estabilidade hemodinâmica avaliada pelo investigador de acordo com os seguintes critérios: PAS \geq 90mmHg, ausência de febre, ventilação espontânea e não uso de aminas. Pacientes que já haviam sido submetidos à cirurgia cardíaca foram avaliados com o intervalo mínimo de 15 dias após a mesma, de modo a evitar o período de inflamação pós-operatório. Pacientes com alguma outra condição infecciosa em atividade, como mediastinite, pneumonia ou infecção do trato urinário, foram excluídos. Foram excluídos pacientes menores de 18 anos, pacientes portadores de diabetes *mellitus* e portadores de colagenoses. Foi incluído um grupo referência pareado por sexo e idade. Os dados microvasculares sistêmicos obtidos neste grupo de voluntários saudáveis foram utilizados como valores microcirculatórios de referência em indivíduos isentos de doenças sistêmicas. Nenhum dos voluntários saudáveis apresentava hipertensão arterial, diabetes, dislipidemia ou qualquer outra doença sistêmica.

As variáveis incluídas para os casos de EI foram: dados demográficos (sexo, idade), histórico médico prévio (hipertensão arterial sistêmica (HAS), insuficiência renal em hemodiálise ou em tratamento conservador, tabagismo, doenças valvulares anteriores, intervenções cardíacas), fatores predisponentes para endocardite (EI prévia, doença valvar reumática, cardiopatia congênita, uso de drogas intravenosas, presença de prótese valvar e dispositivos intracardíacos), medicamentos em uso (IECA/BRA, estatina, diuréticos, betabloqueador), dados referentes ao episódio de endocardite infecciosa como tempo de doença, sendo considerada EI aguda pacientes com menos de quatro semanas do início dos sintomas e subaguda com aqueles com mais de quatro semanas; origem: dividida em comunitária e hospitalar,

sendo considerada infecção nosocomial aquela ocorrida mais de 72 horas após a admissão, ou adquirida por meio de um procedimento invasivo realizado nas últimas oito semanas antes do desenvolvimento de sinais e sintomas; patógeno causal, que foi dividido em quatro grupos: 1) estreptococos do grupo *viridans*, e nesse grupo também foi incluído aqueles que apresentaram hemocultura negativa. Este agrupamento foi feito em função de estudo anterior em que foi visto que o mais frequente patógeno isolado em pacientes com EI hemocultura negativa através da análise de reação em cadeia de polimerase da válvula excisada cirurgicamente são os estreptococos do grupo *viridans*, uma vez que são facilmente eliminados do sangue com o uso de antibióticos (Lamas, C, et al. 2016); 2) estafilococos agressivos (que incluem *Staphylococcus aureus* multissensível e resistente a meticilina e *S.lugdunensis*); 3) estafilococos coagulase negativo indolentes e 4) enterococos; válvula ou estrutura afetada; função sistólica do ventrículo esquerdo (VE) presente no ecocardiograma transesofágico realizado no momento do diagnóstico da EI, avaliada de acordo com a análise do ecocardiografista, dividida em ausente ou disfunção leve e disfunção moderada ou grave. Não foi utilizado o valor da fração de ejeção (FE) uma vez que esta não é um bom parâmetro para avaliação da função cardíaca em pacientes com valvopatias regurgitantes, pela possibilidade de superestimar o seu valor, mesmo em pacientes com disfunção cardíaca. Foi avaliado ainda o valor de pressão sistólica de artéria pulmonar (PSAP), como marcador de disfunção cardíaca mais grave; complicações embólicas e não embólicas (abscesso paravalvar, deiscência de prótese, bloqueio atrioventricular, insuficiência cardíaca nova; insuficiência renal), o tratamento antibiótico e cirúrgico e dados laboratoriais (proteína C reativa titulada, hemoglobina, hematócrito, leucócitos, e níveis de creatinina e uréia).

No presente estudo, foi comparada a reatividade microvascular cutânea de indivíduos saudáveis com a de indivíduos com endocardite infecciosa usando a técnica de fluxometria microvascular a laser juntamente com estímulos vasodilatadores locais fisiológicos ou farmacológicos.

Investigação da reatividade microvascular

A reatividade microvascular cutânea foi avaliada através da técnica de fluxometria laser *speckle*, padronizada e validada recentemente em dois centros de investigação clínica da França (Roustit M and Cracowski JL, 2013; Roustit M, et al.,

2012; Rousseau P, et al., 2011). Esta técnica tem sido utilizada na determinação da reatividade microvascular em diferentes estudos clínicos no Núcleo de Pesquisa em Saúde Cardiovascular do Instituto Nacional de Cardiologia (Borges JP, et al., 2016; Verri V, et al., 2015; Souza EG, et al., 2014).

O fenômeno físico do *speckle* representa um fenômeno óptico, causado pela interferência de frentes de ondas eletromagnéticas que sofreram dispersão após a interação com um meio físico. No caso do nosso aparelho, que possui um sistema de aquisição de imagens, a dispersão resulta do movimento das hemácias na microcirculação cutânea (Roustit M and Cracowski JL, 2013). A figura de interferência formada é similar a um conjunto de grãos claros e escuros criando um efeito granulado que na língua inglesa é comumente conhecido como *speckle*, sendo, portanto o termo mais usado para se referir a este fenômeno, que só é observado se a luz que produz a iluminação for uma luz coerente, como é o caso do laser.

Um sistema de fluxometria laser *speckle* (comprimento de onda de 780 nm; PeriCam PSI-NR, Perimed AB, Järfälla, Suécia) acoplado a um sistema farmacológico de micro iontoforese (Perilont, Perimed AB, figura 2) foi utilizado para a avaliação não-invasiva e em tempo real das variações de fluxo microvascular dependentes (acetilcolina) e independentes (nitroprussiato de sódio) de endotélio.

FIGURA 2: Sistema de fluxometria laser *speckle* cutâneo acoplado à micro-iontoforese de substâncias vasoativas. Na técnica de iontoforese, uma corrente elétrica de baixa intensidade carrega íons de substâncias vasodilatadoras através da pele íntegra, resultando em aumento do fluxo sanguíneo microcirculatório e da perfusão tecidual.



Fonte: Adaptado de Souza EG, De Lorenzo A, Huguenin G, Oliveira GM, Tibiriçá E. 2014

A avaliação da microcirculação foi realizada 20 minutos após o repouso na posição supina e uma temperatura ambiente controlada de $(23\pm 1^\circ\text{C})$, e cerca de pelo menos uma hora após uma refeição leve sem cafeína. Os exames foram realizados no período da manhã (entre 8h e 12h).

Imediatamente antes do registro do fluxo micro circulatório, foram medidas a pressão arterial sistólica (PAS) e a pressão arterial diastólica (PAD) duas vezes com intervalo de um minuto entre elas, utilizando um esfigmomanômetro de mercúrio, e o valor médio entre as duas aferições foi utilizado como pressão arterial do paciente, sendo a PAM calculada como $\text{PAD} + [(\text{PAS}-\text{PAD}) / 3]$.

Foram escolhidos aleatoriamente dois pontos na pele na face ventral do antebraço de aproximadamente cinco cm de distância entre eles, evitando-se áreas de pelos, pigmentação alterada, escoriações e veias visíveis. Foram instalados dois eletrodos de micro iontoforese através de adesivos dupla face fornecidos pelo fabricante (LI611 electrodes, Perimed AB, figura 2). e determinadas três áreas de medida, correspondendo a regiões circulares de aproximadamente 80mm^2 . Duas das áreas de medida se encontravam nos eletrodos (iontoforese) e a terceira (hiperemia reativa) era adjacente aos eletrodos. Foi utilizado um sistema de coxins a vácuo (AB Germa, Kristianstad, Sweden) para evitar os artefatos de medida que poderiam resultar dos movimentos do braço.

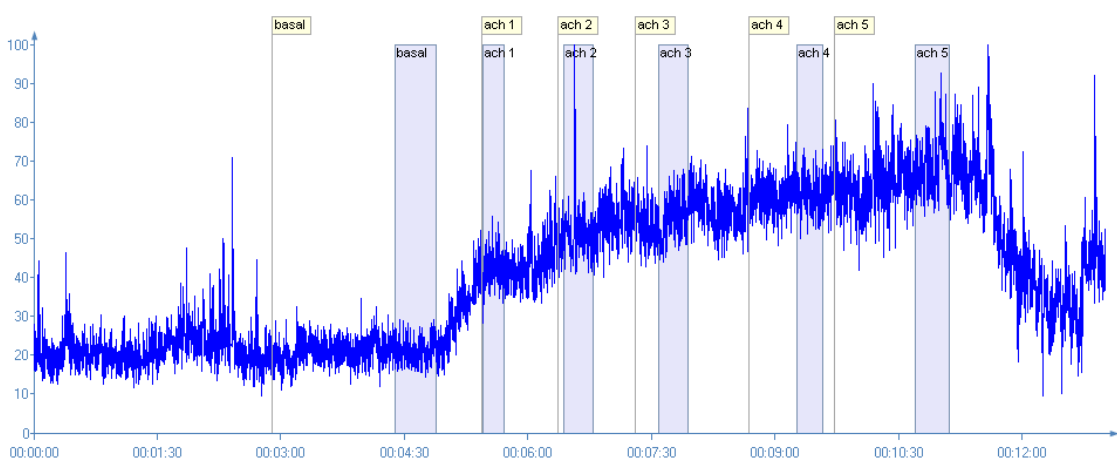
Os eletrodos foram preenchidos com 200 μl de solução a 2% de acetilcolina ou 1% de nitroprussiato de sódio (Sigma Chemical CO, USA) e os eletrodos neutros (dispersão da corrente) foram instalados 15 cm acima dos eletrodos de infusão. Após registro da linha de base do fluxo microvascular cutâneo durante 5 minutos, seis doses de acetilcolina (corrente anódica) ou nitroprussiato de sódio (corrente catódica) de intensidades crescentes de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 μA e tempo de infusão de 10 segundos foram administradas de maneira cumulativa a cada 60 segundos. É importante ressaltar que o protocolo não inclui administração sistêmica de fármacos, o que as substâncias supracitadas ficam apenas em contato com a epiderme dos pacientes.

Para os testes de hiperemia reativa pós-oclusiva (HRPO), a oclusão arterial foi realizada através de manguito pneumático inflado em pressão supra sistólica (50 mmHg acima da pressão sistólica dos pacientes) durante 3 minutos. Após a

liberação do manguito, são medidos os seguintes parâmetros: fluxo cutâneo máximo, aumento da condutância microvascular cutânea e área sob a curva de vasodilatação induzida por HRPO.

As medidas de fluxo microvascular cutâneo, em unidades arbitrárias de perfusão (UAP), foram divididas pela pressão arterial média para gerar dados de condutância microvascular cutânea (CMC), expressas em unidades de UAP/mmHg. O sinal emitido pelo laser *speckle* é proporcional ao número e à velocidade de células sanguíneas em movimento em microvasos superficiais da pele (capilares e arteríolas terminais), sendo que o feixe de raios laser que ilumina a pele é refletido pelas células em movimento e gera um sinal correlacionado de maneira linear com o fluxo de hemácias. O sinal é semi-quantitativo e expresso em unidades de perfusão (PU, *perfusion units*), de acordo com o consenso europeu (*European Laser Doppler Users Groups*, Londres1992). O sinal de laser *speckle* foi registrado em computador através de software de aquisição automática de dados (Perisoft for Windows) (figura3).

FIGURA 3: Registro representativo do efeito vasodilatador dependente de endotélio observado na microcirculação cutânea de indivíduos jovens e saudáveis, utilizando a metodologia descrita acima.



Ach- Acetilcolina

Fonte: Adaptado de Souza EG, De Lorenzo A, Huguenin G, Oliveira GM, Tibiriçá E. 2014

Análise estatística

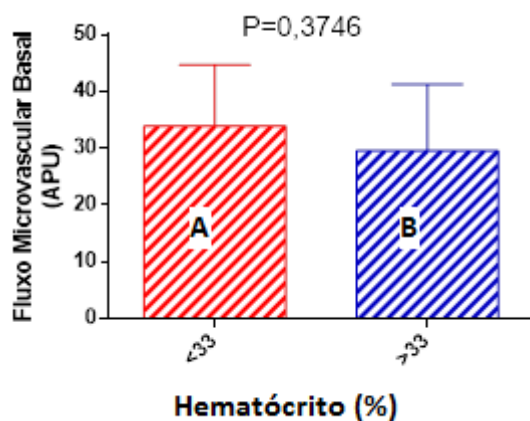
Foi utilizado teste t independente (não-pareado) para comparação dos voluntários saudáveis e os pacientes com EI. Foram correlacionados os resultados do estudo de intervenção, condutância microvascular cutânea basal e efeitos da iontoforese cutânea de acetilcolina e nitroprussiato de sódio na reatividade microvascular dos participantes do estudo. Os dados clínicos e laboratoriais foram mostrados de forma descritiva. A correlação foi buscada entre os resultados do estudo de intervenção (reatividade microvascular) e características dos pacientes, como o sexo, número de dias de antibiótico, tempo de doença, válvula acometida, agente etiológico, presença de complicações embólicas, disfunção sistólica do ventrículo esquerdo, comorbidades (HAS e insuficiência renal em hemodiálise ou tratamento conservador), uso de medicações (IECA, BRA e estatina), PSAP e PCR. As variáveis numéricas foram submetidas ao teste de normalidade Shapiro-Wilk. Aquelas com distribuição normal (paramétrico), foram analisadas utilizando testes t de Student para comparação entre dois grupos, ANOVA para comparação entre três ou mais grupos e Pearson para comparação entre idade e variável numérica. As variáveis categóricas foram analisadas pelo teste do qui-quadrado e o teste exato de Fisher. Os resultados da comparação são apresentados como média \pm desvio padrão. Para aqueles que não possuem distribuição gaussiana (não paramétrica) foi utilizado o teste de Mann-Whitney para comparação entre dois grupos, Kruskal-Wallis para comparação entre três ou mais grupos e Spearman para comparação entre idade e variável numérica. Os dados foram apresentados como médias e desvio padrão, quando de distribuição normal, como medianas e percentil 25-75 quando não normal. Os valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. O pacote estatístico utilizado foi o Prism versão 6.0 (GraphPad Software Inc. La Jolla, CA, EUA) e o R versão 3.1.0.

Resultados

Foram incluídos 22 pacientes com endocardite infecciosa (EI); suas características clínicas, assim como a do grupo referência, estão apresentadas na tabela 1. Dos pacientes analisados 10 (45,5%) eram portadores de HAS, cinco (22,7%) tinham disfunção renal, sendo três (13,6%) dialítica e apenas dois (9%) tinham relato de tabagismo, porém todos estavam há mais de três meses sem fumar. Nenhum dos pacientes apresentou critérios de resposta inflamatória sistêmica (SIRS) no momento da avaliação. Entre os pacientes com EI oito (36,4%) estavam em uso de IECA/BRA, 10 (45,4%) utilizavam betabloqueador e três (13,6%) faziam uso de estatina. O uso de betabloqueador não foi correlacionado aos resultados de reatividade microvascular, devido a grande variabilidade de classes utilizadas (quatro usavam atenolol, três faziam uso de carvedilol, dois de bisoprolol e um de metoprolol). Havia sido submetidos à cirurgia cardíaca 13 (59,1%), sendo que um paciente com menos de 15 dias do início dos antibióticos e 12 com mais de 15 dias de antibioticoterapia.

Em relação ao hematócrito, os pacientes com EI apresentaram mediana de 33[28,38], e amplitude 22 a 48. Os pacientes foram divididos em hematócrito alto ou baixo, utilizando como ponto de corte a mediana de 33. A comparação entre o fluxo microvascular basal e hematócrito foi igual nos dois grupos com valor de $p=0,345$, como demonstra a figura 04.

FIGURA 4: Comparação entre fluxo microvascular basal (expresso em unidades arbitrárias de perfusão, APU) e hematócrito dos pacientes com endocardite infecciosa. A) Pacientes com endocardite com hematócrito menor que 33% ($n=11$) e B) Pacientes com endocardite com hematócrito maior que 33% ($n=11$).



A condutância microvascular basal da pele se mostrou significativamente aumentada em pacientes com EI, em comparação com indivíduos saudáveis ($0,36 \pm 0,13$ versus $0,21 \pm 0,08$ UAP/mmHg, $p < 0,0001$). A vasodilatação microvascular dependente e independente do endotélio foi reduzida em pacientes com EI, em comparação com o grupo referência. O aumento da condutância microvascular induzida pela acetilcolina nos pacientes foi de $0,21 \pm 0,17$ e nos saudáveis de $0,37 \pm 0,14$ UAP/mmHg ($p = 0,0012$). Além disso, o aumento da condutância microvascular induzida pelo nitroprussiato de sódio em pacientes foi de $0,18 \pm 0,14$ e no grupo referência de $0,29 \pm 0,15$ UAP/mmHg ($p = 0,0140$) (figuras 5 e 6).

FIGURA 5. Condutância microvascular cutânea basal e efeitos da iontoforese cutânea de acetilcolina (Ach) e nitroprussiato de sódio (NPS) na reatividade microvascular sistêmica de voluntários saudáveis (CTL, $n = 30$) e pacientes com endocardite infecciosa (ENDO, $n = 22$). A condutância microvascular cutânea (CMC) é expressa em unidades arbitrárias de perfusão (UAP) divididas pela pressão arterial média, em mmHg. (A) Valores basais de CMC; Aumentos da CMC (pico-basal) após iontoforese de ACH (B) e de NPS (C). Os valores são apresentados como médias \pm DP e foram analisados usando o teste t de Student não-pareado bi-caudal.

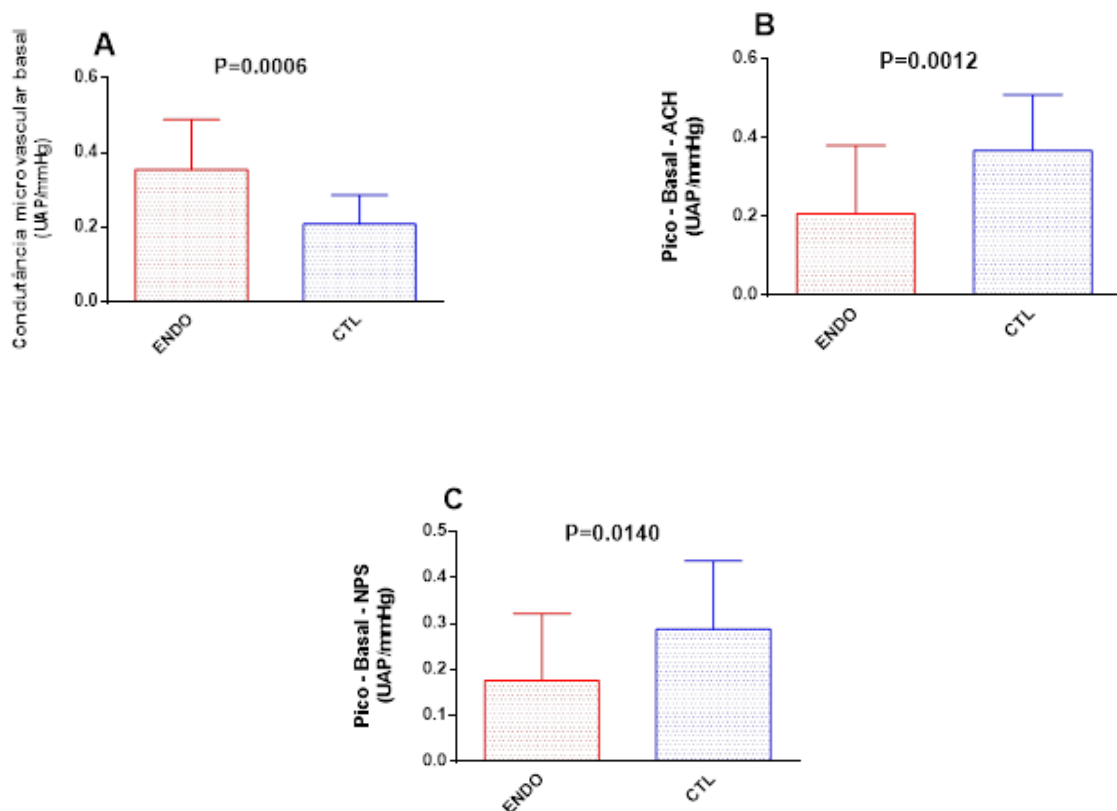
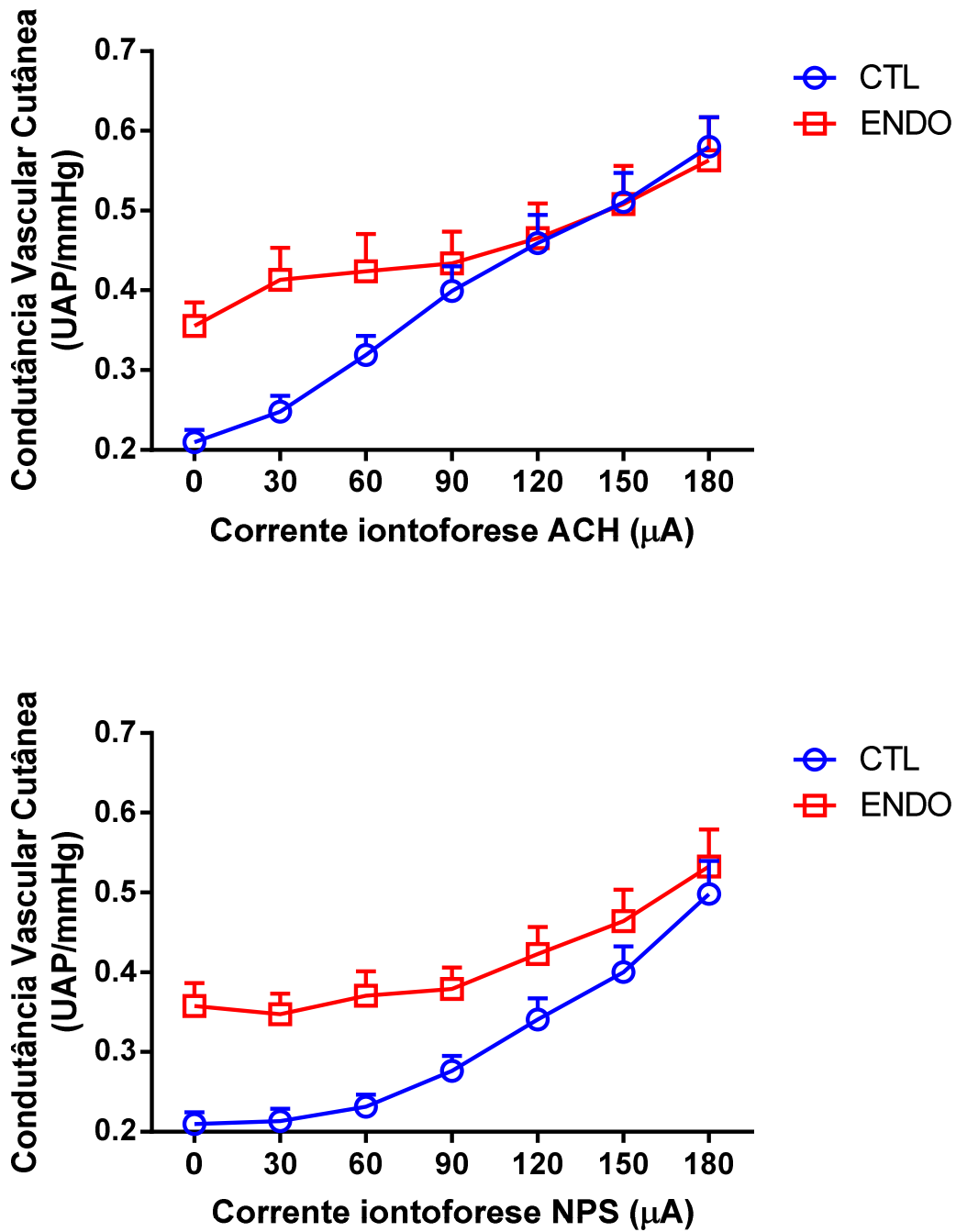


FIGURA 6. Efeitos da iontoforese cutânea de acetilcolina (ACh) e nitroprussiato de sódio (NPS) na reatividade microvascular sistêmica de voluntários saudáveis (CTL, n = 30) e pacientes com endocardite infecciosa (ENDO, n = 22). A condutância microvascular cutânea (CMC) é expressa em unidades arbitrárias de perfusão (UAP) divididas pela pressão arterial média, em mmHg.



A área sob a curva para a vasodilatação induzida pelo nitroprussiato de sódio (AUC NPS) foi correlacionada com as variáveis estudadas nos pacientes com EI conforme mostra a tabela 2. O único valor que apresentou significância estatística foi correlação com dias de antibioticoterapia: aqueles que tinham menos de 15 dias apresentaram uma média de $6714,5 \pm 2867,4$ UAP/s e aqueles com 15 dias ou mais $2828,4 \pm 1749,0$ UAP/s ($p=0,0009$).

Na tabela 3 encontra-se a correlação das variáveis estudadas dos pacientes com EI e a área sob a curva para vasodilatação induzida pela acetilcolina (AUC Ach). Nenhuma variável apresentou significância estatística. A correlação de tipo de válvula e AUC Ach foi realizada com o teste de Kruskal-Wallis para comparação de três ou mais variáveis.

O resultado da correlação do valor de pico da condutância microvascular cutânea de pacientes com EI durante iontoforese de acetilcolina (CMC Ach pico) e as variáveis do estudo são demonstradas na tabela 4. As variáveis que demonstraram significância estatística foram: número de dias de antibiótico com média de $0,76 \pm 0,21$ UAP/mmHg para aqueles com menos de 15 dias e $0,50 \pm 0,22$ UAP/mmHg com 15 dias ou mais ($p=0,02$) e PSAP com média de $0,70 \pm 0,16$ UAP/mmHg para PSAP ≥ 40 e $0,50 \pm 0,25$ UAP/mmHg para PSAP < 40 ($p=0,05$).

O valor de pico da condutância microvascular cutânea dos pacientes com EI após iontoforese de NPS (CMC NPS pico) mostrou correlação estatisticamente significativa apenas com dias de antibioticoterapia (mediana de $0,79$ UAP/mmHg $<$ de 15 dias e $0,42$ UAP/mmHg para ≥ 15 dias, valor de $p=0,003$). Os resultados são mostrados na tabela 5. A correlação de tipo de válvula e CMC NPS pico foi realizada com o teste de Kruskal-Wallis para comparação de três ou mais variáveis e a análise dessa correlação não mostrou diferença entre as válvulas estudadas.

Na tabela 6 é mostrada a correlação do aumento da condutância microvascular cutânea resultante da iontoforese de acetilcolina (CMC pico-basal Ach) e as variáveis do estudo. Nenhuma variável demonstrou correlação estatisticamente significativa.

A correlação das variáveis com o aumento da condutância microvascular cutânea resultante da iontoforese do nitroprussiato de sódio (CMC pico-basal NPS) está mostrada na tabela 7. A variável dias de antibiótico mostrou uma média de $0,31$

$\pm 0,14$ UAP/mmHg para aqueles que estavam com menos de 15 dias e $0,13 \pm 0.11$ UAP/mmHg para os com mais de 15 dias, valor de $p=0,004$.

A análise da hiperemia reativa pós-oclusiva (HRPO) não pode ser realizada em quatro pacientes devido a dificuldades técnicas. A relação da condutância microvascular cutânea máxima durante a HRPO (CMC pico HRPO) e o aumento da CMC durante a HRPO (CMC pico-basal HRPO) dos 18 pacientes avaliados e as variáveis do estudo são demonstradas na tabela 8 e 9, respectivamente, porém nenhuma variável demonstrou correlação estatisticamente significativa.

Tabela 1. Características clínicas dos pacientes com EI e grupo referência.

Variáveis	Pacientes com EI (n=22)	Voluntários saudáveis (n=30)	Valor de p
Idade (anos)	45,5 ± 17,3	42,1 ± 0,6	0,0901
Sexo	15M/7F	15M/15F	0,2587
Válvula [n (%)]	9 (40,9) Aórtica 12 (54,5) Mitral 1 (4,6) Tricúspide	-	-
Origem [n (%)]	19 (86,3) Comunitária 3 (13,6) Hospitalar	-	-
Fatores predisponentes para EI	2 (9,1) EI prévia 2 (9,1) Valvopatia reumática 5 (22,7) CC 2 (9,1) Uso de drogas IV 2 (9,1) Prótese valvar 2 (9,1) Marcapasso	-	-
Tempo de doença	3 (13,6)	-	-
≤1 mês	19 (86,3)		
>1 mês			
Estreptococos do grupo <i>viridans</i> [n (%)]	7 (31,8)	-	-
Hemocultura negativa	3 (13,6)		
Estafilococos agressivos [n (%)]	4 (18,2)		
Estafilococos coagulase negativo indolentes [n (%)]	4 (18,2)		
Enterococos [n (%)]	4 (18,2)		
<15 dias de antibiótico [n (%)]	6 (27,3)	-	-
>15 dias de antibiótico [n (%)]	16 (72,7)		
Hipertensos	10 (45,5)	-	-
Não hipertensos	12 (54,5)		
Disfunção sistólica do VE prévia	1 (4,5)	-	-
Insuficiência renal em HD	3 (13,6)	-	-
IR em tratamento conservador	2 (9,1)		
Embolização [n (%)]	9 (40,9)	-	-
Disfunção sistólica do VE complicando a EI [n (%)]	3 (13,6)	-	-

EI- Endocardite infecciosa; M- Masculino; F- Feminino; CC – Cardiopatia congênita; IV- Intravenoso
VE- Ventrículo esquerdo; HD- Hemodiálise; IR=insuficiência renal

Tabela 2. Comparação da área sob a curva para a vasodilatação induzida pelo nitroprussiato de sódio com as variáveis do estudo.

Variáveis	Média ± Desvio padrão	Valor de p
Sexo masculino feminino	3381.2 ± 2251.1 4974.9 ± 3411.3	0,204
Válvula Aórtica Mitral Tricúspide	4687.4 ± 2253.4 3371.2 ± 3050.1 2901.0	0,528
Tempo de doença ≤1 mês >1 mês	6209,0 ± 5469,8 3521,8 ± 2032,3	0,111
Estreptococos do grupo <i>viridans</i> e hemocultura negativa Estafilococos agressivos Estafilococos coagulase negativo Enterococos	3214.0 ± 1917.7 5203.5 ± 4683.7 3614.5 ± 2515.7 4532.5 ± 2681.7	0,637
Dias de Antibiótico: <15 dias vs ≥15 dias	6714.5 ± 2867.4 2828.4 ± 1749.0	0,0009
Hipertensos Não hipertensos	4047.7 ± 3723.5 3755.4 ± 1585.3	0,807
Disfunção renal presente ou ausente	3896.4 ± 2853.7 3860.6 ± 2376.7	0,980
Em hemodiálise Tratamento conservador	3493.7 ± 1711.8 3950.6 ± 2852.8	0,793
Embolização presente ou ausente	4252.6 ± 2252.7 3636.1 ± 3031.4	0,610
Disfunção sistólica do VE mod/grave Disfunção ausente ou leve	6042.7 ± 1048.6 3548.1 ± 2734.3	0,140
PSAP ≥40 <40	4890.9 ± 3683.3 3315.4 ± 1866.5	0,195
Uso de IECA/BRA Sim Não	3490.0 ± 3150.0 4037.6 ± 2607.3	0,682
Uso de estatina Sim Não	6319.0 ± 1267.1 3645.2 ± 2697.8	0,188
PCR ≥7 <7	3521.0 ± 1464.9 3946.3 ± 2868.7	0,807

Foi utilizado o Teste t para comparação entre dois grupos e ANOVA para comparação entre 3 ou mais grupos.
VE= Ventrículo esquerdo; IECA= Inibidor da enzima conversora de angiotensina; BRA= Bloqueador do receptor de angiotensina; PCR= Proteína C reativa.

Tabela 3. Comparação da área sob a curva para vasodilatação induzida pela acetilcolina com as variáveis do estudo

Variáveis	Mínimo	P25	Mediana	P75	Máximo	Valor de p
Sexo masculino	549	1570	4188	5275	11694	1,000
feminino	194	1644	2883	7964	14669	
Tempo de doença ≤1 mês	2163	2523	2883	3536	4188	0,718
>1 mês	194	1280	4408	5564	14669	
Estreptococos do grupo <i>viridans</i> e hemocultura negativa	977	1994	3751	5454	11694	0,089
Estafilococos agressivos	2883	3862	4454	4886	5389	
Estafilococos coagulase negativo	549	742	810	1150	2163	
Enterococos	194	3919	8185	12074	14669	
Dias de Antibiótico <15 dias	2163	2863	3645	5144	14669	0,494
≥15 dias	194	936	3641	5305	11694	
Hipertensos	194	1000	2523	3914	14669	0,090
Não hipertensos	813	2568	4940	5905	11694	
Disfunção renal presente	194	549	2163	4719	11209	0,401
ausente	806	1706	4188	5389	14669	
Em hemodiálise	194	371	549	2634	4719	0,132
Tratamento conservador	806	1934	4188	5564	14669	
Embolização presente	194	1706	2856	4719	14669	0,695
ausente	806	1582	4188	5389	11694	
Disfunção sistólica do VE mod/grave	2163	2510	2856	7275	11694	0,787
Disfunção ausente ou leve	194	1280	4188	5275	14669	
PSAP ≥40	1582	2683	3741	5476	11694	0,482
<40	194	854	3641	5050	14669	
Uso de IECA/BRA Sim	194	3292	5169	9842	14669	0,294
Não	549	1431	2988	4829	11694	
Uso de estatina Sim	194	686	1178	1671	2163	0,139
Não	549	1675	4298	5476	14669	
PCR ≥7	2856	3632	4408	5564	4719	0,857
<7	194	1280	3094	4564	14669	

Foi utilizado teste de Mann-Whitney para comparação entre dois grupos
 VE= Ventrículo esquerdo; IECA= Inibidor da enzima conversora de angiotensina; BRA= Bloqueador do receptor de angiotensina; PCR= Proteína C reativa.

Tabela 4. Comparação do valor de pico da condutância microvascular cutânea de pacientes com EI após iontoforese de Ach e com as variáveis do estudo.

Variáveis	Média ± Desvio padrão	Valor de p
Sexo masculino	0,52 ± 0,21	0,116
feminino	0,69± 0,27	
Válvula Aórtica	0,57± 0,25	0,835
Mitral	0,56± 0,25	
Tricúspide	0,72	
Tempo de doença ≤1 mês	0,60±0,19	0,860
>1 mês	0,57± 0,25	
Estreptococos do grupo <i>viridans</i> e hemocultura negativa	0,52 ± 0,18	0,309
Estafilococos agressivos	0,71±0,25	
Estafilococos coagulase negativo indolentes	0,45±0,18	
Enterococos	0,69±0,38	0,023
Dias de Antibiótico <15 dias	0,76±0,21	
≥15 dias	0,50± 0,22	
Hipertensos	0,55± 0,20	0,713
Não hipertensos	0,59±0,28	
Disfunção renal presente	0,63±0,29	0,543
ausente	0,55 ± 0,23	
Em hemodiálise	0,49±0,22	0,523
Tratamento conservador	0,58± 0,25	
Embolização presente	0,64±0,26	0,270
ausente	0,52 ± 0,23	
Disfunção sistólica do VE mod/grave	0,74± 0,09	0,188
Disfunção ausente ou leve	0,54± 0,25	
PSAP≥40	0,70±0,16	0,053
<40	0,50±0,25	
Uso de IECA/BRA Sim	0,68±0,29	0,192
Não	0,53 ±0,21	
Uso de estatina Sim	0,46±0,26	0,528
Não	0,58 ± 0,24	
PCR ≥7	0,63± 0,17	0,643
<7	0,56 ± 0,25	

Foi utilizado Teste t para comparação entre dois grupos e ANOVA para comparação entre 3 ou mais grupos.

EI= endocardite infecciosa; Ach= acetilcolina ; VE= Ventrículo esquerdo; IECA= Inibidor da enzima conversora de angiotensina; BRA= Bloqueador do receptor de angiotensina; PCR= Proteína C reativa.

Tabela 5. Comparação do valor de pico da condutância microvascular cutânea de pacientes com EI após a iontoforese de NPS e as variáveis do estudo.

Variáveis	Mínimo	P25	Mediana	P75	Máximo	Valor de p
Sexo Masculino	0,27	0,37	0,45	0,57	1,00	0,298
Feminino	0,36	0,46	0,56	0,69	0,97	
Tempo de doença ≤1 mês	0,27	0,56	0,86	0,91	0,97	0,523
>1 mês	0,34	0,38	0,47	0,57	1,00	
Estreptococos do grupo <i>viridans</i> e hemocultura negativa	0,35	0,36	0,40	0,52	0,67	0,415
Estafilococos agressivos	0,27	0,49	0,77	0,98	1,00	
Estafilococos coagulase negativo indolentes	0,45	0,48	0,52	0,63	0,86	
Enterococos	0,34	0,38	0,52	0,68	0,73	
Dias de Antibiótico <15 dias	0,41	0,62	0,79	0,94	1,00	0,003
≥15 dias	0,27	0,36	0,42	0,54	0,67	
Hipertensos	0,27	0,39	0,46	0,67	0,97	0,923
Não hipertensos	0,34	0,37	0,54	0,60	1,00	
Disfunção renal presente	0,39	0,45	0,56	0,65	0,86	0,359
ausente	0,27	0,36	0,47	0,58	1,00	
Em hemodiálise	0,39	0,42	0,45	0,51	0,56	0,929
Tratamento conservador	0,27	0,37	0,49	0,66	1,00	
Embolização presente	0,36	0,41	0,56	0,66	0,86	0,324
ausente	0,27	0,36	0,47	0,55	1,00	
Disfunção sistólica do VE mod/grave	0,58	0,62	0,67	0,76	0,86	0,069
Disfunção ausente ou leve	0,27	0,37	0,45	0,56	1,00	
PSAP ≥40	0,36	0,45	0,62	0,88	1,00	0,082
<40	0,27	0,37	0,43	0,55	0,73	
Uso de IECA/BRA Sim	0,36	0,38	0,49	0,63	0,73	0,971
Não	0,27	0,38	0,48	0,59	1,00	
Uso de estatina Sim	0,39	0,51	0,62	0,74	0,86	0,623
Não	0,27	0,37	0,48	0,60	1,00	
PCR ≥7	0,41	0,48	0,56	0,57	0,58	0,651
<7	0,27	0,37	0,47	0,66	1,00	

Foi utilizado o teste de Mann-Whitney para comparação entre dois grupos.

EI= endocardite infecciosa; NPS= nitroprussiato de sódio ; VE= Ventrículo esquerdo; IECA= Inibidor da enzima conversora de angiotensina; BRA= Bloqueador do receptor de angiotensina; PCR= Proteína C reativa.

Tabela 6. Comparação do aumento da condutância microvascular cutânea resultante da iontoforese de acetilcolina dos pacientes com EI e as variáveis do estudo.

Variáveis	Média ± Desvio padrão	Valor de p
Sexo masculino	0,18 ± 0,15	0,314
feminino	0,26 ± 0,20	
Válvula Aórtica	0,21 ± 0,18	0,997
Mitral	0,21 ± 0,18	
Tricúspide	0,21	
Tempo de doença ≤1 mês	0,18 ± 0,25	0,764
>1 mês	0,21 ± 0,18	
Estreptococos do grupo <i>viridans</i> e hemocultura negativa	0,21 ± 0,12	0,056
Estafilococos agressivos	0,26 ± 0,12	
Estafilococos coagulase negativo indolentes	0,03 ± 0,11	
Enterococos	0,34 ± 0,25	
Dias de Antibiótico <15 dias	0,28 ± 0,14	0,235
≥15 dias	0,18 ± 0,17	
Hipertensos	0,16 ± 0,14	0,247
Não hipertensos	0,25 ± 0,19	
Disfunção renal presente	0,22 ± 0,22	0,875
ausente	0,21 ± 0,16	
Em hemodiálise	0,12 ± 0,09	0,335
Tratamento conservador	0,22 ± 0,18	
Embolização presente	0,23 ± 0,18	0,565
ausente	0,19 ± 0,16	
Disfunção sistólica do VE mod/grave	0,30 ± 0,18	0,356
Disfunção ausente ou leve	0,20 ± 0,17	
PSAP ≥ 40	0,26 ± 0,13	0,290
<40	0,18 ± 0,19	
Uso de IECA/BRA Sim	0,28 ± 0,21	0,205
Não	0,18 ± 0,15	
Uso de estatina Sim	0,10 ± 0,08	0,334
Não	0,22 ± 0,17	
PCR ≥ 7	0,21 ± 0,03	0,994
<7	0,21 ± 0,18	

Foi utilizado o Teste t para comparação entre dois grupos e ANOVA para comparação entre 3 ou mais grupos.

EI= endocardite infecciosa; VE= Ventrículo esquerdo; IECA= Inibidor da enzima conversora de angiotensina; BRA= Bloqueador do receptor de angiotensina; PCR= Proteína C reativa.

Tabela 7. Comparação do aumento da condutância microvascular cutânea resultante da iontoforese do nitroprussiato de sódio dos pacientes com EI e as variáveis do estudo.

Variáveis	Média ± Desvio padrão	Valor de p
Sexo masculino	0,17 ±0,14	0,623
feminino	0,20± 0,14	
Válvula Aórtica	0,18± 0,17	0,880
Mitral	0,18± 0,13	
Tricúspide	0,11	
Tempo de doença ≤1 mês	0,26 ±0,21	0,332
>1 mês	0,17 ±0,13	
Estreptococos do grupo <i>viridans</i> e hemocultura negativa	0,16± 0,10	
Estafilococos agressivos	0,28±0,22	0,482
Estafilococos coagulase negativo indolentes	0,13±0,18	
Enterococos	0,16±0,11	
Dias de Antibiótico <15 dias	0,31±0,14	0,004
≥15 dias	0,13± 0,11	
Hipertensos	0,16± 0,16	0,530
Não hipertensos	0,20±0,12	
Disfunção renal presente	0,09±0,14	0,135
ausente	0,20 ± 0,14	
Em hemodiálise	0,05±0,16	0,082
Tratamento conservador	0,20± 0,13	
Embolização presente	0,14±0,12	0,325
ausente	0,20 ± 0,15	
Disfunção sistólica do VE mod/grave	0,27± 0,08	0,219
Disfunção ausente ou leve	0,16± 0,14	
PSAP≥40	0,25 ±0,17	0,062
<40	0,14±0,11	
Uso de IECA/BRA Sim	0,16±0,10	0,759
Não	0,18 ±0,16	
Uso de estatina Sim	0,20±0,03	0,863
Não	0,18 ± 0,15	
PCR ≥7	0,16± 0,07	0,833
<7	0,18 ± 0,15	

Foi utilizado o Teste t para comparação entre dois grupos e ANOVA para comparação entre 3 ou mais grupos. EI= endocardite infecciosa; VE= Ventrículo esquerdo; IECA= Inibidor da enzima conversora de angiotensina; BRA= Bloqueador do receptor de angiotensina; PCR= Proteína C reativa.

Tabela 8. Comparação da condutância microvascular cutânea máxima durante a HRPO de pacientes com EI e as variáveis do estudo.

Variáveis	Média ± Desvio padrão	Valor de p
Sexo masculino	0,84 ±0,27	0,567
feminino	0,93 ±0,34	
Válvula Aórtica	0,99± 0,38	0,208
Mitral	0,80± 0,22	
Tempo de doença ≤1 mês	0,80±0,06	0,667
>1 mês	0,88±0,31	
Estreptococos do grupo <i>viridans</i> e hemocultura negativa	0,75± 0,16	0,250
Estafilococos agressivos	1,08±0,46	
Estafilococos coagulase negativo indolentes	0,83±0,17	
Enterococos	1,02±0,42	
Dias de Antibiótico <15 dias	1,01±0,34	0,130
≥15 dias	0,79± 0,24	
Hipertensos	0,88± 0,15	0,798
Não hipertensos	0,85±0,37	
Disfunção renal presente	1,03±0,29	0,270
ausente	0,83 ± 0,28	
Em hemodiálise	1,03 ± 0,00	0,560
Tratamento conservador	0,85± 0,29	
Embolização presente	0,91±0,30	0,575
ausente	0,83 ± 0,29	
Disfunção sistólica do VE mod/grave	0,82± 0,12	0,792
Disfunção ausente ou leve	0,87± 0,31	
PSAP≥40	0,90 ±0,30	0,587
<40	0,83±0,28	
Uso de IECA/BRA Sim	0,96±0,29	0,405
Não	0,83 ±0,29	
Uso de estatina Sim	0,74±0,00	0,679
Não	0,87 ± 0,29	
PCR ≥7	0,82± 0,08	0,825
<7	0,87 ± 0,30	

Foi utilizado o Teste t para comparação entre dois grupos e ANOVA para comparação entre 3 ou mais grupos. HRPO= hiperemia reativa pós-oclusiva; EI= endocardite infecciosa; VE= Ventrículo esquerdo; IECA= Inibidor da enzima conversora de angiotensina; BRA= Bloqueador do receptor de angiotensina; PCR= Proteína C reativa.

Tabela 9. Comparação do aumento da condutância microvascular cutânea durante a HRPO de pacientes com EI e as variáveis do estudo.

Variáveis	Média ± Desvio padrão	Valor de p
Sexo masculino	0,49±0,20	0,887
feminino	0,47± 0,27	
Válvula Aórtica	0,56±0,31	0,310
Mitral	0,45± 0,15	
Tempo de doença ≤1 mês	0,38±0,17	0,355
>1 mês		
Estreptococos do grupo <i>viridans</i> e hemocultura negativa	0,51 ±0,22	0,378
Estafilococos agressivos	0,43±0,14	
Estafilococos coagulase negativo indolentes	0,64± 0,34	
Enterococos	0,40±0,17	
	0,58±0,30	
	0,55±0,30	
Dias de Antibiótico <15 dias	0,45± 0,16	0,397
≥15 dias	0,48± 0,17	
Hipertensos	0,25±0,48	0,983
Não hipertensos	0,50±0,26	
Disfunção renal presente	0,48 ± 0,22	0,874
ausente	0,55±0,00	
Em hemodiálise	0,48± 0,22	0,754
Tratamento conservador	0,48±0,24	
Embolização presente	0,48 ± 0,21	0,978
Ausente	0,38± 0,19	
Disfunção sistólica do VE mod/grave	0,50± 0,22	0,398
Disfunção ausente ou leve	0,47±0,25	
PSAP≥40	0,55±0,20	0,782
<40	0,45 ±0,22	
Uso de IECA/BRA Sim	0,22±0,00	0,454
Não	0,50 ± 0,21	
Uso de estatina Sim	0,46± 0,18	0,216
Não	0,49 ± 0,22	
PCR ≥7		0,895
<7		

Foi utilizado o Teste t para comparação entre dois grupos e ANOVA para comparação entre 3 ou mais grupos.

HRPO= hiperemia reativa pós-oclusiva; EI= endocardite infecciosa; VE= Ventrículo esquerdo; IECA= Inibidor da enzima conversora de angiotensina; BRA= Bloqueador do receptor de angiotensina; PCR= Proteína C reativa.

Discussão

A endocardite infecciosa é uma infecção endovascular, mais precisamente endocárdica, que leva a alterações de sepse assim como alterações da função cardíaca, sobretudo por regurgitação valvar grave. Apesar disso, não há estudos na literatura avaliando a função microvascular na EI, e até o presente estudo, ainda não havia sido documentado o uso da fluxometria microvascular a laser e reatividade microvascular para avaliação de alterações na microcirculação cutânea de pacientes com EI.

A técnica de fluxometria laser *speckle* é uma técnica baseada na análise de granulação de contraste (*speckles*) geradas pela luz laser refletida, coletada e transmitida para uma tela. Quando a luz laser incide sobre a superfície da pele, as partículas em movimento levam a flutuações do *speckle* no detector (Mahé G, et al., 2012, Cordovil I, et al., 2012) que fornece uma imagem de fluxo sanguíneo microvascular (Humeau-Heutier A, et al., 2012).

A maior fonte de dispersor móvel no tecido biológico são as hemácias (Senarathna J, et al., 2013). Por isso foi avaliado o hematócrito dos pacientes com endocardite. Foi feita a análise separando os pacientes com hematócrito alto ou baixo usando como ponte de corte a mediana de 33. O fluxo microvascular basal foi igual nos dois grupos, e deste modo o hematócrito não apresentou influência nos resultados obtidos.

Os pacientes com EI apresentaram condutância microvascular da pele basal significativamente aumentada e menor reatividade microvascular, em comparação com indivíduos saudáveis. Este achado possivelmente demonstra que pacientes com EI já apresentavam importante vasodilatação inicial e quando submetidos à micro iontoforese com acetilcolina e nitroprussiato mostraram redução da vasodilatação dependente e independente do endotélio, talvez mostrando menor reserva da microcirculação. Essas alterações são causadas possivelmente pela resposta inflamatória sistêmica gerada pela endocardite, e os pacientes se comportam de forma semelhante a pacientes sépticos.

Há décadas sepse é definida como a presença de dois ou mais critérios de inflamação na presença de infecção suspeita ou documentada (Bone et al 1992). No ano de 2016, foi sugerido que sepse fosse definida como uma disfunção orgânica

potencialmente fatal causada por uma resposta imune desregulada a uma infecção caracterizada por suspeita / documentação de infecção associada a um escore de 2 ou 3 no quickSOFA (Sequential Organ Failure Assessment Score) ou aumento de 2 ou mais no SOFA,. Esta situação levaria a um estado hiperdinâmico gerado por uma importante vasodilatação determinando redução da resistência vascular periférica e aumento do índice cardíaco, podendo progredir para choque séptico. Por sua vez, choque séptico seria caracterizado por sepse e a necessidade de vasopressor para elevar a pressão arterial média acima de 65 mmHg e lactato > 2 mmol/L (18 mg/dL) após reanimação volêmica adequada. (Singer, M et al., 2016). Em modelos de sepse as alterações da microcirculação são demonstradas através de técnicas que utilizam visualização e avaliação da densidade e velocidade de fluxo em microvasos de superfícies mucosas (Goedhart PT, et al., 2007; Mazzarelli J, et al., 2005). Em humanos a mais utilizada é a mucosa sublingual devido a sua origem embriológica comum com a mucosa esplâncnica, podendo ser avaliada de forma não invasiva e a beira do leito (Lundy D and Trzeciak S, 2016).

A microscopia intravital, imagem espectral por polarização ortogonal, a técnica *sidestream dark field-imaging* e laser doppler fluxometria são os métodos mais utilizados detectando precocemente a hipoperfusão sistêmica, representada pela diminuição da velocidade do fluxo, maior heterogeneidade, um aumento de vasos com ausência de fluxo e menor densidade de capilares perfundidos (Ospina-Tascon G, et al., 2010; Lipińska-Gediga M, 2016). A falha no fluxo microcirculatório resulta em um “shunt funcional” de sangue, devido um distúrbio do mecanismo de autorregulação, que ocorre por uma alteração na expressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) em algumas áreas do leito microvascular (Colbert J. and Schmidt E., 2016). A principal limitação de todos estes métodos é a dificuldade de seu uso de forma contínua, limitando as informações obtidas àquelas adquiridas no momento da realização do exame (Wu Y, et al., 2014).

Mais recentemente, nos modelos de sepse em animais, vem sendo utilizada a técnica de fluxometria laser *speckle* para avaliação da microcirculação hepática (Wu Y, et al., 2014) e do trato gastrointestinal (Starr A, et al., 2014). Essa técnica permite a realização dessa análise de forma contínua, em maiores áreas e em tempo real (Senarathna J, et al., 2013). Até o momento não foi encontrado na

literatura a sua utilização para análise de microcirculação cutânea em indivíduos humanos sépticos.

As arteríolas, os capilares e as vênulas fazem parte da arquitetura da microcirculação em que funções homeostáticas, hemostáticas e imunes complexas e integradas ocorrem, sendo a função principal da microcirculação exercida pelo endotélio (Ince, C. et al., 2016). Na sepse ocorre disfunção microvascular caracterizada por disfunção endotelial, disfunção da célula do músculo liso vascular e diminuição do tonus vasoconstritor, devido uma hiporresponsividade vascular juntamente com uma menor sensibilidade aos agentes vasopressores, tais como catecolaminas, vasopressina, angiotensina II e serotonina (Levy B, et al., 2010; Lipińska-Gediga M, 2016).

A modulação do NO possui grande relevância na fisiopatologia da sepse, tendo papel fundamental na modulação do fluxo em microvasos mediando o tônus vascular, a vasodilatação excessiva, a hiporreatividade vascular, a adesão leucocitária, a agregação das plaquetas, a formação de microtrombos e a permeabilidade microvascular. Apesar de haver uma maior expressão em determinadas regiões, existe uma heterogeneidade na sua produção (Lundy D and Trzeciak S, 2016).

Onde a iNOS está mal expressa, a vasodilatação pode ser limitada até o grau em que a perfusão não é adequadamente garantida resultando em um shunt patológico do fluxo sanguíneo (Ince, C. Et al., 2016; Lundy D and Trzeciak S, 2016). A alta velocidade do fluxo através de microvasos colaterais patentes diminui o tempo de permanência capilar dos glóbulos vermelhos, diminuindo a difusão de oxigênio e gerando hipoxia adicional envolvendo microvasos perfundidos, o que por sua vez leva a uma extração inadequada de oxigênio necessária para metabolismo celular normal, mesmo no contexto de parâmetros hemodinâmicos normais (Lundy D and Trzeciak S, 2016).

A vasodilatação mediada pelo nitroprussiato de sódio também avalia a alteração estrutural da parede arterial dos microvasos como hipertrofia e proliferação do músculo liso, que causaria um ciclo que perpetua o dano endotelial (Szmitko, et al. ,2003), como demonstrada em doenças crônicas como diabetes (Chan NN, et al., 2003; Katz A, et al., 2001) e doença arterial coronariana (Souza EG, et al., 2014).

Porém a redução da vasodilatação presente nos pacientes com EI provavelmente não revela alteração estrutural e sim funcional, por se tratarem de pacientes com faixa etária mais jovem e pelo o fato de ser uma doença aguda, ainda que em alguns casos a apresentação clínica se dê ao longo de meses.

Em relação à comparação das variáveis do estudo e os resultados da reatividade da microcirculação, os pacientes com EI que fizeram menos que 15 dias de antibioticoterapia apresentaram uma resposta vasodilatadora tanto dependente quanto independente do endotélio melhor em relação aqueles com 15 dias ou mais de antibiótico. A melhor capacidade de vasodilatação independente do endotélio foi demonstrada por uma maior área sob a curva para a vasodilatação induzida pelo nitroprussiato de sódio (AUC NPS), um maior valor de pico da condutância microvascular cutânea após iontoforese de NPS (CMC NPS pico) e um aumento da condutância microvascular cutânea resultante da iontoforese do nitroprussiato de sódio (CMC pico-basal NPS) quando comparado àqueles que haviam feito 15 dias ou mais de antibiótico. Esses dados sugerem uma melhor sensibilidade da camada de músculo liso vascular ao óxido nítrico. Porém esse resultado talvez não esteja relacionado diretamente ao tempo de antibiótico, mas ao fato de um menor número de pacientes com menos dias de antibioticoterapia terem sido submetidos à cirurgia, quando comparado com os pacientes que fizeram um período maior de antibióticos. Observamos que apenas um paciente havia sido submetido à cirurgia dentre aqueles com menos de 15 dias de antibioticoterapia, enquanto 12 de 15 pacientes que fizeram mais de 15 dias de antibiótico já haviam sido submetidos à cirurgia no momento do estudo.

A cirurgia cardíaca com circulação extracorpórea (CEC) leva a injúria endotelial, assim como a um quadro clínico-laboratorial de síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS, *systemic inflammatory response syndrome*), ocorrendo *up-regulation* das moléculas de adesão, ativação de neutrófilos e iniciação da cascata de coagulação (Wan S, et al.,1997). A elevação de marcadores inflamatórios em geral, pode estar presente nos primeiros oito dias após a CEC (Boralessa H, et al., 1986). Deste modo, os pacientes submetidos a cirurgia cardíaca em nosso estudo só foram submetidos a intervenção após 15 dias da cirurgia de troca valvar.

Quando avaliada a vasodilatação dependente do endotélio, observou-se também uma melhor reatividade nos pacientes com menos dias de antibioticoterapia através de um maior valor de pico da condutância microvascular cutânea durante iontoforese de acetilcolina (CMC Ach pico). Este achado também foi visto nos pacientes que apresentavam PSAP \geq 40, marcador de pior função cardíaca, quando, na verdade esperava-se, uma correlação inversa, já que a hipertensão arterial pulmonar é caracterizada por remodelamento vascular pulmonar relacionado a um aumento significativo do estresse oxidativo, lesão endotelial e aumento da resposta inflamatória que desempenham papel importante na patogênese do aumento da vasoconstrição e proliferação de células vasculares. Estudos utilizando videocapilaroscopia periungueal mostram uma redução da densidade capilar, maior largura capilar média e aumento do número de capilares ectásicos em comparação com controles saudáveis (Corrado, A, et al.,2017). Os resultados divergentes encontrados no nosso estudo podem ser explicados pela pequena amostra de pacientes (diferenças de agente etiológico, doenças subjacentes, e o tipo de tratamento realizado- cirúrgico *versus* não cirúrgico).

Apesar de pacientes com endocardite aguda e etiologia estafilocócica apresentaram-se frequentemente com um quadro clínico mais exarcebado e um maior grau de inflamação (Baddour LM, et al., 2015), esse estudo não mostrou diferença relevante dos resultados da avaliação da reatividade da microcirculação quando comparados com pacientes com apresentação subaguda e agentes etiológicos menos agressivos. Possivelmente isso ocorreu porque os pacientes já se encontravam em tratamento há mais tempo, e não se encontravam mais inflamados, pois como visto nos resultados, nenhum deles preenchia critérios para SIRS no momento da execução do protocolo do estudo.

Outro fator que, sabidamente, interfere na função edotelial é o uso de algumas medicações. A literatura demonstra que o uso de IECA/BRA é associado a uma melhora da função endotelial (Mancini GB, et al. 1996; Arcaro G et al. 1999), que pode ser explicada pelo restabelecimento do equilíbrio entre angiotensina II e a bradicinina na parede endotelial e pela melhora da vasodilatação independente de endotélio, devido à propriedade doadora de radical sulfidril (necessária à liberação de NO) pelo endotélio, característica do captopril (Prázný M and Skrha J, 2000). A estatina também está associada a uma melhora dos parâmetros vasculares, devido

o fato de aumentar a produção do NO endotelial através do aumento do nível basal de óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS) (Galyfos G, et al., 2017). Porém, no presente estudo não foi demonstrada uma diferença significativa entre o uso desses medicamentos e os resultados da avaliação da função da microcirculação dependente e independente do endotélio.

Limitações do estudo

- A amostra do estudo é uma amostra de conveniência, com um número restrito de participantes, uma vez que o estudo foi realizado em um centro de referência em cirurgia cardíaca, em que muitos dos pacientes referenciados já se encontravam criticamente doentes, não podendo ser incluídos.
- Há grande heterogeneidade dos pacientes devido a várias diferenças entre eles, como doenças subjacentes, como doença valvular crônica (presente ou não) e insuficiência renal crônica (presente ou não e dependente ou não de hemodiálise); agentes etiológicos, que podem ser mais agressivos, como *Staphylococcus aureus*, ou mais indolentes, como os estreptococos do grupo viridans; o tipo de estrutura envolvida, como as válvulas mitrais ou aórticas e a valva tricúspide (associada ou não a dispositivos).
- O tipo de tratamento recebido pelos pacientes (cirúrgico versus não cirúrgico) e a duração do tratamento no momento do estudo foram diferentes, introduzindo mais variáveis em um grupo já pequeno de pacientes.

Conclusão

Concluimos que pacientes com EI aguda e subaguda apresentam uma maior vasodilatação basal e uma resposta reduzida a vasodilatação dependente e independente do endotélio quando comparado com o grupo referência, avaliada pela técnica de fluxometria microvascular a laser associada à micro iontoforese de acetilcolina e nitroprussiato.

Referências

Abahji TN, Nill L, Ide N, Keller C, Hoffmann U, Weiss N. Acute hyperhomocysteinemia induces microvascular and macrovascular endothelial dysfunction. *Arch Med Res.* 2007; 38: 411–416.

Alam TA, Seifalian AM, Baker D. A review of methods currently used for assessment of in vivo endothelial function. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2005; 29:269-276.

Andersson SE, Edvinsson ML, Alving K, Edvinsson L. Vasodilator effect of endothelin in cutaneous microcirculation of heart failure patients. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology.* 2005; 97:80-85.

Arcaro G, Zenere BM, Saggiani F, Zenti MG, Monauni T, Lechi A, et al. ACE inhibitors improve endothelial function in type 1 diabetic patients with normal arterial pressure and microalbuminuria. *Diabetes Care.* 1999;22: 1536-1542.

Baddour LM, Wilson WR, Bayer AS, Fowler VG Jr, Bolger AF, Levison ME, et al. Infective Endocarditis in Adults: Diagnosis, Antimicrobial Therapy, and Management of Complications A Scientific Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association. *Circulation.* 2015; 132:1-52.

Bone RC, Sibbald WJ, Sprung CL. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. *Chest.* 1992;101:1481-3.

Boralessa H, De Beer FC, Manchie A, Whitwam JG, Pepys MB. C-reactive protein in patients undergoing cardiac surgery. *Anaesthesia.* 1986; 41:11-15.

Borges JP, Lopes GO, Verri V, Coelho MP, Nascimento PMC, Kopiler DA, et al. A novel effective method for the assessment of microvascular function in male patients with coronary artery disease: a pilot study using laser speckle contrast imaging. *Braz J Med Biol Res.* 2016; 49:e5541.

Brandao TJ, Januario-da-Silva CA, Correia MG, Zappa M, Abrantes JA, Dantas AM, et al. Histopathology of valves in infective endocarditis, diagnostic criteria and treatment considerations. *Infection* 2017;45:199-207.

Chan NN, Vallance P, Colhoun HM. Endothelium-dependent and independent vascular dysfunction in type 1 diabetes: Role of Conventional risk factors, sex, and glycemic control. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2003; 23:1048-1054.

Colbert JF and Schmidt EP. Endothelial and microcirculatory function and dysfunction in sepsis. *Clin Chest Med.* 2016; 37: 263-275.

Cordovil I, Huguenin G, Rosa G, Bello A, Kohler O, de Moraes R, et al. Evaluation of systemic microvascular endothelial function using laser speckle contrast imaging. *Microvasc Res.* 2012; 83: 376–379.

Corrado A, Correale M, Mansueto N, Monaco I, Carriero A, Mele A, et al. Nailfold capillaroscopic changes in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension and systemic sclerosis-related pulmonary arterial hypertension. *Microvasc Res.* 2017;114:46-51.

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: 1813-25.

De Boer MP, Meijer RI, Wijnstok NJ, Jonk AM, Houben AJ, Stehouwer CD, et al. Microvascular dysfunction : a potential mechanism in the pathogenesis of obesity – associated insulin resistance and hypertension. *Microcirculation.* 2012; 19: 5-18.

Galyfos G, Sianou A, Filis K. Pleiotropic effects of statins in the perioperative setting. *Ann Card Anaesth* 2017; 20:43-48.

Goedhart PT, Khalilzada M, Bezemer R, Merza J, Ince C. Sidestream Dark Field (SDF) imaging: a novel stroboscopic LED ring-based imaging modality for clinical assessment of the microcirculation. *Opt Express* 2007;15:101–14.

Gomes MB, Matheus ASM, Tibiriçá E. Evaluation of microvascular endothelial function in patients with type 1 diabetes using laser-Doppler perfusion monitoring: Which method to choose? *Microvascular Research.* 2008; 76:132-133.

Green DJ, Maiorana AJ, Siong JH, Burke V, Erickson M, Minson CT, Bilsborough W, O'Driscoll G. Impaired skin blood flow response to environmental heating in chronic heart failure. *Eur Heart J.* 2006; 27: 338–343.

Habib G, Lancellotti P, Antunes MJ, Bongiorno MG, Casalta JP, Del Zotti F, et al. The Task Force for the Management of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC). *European Heart Journal.* 2015; 319:1-54.

Humeau-Heutier A, Buard B, Mahe G, Abraham P. Laser speckle contrast imaging of the skin : interest in processing the perfusion data. *Medical & Biological Engineering & Computing.* 2012; 50:103-105.

Holowatz LA, Thompson-Torgerson CS, Kenney WL. The human cutaneous circulation as a model of generalized microvascular function . *J. Appl. Physiol.* 2008; 105: 370-372.

Ince, Can. The Microcirculation is the motor of sepsis. *Critical Care.* 2005, 9 (suppl 4): S13-S19.

Ince, C, Mayeux PR, Nguyen T, Gomez H, Kellum JA, Ospina-Tascon G, et al. The endothelium in sepsis. *Shock.* 2016; 45:259-270.

Kaiser SE, Sanjuliani AF, Estado V, Gomes MB, Tibiriçá E. Antihypertensive treatment improves microvascular rarefaction and reactivity in low-risk hypertensive individuals. *Microcirculation* 2013; 20: 703–716.

Katz A, Ekberg K, Johansson BL, Wharen J. Diminished skin blood flow in type 1 diabetes: evidence for non-endothelium-dependent dysfunction. *Clinical Science*. 2001; 101:59-64.

Kiss F, Molnar L, Hajdu E, Deak A, Molnar A, Berhes M, Szabo J, Nemeth N, Fulesdi B. Skin microcirculatory changes reflect early the circulatory deterioration in a fulminant sepsis model in the pig. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2015; 30: 470-477.

Khan F, Litchfield SJ, Stonebridge PA, Belch JJ. Lipid-lowering and skin vascular responses in patients with hypercholesterolaemia and peripheral arterial obstructive disease. *Vasc Med*. 1999; 4: 233–238.

Lamas, CC, Fournier PE, Zappa M, Brandão TJD, Januário-da-Silva CA, Correia M, et al. Diagnosis of blood culture-negative endocarditis and clinical comparison between blood culture-negative and blood culture-positive cases. *Infection*. 2016;44:459-466.

Levy B, Collin S, Sennoun N, Ducrocq N, Kimmoun A, Asfar P, et al. Vascular hyporesponsiveness to vasopressor in septic shock: from bench to bedside. *Intensive Care Med*. 2010; 36:2019–2029.

Li JS, Sexton DJ, Mick N, Nettles R, Fowler VG, Jr, Ryan T, Bashore T, Corey GR. Proposed modifications to the Duke criteria for the diagnosis of infective endocarditis. *Clin Infect Dis*. 2000; 30: 633-638.

Lipińska-Gediga M. Sepsis and septic shock — is a microcirculation a main player? *Anaesthesiology Intensive Therapy*. 2016; 48: 261-265.

Lundy DJ and Trzeciak S. Microcirculatory dysfunction in Sepsis. *Crit Care Nurs Clin N Am*. 2011; 23:67-77.

Mahé G, Humeau-Heurtier A, Durand S, Leftheriotis G, Abraham P. Assessment of skin microvascular function and dysfunction with laser speckle contrast imaging. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2012; 5:155-163.

Mancini GB, Henry GC, Macaya C, O'Neill BJ, Pucillo AL, Carere RG, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. The TREND (Trial on Reversing ENdothelial Dysfunction) Study. *Circulation*. 1996; 94: 258-265.

Millet C, Roustit M, Blaise S, Cracowski JL. Comparison between laser speckle contrast imaging and laser Doppler imaging to assess skin blood flow in humans. *Microvasc Res*. 2011; 82: 147–151.

Monteiro TS, Correia MG, Golebiovski WF, Barbosa GIF, Weksler C, Lamas CC. Asymptomatic and symptomatic embolic events in infective endocarditis: associated factors and clinical impact. *Braz J Infect Dis*. 2017 May - Jun;21(3):240-247.

Mazzarelli J, Guglielmi M, Ross F. Leukocyte dynamics measured by orthogonal polarization spectral imaging correlate with video microscopy. *Shock* 2005;23:122-132.

Moreillon P, Que YA. Infective endocarditis. *Lancet*. 2004; 363: 139-149.

Ospina-Tascon G, Neves AP, Occhipinti G, Donadello K, Buchele G, Simion D, et al. Effects of fluids on microvascular perfusion in patients with severe sepsis. *Intensive Care Med*. 2010; 36: 949-55.

Penna, G L, Salgado, D R, Japiassú A M, Kalichsztein, M, Nobre, G F , Villela, N, Bouskela, E. Avaliação da microcirculação: uma nova arma no manejo da sepse? *Rev Bras Ter Intensiva*. 2011; 23: 352-357.

Piette JC, Mouthon JM, Delon MC, Chapelon C, Ziza JM, Wechsler B, Herson S, Godeau P. Cutaneous microcirculation in infectious endocarditis. *Ann Med Interne*. 1989; 140: 372-375.

Polat, G, Ugan RA, Cadirci E, Halici Z. Sepsis and Septic Shock: Current Treatment Strategies and New Approaches. *Eurasian J Med*. 2017; 49: 53-8.

Prázný M, Skrha J. Microcirculation in the skin of the upper extremities in type 1 diabetics using the laser doppler method. *Casopis Lekarů Ceskych*. 2000; 139:309-312.

Rizzoni D, Aalkjaer C, De Ciuceis C, Porteri E, Rossini C, Rosei CA, et al. How to assess microvascular structure in humans. *High Blood Press Cardiovasc Prev*. 2011;18(4):169-77.

Rousseau P, Mahe G, Haj-Yassin F, Durand S, Humeau A, Leftheriotis G and Abraham P. Increasing the "region of interest" and "time of interest", both reduce the variability of blood flow measurements using laser speckle contrast imaging. *Microvasc Res* . 2011; 82: 88-91.

Roustit M, Millet C, Blaise S, Dufournet B and Cracowski JL. Excellent reproducibility of laser speckle contrast imaging to assess skin microvascular reactivity. *Microvasc Res*. 2010; 80: 505-511.

Roustit M, Cracowski JL. Assessment of endothelial and neurovascular function in human skin microcirculation. *Trends Pharmacol Sci*. 2013; 34: 373–384.

Roustit M, Cracowski JL. Non-invasive assessment of skin microvascular function in humans: an insight into methods. *Microcirculation*. 2012; (19): 47-64.

Senarathna J, Rege A, Li N, Thakor N. Laser speckle de contrast imaging: theory instrumentation and applications. *Biomedical Engineering, IEEE*. 2013; 6: 99-110.

Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016;315(8):801–810.

Souza EG, De Lorenzo A, Huguenin G, Oliveira GM, Tibiriçá E. Impairment of systemic microvascular endothelial and smooth muscle function in individuals with early-onset coronary artery disease: studies with laser speckle contrast imaging. *Coron Artery Dis*. 2014 ; 25: 23-28.

Sokolnicki LA, Roberts SK, Wilkins BW, Basu A, Charkoudian N. Contribution of nitric oxide to cutaneous microvascular dilation in individuals with type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006; 292: E314–E318.

Starr A, Sand, CA, Heikal L, Kelly PD, Spina D, Crabtree M, et al. Overexpression of GTP cyclohydrolase 1 feedback regulatory protein is protective in a murine model of septic shock. *Shock*. 2014; 42:432-439.

Stewart J, Kohen A, Brouder D, Rahim F, Adler S, Garrick R, Goligorsky MS. Noninvasive interrogation of microvasculature for signs of endothelial dysfunction in patients with chronic renal failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004; 287: H2687–E2696.

Struijker-Boudier HA, Rosei AE, Bruneval P, Camici PG, Christ F, Henrion D, et al. Evaluation of the microcirculation in hypertension and cardiovascular disease. *Eur Heart J*. 2007;28(23):2834-40.

Szmitko PE, Wang CH, Weisel RD, Jeffries GA, Anderson TJ, Verma S. Biomarkers of vascular disease linking inflammation to endothelial activation: Part II. *Circulation*. 2003; 108: 2041-2048.

Tibiriçá EV, Elaine Souza, Andrea de Lorenzo, Glaucia Moraes. Reduced systemic microvascular density and reactivity in individuals with early onset coronary artery disease. *Microvasc Res*. 2014; 97: 105-108.

Verri V, Brandão A, Tibirica E. The evaluation of penile microvascular endothelial function using laser speckle contrast imaging in healthy volunteers. *Microvasc Res*. 2015; 99:96-101.

Vincent JL & Taccone FS. Microvascular monitoring _Do ‘global’ markers help? *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*. 2016; 30: 399e405

Wan S, Leclerc JL, Vincent JL. Cytokine responses to cardiopulmonary bypass: Lessons learned from cardiac transplantation. *AnnThorac Surg*. 1997; 63: 269-276.

Wu Y, Ren J, Zhou B, Chen J, Wang G, Gu G, et al. Laser speckle contrast imaging for measurement of hepatic microcirculation during the sepsis: A novel tool for early detection of microcirculation dysfunction. *Microvascular Research*. 2015; 97:137–146.

RESEARCH NOTE

Open Access



Evaluation of microvascular endothelial function in patients with infective endocarditis using laser speckle contrast imaging and skin video-capillaroscopy: research proposal of a case control prospective study

Amanda Barcelos¹, Cristiane Lamas^{1,2,3} and Eduardo Tibiriça^{1,4*}

Abstract

Objective: Infective endocarditis is a severe condition with high in-hospital and 5-year mortality. There is increasing incidence of infective endocarditis, which may be related to healthcare and changes in prophylaxis recommendations regarding oral procedures. Few studies have evaluated the microcirculation in patients with infective endocarditis, and so far, none have utilized laser-based technology or evaluated functional capillary density. The aim of the study is to evaluate the changes in the systemic microvascular bed of patients with both acute and subacute endocarditis. This is a cohort study that will include adult patients with confirmed active infective endocarditis according to the modified Duke criteria who were admitted to our center for treatment. A control group of sex- and age-matched healthy volunteers will be included. Functional capillary density, which is defined as the number of spontaneously perfused capillaries per square millimeter of skin, will be assessed by video-microscopy with an epi-illuminated fiber optic microscope. Capillary recruitment will be evaluated using post-occlusive reactive hyperemia. Microvascular flow will be evaluated in the forearm using a laser speckle contrast imaging system for the noninvasive and continuous measurement of cutaneous microvascular perfusion changes. Laser speckle contrast imaging will be used in combination with skin iontophoresis of acetylcholine, an endothelium-dependent vasodilator, or sodium nitroprusside (endothelium independent) to test microvascular reactivity.

Results: The present study will contribute to the investigation of microcirculatory changes in infective endocarditis and possibly lead to an earlier diagnosis of the condition and/or determination of its severity and complications.

Trial registration ClinicalTrials.gov ID: NCT02940340.

Keywords: Infective endocarditis, Microcirculation, Microvascular dysfunction, Speckle contrast imaging, Skin video-capillaroscopy

Introduction

Infective endocarditis (IE) is a disease with a high mortality rate that can potentially lead to severe complications. Its clinical presentation is dynamic and variable; it is dependent on patient age, the presence of comorbidities

(especially underlying valvular heart disease), the causative microorganism and the presence of complications. In recent years, there has been a change in its epidemiological profile, especially in developed countries. Although younger patients with rheumatic valve disease were the predominant population affected by IE, in the last two decades, older individuals and healthcare-associated infections (including those related to intracardiac devices, valve prosthesis and hemodialysis) and a

*Correspondence: etibi@ioc.fiocruz.br

⁴ Laboratory of Cardiovascular Investigation, Oswaldo Cruz Institute, Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro 21045-900, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article

staphylococcal etiology have become more frequent [1, 2]. However, in developing countries, patients with rheumatic valve disease account for a third of all IE cases, and the *viridans* group streptococci is the causative agent in a third of all IE cases [3].

Infective endocarditis is a systemic disease involving the vascular system and is often accompanied by bacteremia or fungaemia. Therefore, it results in a septic state. In addition, acute heart failure or acute-on-chronic heart failure commonly complicates left-sided IE due to valve destruction, which leads to acute valvular regurgitation. Indeed, the most common indication for valve replacement surgery is severe heart dysfunction not amenable to pharmacologic intervention [1–3]. Considering the severity and increasing incidence of IE, it is important to better understand the pathophysiology of the endocarditis syndrome. The use of noninvasive techniques in the early diagnosis of IE and its complications may prove useful. In fact, the evaluation of systemic microvascular reactivity has proven to be very helpful in the investigation of the pathophysiology of cardiovascular and metabolic disorders [4, 5] as well as sepsis [6].

Abnormalities in the microcirculation have been demonstrated through microvascular rarefaction to be present in diseases such as arterial hypertension, diabetes, obesity and metabolic syndrome [5, 7–11]. Moreover, impaired systemic microvascular function, characterized primarily by capillary rarefaction in the skin, has been demonstrated in individuals with increased coronary artery disease risk [12, 13].

The importance of vascular endothelial function in cardiovascular medicine has also been demonstrated using microRNAs (miRs), non-coding RNAs that can regulate gene expression via translational repression and/or post-transcriptional degradation [14]. One of the examples is miR-126, which plays a fundamental role in homeostasis and in the modulation of vascular development. Endothelial function can also be regulated by miRs commonly expressed in endothelial cells. One of the best examples of this is miR-223, a cholesterol homeostasis regulator [14].

Laser speckle contrast imaging, which is used to assess skin microvascular reactivity, allows for innovative and reproducible noninvasive evaluation of tissue flow with high real-time spatial resolution in patients with cardiometabolic diseases [15, 16] and critically ill patients [17, 18]. Moreover, cutaneous microvascular reactivity has been correlated to microvascular function in different vascular beds, both in intensity and regarding the underlying mechanisms [19].

Although IE is the prototype of a septic condition that results in acute heart dysfunction, only one study has addressed microcirculation in infective endocarditis [20],

and thus far, none have utilized laser speckle contrast imaging or functional skin video-capillaroscopy. Studies have shown microvascular changes in sepsis, in which abnormalities are found in early phases even before the deterioration of hemodynamic parameters [21]. These studies show the relationship of microcirculatory changes with organ failure and mortality, which are independent of the systemic hemodynamic variables [21]. It is probable that in acute staphylococcal endocarditis, findings similar to those in the studied sepsis models may be encountered [17, 22].

The goal of this study is to assess microvascular density and reactivity in patients with acute and subacute endocarditis by laser speckle contrast imaging and skin video-capillaroscopy.

Main text

Methods

Study design and place

This is a cohort study that will include patients with a confirmed diagnosis of infective endocarditis who were admitted to the National Institute of Cardiology (NIC) at the Ministry of Health in Rio de Janeiro, Brazil. The NIC is a national reference center for the treatment and research of cardiovascular diseases. Its staff is composed of cardiologists, cardiothoracic surgeons, infectious diseases specialists, specialized nursing staff, physiotherapists and pharmacists as well as technical staff. The investigative resources include echocardiography, computed tomography, magnetic resonance imaging and scintigraphy. The NIC has outpatient units, four intensive care units and operating theatres where approximately 1300 cardiac surgeries are performed yearly.

Study participants and recruitment

Patients will be recruited consecutively and prospectively from the endocarditis cohort. The eligibility criteria are as follows: (1) confirmed IE according to the modified Duke criteria [23]; (2) inpatient treatment at the NIC; (3) clinical stability as evaluated by the investigator; and (4) age ≥ 18 years. The exclusion criterion is a confirmed previous diagnosis of *diabetes mellitus*.

Study variables

The variables to be included are as follows: demographic data (sex, age and ethnicity), previous medical history (comorbidities, previous valvular diseases and cardiac interventions), medications in use, data regarding the episode of IE (date of onset, causative pathogen, affected valve or structure, echocardiographic data, local and systemic embolic and non-embolic complications, antibiotic and surgical treatment) and laboratory data (CRP, ESR and creatinine levels).

Intervention

The evaluation of microvascular endothelial function in patients with infective endocarditis will be performed using laser speckle contrast imaging and skin video-capillaroscopy. These results will be compared to those previously obtained from age- and sex-matched healthy volunteers [13]. The systemic microvascular data obtained from this group of healthy volunteers will be used as reference microcirculatory values of individuals free of systemic diseases. None of the healthy volunteers presented with arterial hypertension, diabetes, dyslipidemia or any other systemic pathology.

Evaluation of microcirculatory reactivity

The microcirculatory tests will be performed in the morning between 8 a.m. and 12 p.m. in an undisturbed, quiet room with a defined stable temperature (23 ± 1 °C) following a 20-min rest period in the supine position. The room temperature will be monitored and adjusted if necessary using air conditioning. The acclimatization period will last until each patient's skin temperature stabilizes [24]. We have previously demonstrated that following 15–20 min of acclimatization, the skin temperature stabilizes at approximately 29 °C [8].

Evaluation of skin microvascular flow and reactivity

Microvascular reactivity will be evaluated using a laser speckle contrast imaging (LSCI) system with a laser wavelength of 785 nm (PeriCam PSI system, Perimed, Järfälla, Sweden), as previously described [25]. LSCI will be used in combination with the iontophoresis of acetylcholine (ACh) or sodium nitroprusside (SNP) for the non-invasive, continuous measurement of cutaneous microvascular perfusion changes in arbitrary perfusion units (APUs). The images will be analyzed using the manufacturer's software (PIMSoft, Perimed, Järfälla, Sweden). One skin site on the ventral surface of the forearm will be randomly chosen for the recordings. Hair, broken skin, areas of skin pigmentation and visible veins will be avoided, and a single drug-delivery electrode will be installed using adhesive discs (LI 611, Perimed, Järfälla, Sweden). A vacuum cushion (AB Germa, Kristianstad, Sweden) will be used to reduce the recording artifacts generated by arm movements. The iontophoresis of ACh 2% w/v or SNP 2% w/v (Sigma Chemical CO, USA) will be performed using a micropharmacology system (PF 751 Perilont USB Power Supply, Perimed, Sweden) with increasing anodal currents of 30, 60, 90, 120, 150 and 180 μ A for 10-s intervals that are spaced 1 min apart, and the total charges will be 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5 and 1.8 mC. The dispersive electrode will be attached approximately 15 cm away from the iontophoresis chamber. The results of the pharmacological tests will be expressed both as peak values (representing

the maximal vasodilation observed following the highest dose of ACh or SNP) and as the area under the curve of vasodilation. The measurements of skin blood flow will be divided by mean arterial pressure values to provide the cutaneous vascular conductance (CVC) in APUs/mmHg.

Microvascular reactivity will also be evaluated using a physiological test known as post-occlusive reactive hyperemia (PORH). During the PORH test, arterial occlusion will be achieved with supra-systolic pressure (50 mmHg above the systolic arterial pressure) using a sphygmomanometer for 3 min. Following the release of pressure, maximum flux will be measured.

Capillaroscopy by intra-vital video-microscopy

Capillary density, i.e., the number of perfused capillaries per mm^2 of skin area, will be assessed by high-resolution intra-vital color microscopy (Moritex, Cambridge, UK), as previously described [8]. Capillaroscopy will be performed using a video microscopy system with an epi-illuminated fiber optic microscope containing a 100-W mercury vapor lamp light source and an M200 objective with a final magnification of 200 \times . The dorsum of the non-dominant middle phalanx will be used for image acquisition, which will occur while the patient is seated comfortably in a constant temperature environment (23 ± 1 °C). Images will be acquired and saved for subsequent offline analysis using a semi-automatic integrated system (Microvision Instruments, Evry, France). Mean capillary density will be calculated as the arithmetic mean of the number of visible (i.e., spontaneously perfused) capillaries in three contiguous microscopic fields of 1 mm^2 each. A blood pressure cuff will then be applied to the patient's arm and inflated to supra-systolic pressure (50 mmHg above the measured systolic arterial pressure) to interrupt blood flow completely for three minutes. After cuff release, images will again be acquired and recorded for 60–90 s, during which a maximal hyperemic response is expected to occur [26–28]. All images will be analyzed by two independent observers who will have no knowledge of the subject's group assignment (control subjects or patients).

Sample size calculations

The prospective power analysis was based on data from previous studies from our group using intravital video-microscopy. This analysis indicated that a sample size of 16 subjects per group would have 80% power at the 5% significance level to detect a difference of 7-capillaries/ mm^2 (the standard deviation) during PORH between groups. The calculations were made using classical power calculations with the formula.

$$n = f(\alpha, \beta) \cdot \frac{2s^2}{\delta^2}$$

where α is the significance level, β is the power of the test, $f(\alpha, \beta)$ is a value calculated from α and β (in this case 7.9), δ is the difference in means that we should be able to detect, and s is the standard deviation determined in previous studies.

Statistical analysis

The results will be presented as the mean \pm SD. For values that do not follow a Gaussian distribution, the medians (25th–75th percentiles) will be presented (Shapiro–Wilk normality test). The results will be analyzed using either two-tailed unpaired Student's t -tests or repeated measures ANOVAs when appropriate. The independent (unpaired) t test will be used because we will compare two unrelated groups, in which the participants (healthy individuals or patients with IE) in each group are different. P values <0.05 will be considered statistically significant. The statistical package to be used for the statistical analyses is Prism version 6.0 (GraphPad Software Inc. La Jolla, CA, USA).

Clinical and laboratory data will be shown descriptively. The correlations between the intervention study results (capillary density and microvascular reactivity) and features of the disease, such as the number of days of presentation, presence of embolic complications and etiological agent, will be determined using Pearson's test if the data are found to be of normal distribution (parametric). If the distribution is not normal (non-parametric), Spearman's test will be used for the analysis.

Discussion

Infective endocarditis remains a disease with high mortality (approximately 15–20% among patients who undergo surgery) and morbidity despite improvements in diagnosis and timely surgical intervention [1, 2]. It is associated with persistent bacteremia or fungaemia and consequent sepsis. Studies evaluating the microcirculation in patients with endocarditis are scarce in the literature. Only one French study, in which nailfold capillary microscopy was used to study twenty-six patients with IE, showed significant correlations of the number of capillary abnormalities with systemic involvement and immunological disturbances [20]. However, the authors concluded that due to the lack of specificity, nailfold capillary microscopy could not be regarded as a useful tool for the diagnosis of infective endocarditis. Another important issue to consider is the relatively frequent occurrence of severe valvular regurgitation leading to acute heart failure in left-sided IE, which may further compromise microcirculation and tissue perfusion, possibly modifying the response of the microvascular endothelium to sepsis.

Several studies have demonstrated the central role of microcirculation in the delivery of nutrients and oxygen

to tissue cells and, therefore, in determining adequate organ perfusion [29, 30]. In sepsis and septic shock, macro and microcirculatory disturbances both contribute to the development of organ failure. Macro and microcirculatory mismatch in septic patients may lead to inappropriate treatment measures and higher mortality [31]. Microcirculation and its effects are a focus of present and future research that aim to improve diagnostic and treatment strategies. Moreover, it has recently been demonstrated that treatment at an early stage of microvascular dysfunction may be most effective for delaying or reversing the disease processes, thus improving the outcome and survival of patients at risk for pulmonary vascular disease [32]. The authors also suggested that this knowledge may be applied toward microvascular dysfunction observed in the skin [32].

In sepsis, microvascular blood flow is disturbed by endothelial dysfunction, which leads to a reduction in flow or no flow at all to some capillary beds, while other beds have above normal flow, even surpassing tissue metabolic demands. This microvascular perfusion heterogeneity results in tissue hypoxia. Endothelial dysfunction in sepsis also results in an inflammatory response, which together with tissue hypoxia, leads to organ failure and mortality [31, 33]. Intravenous fluids and vasoactive agents are important measures in the treatment of sepsis. Intravenous fluids may improve microvascular perfusion, increasing the proportion of perfused capillaries and decreasing flow heterogeneity. However, systemic circulatory changes may be relatively independent of changes in the microcirculation [33, 34].

Our study proposes to evaluate the baseline cutaneous functional capillary density and capillary recruitment (capillary reserve) in patients with IE using PORH. Capillary rarefaction and heterogeneous capillary flow may be shown [18]. In addition to using a laser speckle contrast imaging system, whether microvascular reactivity is normal may be demonstrated with acetylcholine, an endothelium-dependent vasodilator, and sodium nitroprusside, an endothelium-independent vasodilator drug. The results of these studies may be helpful in providing information on the systemic involvement of microcirculation in infective endocarditis.

Limitations and strengths of the study

- The restricted number of participants due to limitations regarding the inclusion of critically ill patients with a diagnosis of infective endocarditis.
- The heterogeneity of patients presenting with IE, which is due to several differences, including underlying diseases, such as chronic valvular disease (present or not) and chronic renal failure (present or not and hemodialysis dependent or not); etiologic agents,

which may be more aggressive, such as *Staphylococcus aureus*, or more indolent, such as *viridans* group streptococci; the type of structure involved, such as the mitral or aortic valves and the tricuspid valve (associated with devices or not); the type of treatment received by the patient (surgical vs. non-surgical); and the duration of treatment at the time of the study protocol.

- The main strength of the present study is the assessment of the usefulness of laser-based noninvasive techniques in the evaluation of systemic microcirculation and its role in the early diagnosis of infective endocarditis and, possibly, its complications.

Authors' contributions

CL and ET contributed to the conception and design of the study and to the analysis and interpretation of data; AB contributed to the acquisition, analysis and interpretation of data; and all 3 authors were involved in drafting the manuscript. CL and ET critically revised the manuscript regarding important intellectual content. All authors have given final approval of the version to be published and are publicly responsible for its contents. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹ National Institute of Cardiology, Ministry of Health, Rio de Janeiro, Brazil. ² National Institute of Infectious Diseases Evandro Chagas, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil. ³ Unigranrio University, Rio de Janeiro, Brazil. ⁴ Laboratory of Cardiovascular Investigation, Oswaldo Cruz Institute, Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro 21045-900, Brazil.

Acknowledgements

The authors would like to thank the nurse Marcio Marinho Gonzalez for his excellent technical assistance.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Availability of data and materials

The datasets generated and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Consent for publication

Not applicable.

Ethics approval and consent to participate

The present study will be conducted in accordance with the Declaration of Helsinki 1975, which was revised in 2000, and this study was approved by the Institutional Review Board (IRB) of the National Institute of Cardiology in Rio de Janeiro, Brazil under protocol # CAAE 52871216.0.0000. Written informed consent to participate in the study will be obtained from all participants.

Funding

Dr. Cristiane Lamas receives a personal research Grant (Number 202.782/2015) from FAPERJ, the Rio de Janeiro State Agency for Research. Dr. Eduardo Tibirica receives financial support from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), FAPERJ (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro) and the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ) in Rio de Janeiro, Brazil.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Received: 18 April 2017 Accepted: 21 July 2017

Published online: 28 July 2017

References

1. Baddour LM, Wilson WR, Bayer AS, Fowler VG Jr, Tleyjeh IM, Rybak MJ, et al. Infective endocarditis in adults: diagnosis, antimicrobial therapy, and management of complications: a scientific statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association. *Circulation*. 2015;132(15):1435–86.
2. Habib G, Lancellotti P, Antunes MJ, Bongiorni MG, Casalta JP, Del Zotti F, et al. 2015 ESC Guidelines for the management of infective endocarditis: the Task Force for the Management of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC). Endorsed by: European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS), the European Association of Nuclear Medicine (EANM). *Eur Heart J*. 2015;36(44):3075–128.
3. Brandao TJ, Januario-da-Silva CA, Correia MG, Zappa M, Abrantes JA, Dantas AM, et al. Histopathology of valves in infective endocarditis, diagnostic criteria and treatment considerations. *Infection*. 2017;45(2):199–207.
4. Rizzoni D, Aalkjaer C, De Ciuceis C, Porteri E, Rossini C, Rosei CA, et al. How to assess microvascular structure in humans. *High Blood Press Cardiovasc Prev*. 2011;18(4):169–77.
5. Struijker-Boudier HA, Rosei AE, Bruneval P, Camici PG, Christ F, Henrion D, et al. Evaluation of the microcirculation in hypertension and cardiovascular disease. *Eur Heart J*. 2007;28(23):2834–40.
6. Vincent JL, Taccone FS. Microvascular monitoring-Do 'global' markers help? *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 2016;30(4):399–405.
7. Francischetti EA, Tibirica E, da Silva EG, Rodrigues E, Celoria BM, de Azevedo VG. Skin capillary density and microvascular reactivity in obese subjects with and without metabolic syndrome. *Microvasc Res*. 2011;81(3):325–30.
8. Tibirica E, Rodrigues E, Cobas RA, Gomes MB. Endothelial function in patients with type 1 diabetes evaluated by skin capillary recruitment. *Microvasc Res*. 2007;73(2):107–12.
9. Kaiser SE, Sanjuliani AF, Estato V, Gomes MB, Tibirica E. Antihypertensive treatment improves microvascular rarefaction and reactivity in low-risk hypertensive individuals. *Microcirculation*. 2013;20(8):703–16.
10. Karaca U, Schram MT, Houben AJ, Muris DM, Stehouwer CD. Microvascular dysfunction as a link between obesity, insulin resistance and hypertension. *Diabetes Res Clin Pract*. 2014;103(3):382–7.
11. De Boer MP, Meijer RJ, Wijnstok NJ, Jonk AM, Houben AJ, Stehouwer CD, et al. Microvascular dysfunction: a potential mechanism in the pathogenesis of obesity-associated insulin resistance and hypertension. *Microcirculation*. 2012;19(1):5–18.
12. Rg IJ, de Jongh RT, Beijik MA, van Weissenbruch MM, Delemarre-van de Waal HA, Serne EH, et al. Individuals at increased coronary heart disease risk are characterized by an impaired microvascular function in skin. *Eur J Clin Invest*. 2003;33(7):536–42.
13. Souza EG, De Lorenzo A, Huguenin G, Oliveira GM, Tibirica E. Impairment of systemic microvascular endothelial and smooth muscle function in individuals with early-onset coronary artery disease: studies with laser speckle contrast imaging. *Coron Artery Dis*. 2014;25(1):23–8.
14. Santulli G. MicroRNAs and Endothelial (Dys) Function. *J Cell Physiol*. 2016;231(8):1638–44.
15. Millet C, Roustit M, Blaise S, Cracowski JL. Comparison between laser speckle contrast imaging and laser Doppler imaging to assess skin blood flow in humans. *Microvasc Res*. 2011;82(2):147–51.
16. Roustit M, Cracowski JL. Assessment of endothelial and neurovascular function in human skin microcirculation. *Trends Pharmacol Sci*. 2013;34(7):373–84.
17. De Backer D, Donadello K, Sakr Y, Ospina-Tascon G, Salgado D, Scolletta S, et al. Microcirculatory alterations in patients with severe sepsis: impact of time of assessment and relationship with outcome. *Crit Care Med*. 2013;41(3):791–9.
18. 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.
19. 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.
20. Piette JC, Mouthon JM, Delon MC, Chapelon C, Ziza JM, Wechsler B, et al. Cutaneous microcirculation in infectious endocarditis. *Ann Med Interne (Paris)*. 1989;140(5):372–5.
21. Kiss F, Molnar L, Hajdu E, Deak A, Molnar A, Berhes M, et al. Skin microcirculatory changes reflect early the circulatory deterioration in a fulminant sepsis model in the pig. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2015;30(7):470–7.

22. Edul VS, Enrico C, Laviolle B, Vazquez AR, Ince C, Dubin A. Quantitative assessment of the microcirculation in healthy volunteers and in patients with septic shock. *Crit Care Med*. 2012;40(5):1443–8.
23. Li JS, Sexton DJ, Mick N, Nettles R, Fowler VG Jr, Ryan T, et al. Proposed modifications to the Duke criteria for the diagnosis of infective endocarditis. *Clin Infect Dis*. 2000;30(4):633–8.
24. Shore AC. Capillaroscopy and the measurement of capillary pressure. *Br J Clin Pharmacol*. 2000;50(6):501–13.
25. Cordovil I, Huguenin G, Rosa G, Bello A, Kohler O, de Moraes R, et al. Evaluation of systemic microvascular endothelial function using laser speckle contrast imaging. *Microvasc Res*. 2012;83(3):376–9.
26. Serne EH, Gans RO, ter Maaten JC, Tangelder GJ, Donker AJ, Stehouwer CD. Impaired skin capillary recruitment in essential hypertension is caused by both functional and structural capillary rarefaction. *Hypertension*. 2001;38(2):238–42.
27. Noon JP, Walker BR, Webb DJ, Shore AC, Holton DW, Edwards HV, et al. Impaired microvascular dilatation and capillary rarefaction in young adults with a predisposition to high blood pressure. *J Clin Invest*. 1997;99(8):1873–9.
28. Antonios TF, Rattray FE, Singer DR, Markandu ND, Mortimer PS, MacGregor GA. Maximization of skin capillaries during intravital video-microscopy in essential hypertension: comparison between venous congestion, reactive hyperaemia and core heat load tests. *Clin Sci (London)*. 1999;97(4):523–8.
29. Ince C, Mayeux PR, Nguyen T, Gomez H, Kellum JA, Ospina-Tascon GA, et al. The endothelium in sepsis. *Shock*. 2016;45(3):259–70.
30. Muller RB, Ostrowski SR, Haase N, Wetterslev J, Perner A, Johansson PI. Markers of endothelial damage and coagulation impairment in patients with severe sepsis resuscitated with hydroxyethyl starch 130/0.42 vs ringer acetate. *J Crit Care*. 2016;32:16–20.
31. Doerschug KC, Delsing AS, Schmidt GA, Haynes WG. Impairments in microvascular reactivity are related to organ failure in human sepsis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293(2):H1065–71.
32. Gaskill CF, Carrier EJ, Kropski JA, Bloodworth NC, Menon S, Foronjy RF, et al. Disruption of lineage specification in adult pulmonary mesenchymal progenitor cells promotes microvascular dysfunction. *J Clin Invest*. 2017;127(6):2262–76.
33. Ospina-Tascon G, Neves AP, Occhipinti G, Donadello K, Buchele G, Simion D, et al. Effects of fluids on microvascular perfusion in patients with severe sepsis. *Intensive Care Med*. 2010;36(6):949–55.
34. Pottecher J, Derudder S, Teboul JL, Georger JF, Laplace C, Benhamou D, et al. Both passive leg raising and intravascular volume expansion improve sublingual microcirculatory perfusion in severe sepsis and septic shock patients. *Intensive Care Med*. 2010;36(11):1867–74.

Submit your next manuscript to BioMed Central
and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

