

ARTIGO ORIGINAL

Reserva linfática reduzida na insuficiência cardíaca com fração de ejeção preservada



Giacomo Rossitto, MD,^{ab} Sheon Mary, PhD,^a Christine McAllister,^c Karla Bianca Neves, PhD,^a Laura Haddow, BSc (Hons),^a John Paul Rocchiccioli, MBChB,^d Ninian Nicholas Lang, MBChB, PhD,^a Clare Louise Murphy, MD,^e Rhian Merry Touyz, MBChB, PhD,^a Mark Colquhoun Petrie, MBChB,^{ad} Christian Delles, MD^a

RESUMO

CONTEXTO A disfunção microvascular desempenha uma função importante na patogênese da insuficiência cardíaca com fração de ejeção preservada (ICFEP). No entanto, ainda não foi investigado nenhum elo mecanicista entre microvasculatura sistêmica e congestão, uma característica central da síndrome.

OBJETIVOS Este estudo teve como objetivo investigar a troca de fluido capilar-interstício em ICFEP, incluindo a drenagem linfática e as forças osmóticas potenciais exercidas por qualquer excesso de Na⁺ no tecido hipertônico.

MÉTODOS Pacientes com ICFEP e indivíduos controle saudáveis com distribuição semelhante de idade e sexo (n = 16 por grupo) foram submetidos a: 1) uma biópsia cutânea para imuno-histoquímica vascular, expressão gênica e análises químicas (água, Na⁺ e K⁺); e 2) pletismografia de oclusão venosa para avaliar o coeficiente de filtração microvascular periférica (medindo o extravasamento de fluido capilar) e a pressão isovolumétrica (acima da qual a drenagem linfática não consegue compensar o extravasamento de fluido).

RESULTADOS Biópsias cutâneas em pacientes com ICFEP apresentaram rarefação de pequenos vasos sanguíneos e linfáticos (p = 0,003 e p = 0,012, respectivamente); linfáticos cutâneos residuais apresentaram diâmetro maior (p = 0,007) e menor expressão de diferenciação linfática e marcadores de função [LYVE-1 (receptor de hialuronano endotelial de vasos linfáticos 1): p < 0,05; PROX-1 (proteína *prospero homeobox* 1): p < 0,001] em comparação aos indivíduos controle. Em pacientes com ICFEP, o coeficiente de filtração microvascular foi menor [panturrilha: 3,30 (intervalo interquartil – IQR): 2,33 a 3,88] L × 100 mL de tecido⁻¹ × min⁻¹ × mmHg⁻¹ vs. 4,66 (IQR: 3,70 a 6,15) μL × 100 mL de tecido⁻¹ × min⁻¹ × mmHg⁻¹; p < 0,01; antebraço: 5,16 (IQR: 3,86 a 5,43) L × 100 mL de tecido⁻¹ × min⁻¹ × mmHg⁻¹ vs. 5,66 (IQR: 4,69 a 8,38) μL × 100 mL de tecido⁻¹ × min⁻¹ × mmHg⁻¹; p > 0,05), em consonância com a rarefação vascular sanguínea e a falta de qualquer excesso de Na⁺ em pele hipertônica observado, mas a drenagem linfática foi prejudicada (pressão isovolumétrica em pacientes com ICFEP vs. indivíduos controle: panturrilha 16 ± 4 mmHg vs. 22 ± 4 mmHg; p < 0,005; antebraço 17 ± 4 mmHg vs. 25 ± 5 mmHg; p < 0,001).

CONCLUSÕES Os vasos linfáticos periféricos em pacientes com ICFEP exibem alterações estruturais e moleculares e não conseguem compensar efetivamente o extravasamento de fluido e o acúmulo intersticial por drenagem proporcional. A reserva linfática reduzida pode representar um novo alvo terapêutico. (J Am Coll Cardiol 2020;76:2817-29)

© 2020 Os autores. Publicado por Elsevier em nome da American College of Cardiology Foundation. Este artigo é de acesso aberto sob a licença CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



Ouçá o áudio com o resumo deste artigo, apresentado pelo editor-chefe, Dr. Valentin Fuster, em JACC.org.

^aInstituto de Ciências Cardiovasculares e Médicas, University of Glasgow, Glasgow, Reino Unido; ^bDepartamento de Medicina, Università degli Studi di Padova, Padova, Itália; ^cCentro de Pesquisa Clínica, Queen Elizabeth University Hospital, Glasgow, Reino Unido; ^dDepartamento de Cardiologia, Golden Jubilee National Hospital, Clydebank, Reino Unido; e ^eDepartamento de Cardiologia, Royal Alexandra Hospital, Paisley, Reino Unido. Os autores informam que estão em conformidade com os comitês de estudos com humanos e com os regulamentos de bem-estar animal de suas respectivas instituições e com as diretrizes da *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos, incluindo o consentimento dos pacientes quando apropriado. Para obter mais informações, acesse o [Author Center](#).

Manuscrito recebido em 23 de junho de 2020; manuscrito revisado em 2 de outubro de 2020 e aceito em 12 de outubro de 2020.

A insuficiência cardíaca (IC) é uma das principais causas de morbidade e mortalidade (1). As tendências atuais de aumento de hospitalizações por IC são impulsionadas principalmente por IC com fração de ejeção preservada (ICFEP), implicando um prognóstico de 1 ano quase tão ruim quanto em pacientes com IC com fração de ejeção reduzida (2-4).

A ICFEP é uma síndrome clínica intimamente associada a várias comorbidades cardiovasculares e fatores de risco, como hipertensão, obesidade, doença arterial coronariana, diabetes melito, fibrilação atrial e doença renal crônica (5). A noção de que essas comorbidades estão não apenas associadas à ICFEP, como também podem estar diretamente envolvidas em sua patogênese por meio de inflamação associada a comorbidade e disfunção microvascular coronariana (6) foi corroborada por um grande corpo de evidências *post-mortem*, não invasivas e invasivas (7-9). Além do leito vascular coronariano, os vasos periféricos também parecem disfuncionais (8). Em especial, foram relatadas como determinantes da intolerância ao exercício em pacientes com ICFEP: a reserva vasodilatadora sistêmica prejudicada e a baixa densidade capilar do músculo esquelético; e a baixa extração de O₂ periférico paralela à rarefação microvascular (4,10-12). Esses achados contestaram o paradigma de um distúrbio puramente cardíaco em favor de um fenômeno mais sistêmico (13). No entanto, ainda não foram investigados se e como uma microcirculação disfuncional poderia impactar diretamente a congestão, “o cerne da síndrome de IC” (5).

Nos últimos anos, a compreensão da homeostase dos fluidos corporais evoluiu devido à reavaliação do acúmulo de sódio (Na⁺) no tecido. Foi sugerido que esse fenômeno era independente de água (14) e que induzia uma expansão da rede linfática impulsionada por hipertonia para facilitar a drenagem local de Na⁺ (15). O excesso de Na⁺ no tecido foi encontrado na maioria das condições e dos fatores de risco associados à síndrome clínica de ICFEP (como idade avançada, hipertensão, diabetes e doença renal crônica) (16-18), mas sua natureza hipertônica e sua relevância funcional para homeostase de fluidos em ICFEP carece de demonstração.

Assim, o estudo HAPPIFY (*Heart Failure with Preserved ejection fraction: Pletismography for Interstitial Function and skin biopsy/Insuficiência cardíaca com fração de ejeção preservada: pletismografia para função intersticial e biópsia cutânea*) foi concebido para investigar a troca de fluido capilar-intersticial e testar a hipótese de que um efeito osmótico secundário a níveis altos de Na⁺ intersticial poderia impactar os microvasos e levar ao extravasamento de fluido excessivo e edema em pacientes com ICFEP.

MÉTODOS

PROTOCOLO E PARTICIPANTES DO ESTUDO.

Indivíduos com ICFEP estável, identificados em clínicas ambulatoriais de IC em Glasgow, no Reino Unido (n = 16), e voluntários de distribuição de idade e sexo semelhantes, sem histórico de doença cardiovascular ou renal, hipertensão ou diabetes [indivíduos controle saudável (CS); n = 16], foram recrutados entre agosto de 2017 e dezembro de 2018. O diagnóstico de ICFEP foi dado de acordo com a definição de diretriz da *European Society of Cardiology* de 2016: 1) sinais ou sintomas de IC; 2) peptídeo natriurético tipo B (BNP) elevado >35 pg/mL; 3) fração de ejeção ≥50%; e 4) evidência de doença cardíaca estrutural (crescimento atrial esquerdo ou hipertrofia ventricular esquerda) ou disfunção diastólica (19). Os critérios de exclusão foram histórico de evento cerebrovascular recente (<3 meses), infarto do miocárdio ou revascularização coronariana; doença valvar significativa; doença arterial coronariana instável; cardiomiopatia hipertrófica ou infiltrativa ou pericardite constrictiva; estágio de doença renal crônica >3; edema idiopático ou síndrome de vazamento capilar, mixedema ou obstrução linfática; inflamação sistêmica no momento da visita do estudo; malignidade ativa; qualquer estado hipercoagulável grave ou histórico de trombose venosa ou embolia sem anticoagulação contínua; e incapacidade.

A elegibilidade e as visitas principais foram conduzidas no período da manhã, em uma sala com temperatura controlada. Os participantes não consumiram caféina, álcool nem alimentos; não fumaram; e evitaram o uso de medicamentos vasoativos ou diuréticos por >4 horas antes das avaliações. Entre os procedimentos do estudo, estavam histórico e exame físico; hemograma completo, BNP, hemoglobina A1c e função renal, hepática e tireoidiana; razão albumina/creatinina urinária (amostra matinal); medição simultânea da pressão arterial (PA) braquial e da panturrilha; velocidade da onda pulsada; ecocardiografia; dilatação mediada por fluxo; pletismografia via extensômetro de oclusão venosa; e biópsia cutânea glútea por punção. Os participantes que não estavam usando anticoagulantes e que não tinham histórico de doença arterial ilíaca obstrutiva grave foram chamados para participar de um subestudo opcional, o qual envolvia uma excisão cirúrgica de grande porte de pele e tecido adiposo subcutâneo em torno do local da biópsia por punção para a dissecação de artérias de resistência e biologia molecular. Este estudo está em conformidade com a Declaração de Helsinque, e o protocolo foi aprovado pelo *West of Scotland Research Ethics Committee*

ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

BNP = peptídeo natriurético do tipo B
CS = controle saudável
DP = derme profunda
EDS = epiderme e derme superficial
IC = insuficiência cardíaca
ICFEP = insuficiência cardíaca com fração de ejeção preservada
K_f = coeficiente de filtração microvascular
PA = pressão arterial
P_i = pressão isovolumétrica
P_v = pressão venosa
PVC = pressão venosa central
VEGF = fator de crescimento endotelial vascular

3 (ref. 17/WS/0091) e *Greater Glasgow and Clyde NHS Research and Development* (ref. GN17CA152).

AMOSTRAS DE TECIDO. Todos os participantes (exceto um paciente, devido a anestesia ineficaz) foram submetidos a uma biópsia cutânea de punção de 4 mm em um quadrante superior externo do glúteo depois de receberem anestesia tópica com creme de lidocaína sem Na⁺ (LMX4, Ferndale Pharma Group, Ferndale, Michigan, EUA), conforme descrito (20). Metade da amostra de pele foi fixada em paraformaldeído 2% para histologia, e a outra metade foi imediatamente congelada e armazenada a -80 °C até a análise química.

Uma parte da pele das maiores biópsias obtidas de participantes elegíveis e que também consentiram com o subestudo foi imediatamente congelada para biologia molecular (7 pacientes com ICPEP e 10 indivíduos CS); o tecido restante foi usado para dissecar pequenas artérias de resistência para o teste funcional *ex vivo* de relaxamento dependente e independente do endotélio por eletromiografia.

ANÁLISE HISTOQUÍMICA DA PELE. Conforme relatado (20), as amostras de pele congeladas foram cortadas em uma camada superficial [incluindo a epiderme e derme superficial (EDS)] e uma camada de derme profunda (DP) dentro de uma câmara fria, para evitar a evaporação. O conteúdo de água nos tecidos foi estimado como peso úmido (Pu) – peso seco (Ps), determinado após a dessecação a 65 °C por >40 h até o peso estável. A medição de Na⁺ e K⁺ do tecido foi feita nas amostras secas digeridas com HNO₃ por fotometria de chama (410C, Sherwood Scientific, Cambridge, Reino Unido) e expressa como conteúdo absoluto (mmol/gPs) ou concentração (mmol/L, após normalização pela água do tecido).

IMAGEM MICROVASCULAR DA PELE. Seções de pele embebidas em parafina (5 µm de espessura), incluindo tanto a epiderme quanto a derme, foram coradas com anticorpo LYVE-1 (receptor de hialuronano endotelial de vaso linfático 1) anti-humano (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, EUA; 3 µg/mL, noturno, 4 °C; isotipo correspondente de imunoglobulina G de cabra como controle negativo) após a recuperação noturna do antígeno de baixa temperatura (Unitrieve; Innovex Biosciences, Richmond, Califórnia, EUA) e o bloqueio de sinal inespecífico. Foram usados o anticorpo secundário conjugado Alexa Fluor 488 (2 µg/mL; Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA) e a lectina de aglutinina I de *Ulex europaeus* (10 µg/mL; Vector Laboratories, Burlingame, Califórnia, EUA) para corar, respectivamente, vasos linfáticos LYVE-1⁺ e células endoteliais sanguíneas. Foram adquiridas imagens lado a lado de toda a linha epidérmica e da derme subpapilar com aumento de 20 vezes. A análise cegada e automatizada de imagem para

quantificação de microvasos na área dérmica de 600 µm a partir da junção epiderme–derme e que abrangia toda a extensão da biópsia foi realizada com o ImageJ, versão 1.52q (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EUA), a partir de critérios predefinidos de limiar homogêneo e da função “analisar partículas” (Figura Suplementar 1).

ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DA PELE. O RNA foi extraído de biópsias cirúrgicas glúteas. Após a pré-amplificação (tecnologia TaqMan PreAmp, Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA) do DNA complementar alvo, foi usado um Custom TaqMan Array Card (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) para realizar a expressão gênica quantitativa de marcadores ou fatores de crescimento e transcrição específicos para vasos sanguíneos ou linfáticos. Os níveis de expressão gênica foram comparados e apresentados como valores ΔCt, com β-actina como gene de referência.

PLETISMOGRAFIA E DINÂMICA DE FLUIDOS MICROVASCULARES. A pletismografia de extensômetro (EC6, Hokanson, Carmel, Indiana, EUA), que mede as alterações do volume do membro como mL/100 mL de tecido, foi usada para avaliar os seguintes aspectos do antebraço e da panturrilha: fluxo sanguíneo arterial, pressão venosa periférica (P_v) [como substituta da pressão venosa central (PVC)] e extravasamento líquido de fluido em direção ao interstício no aumento das pressões de oclusão venosa, conforme descrito anteriormente (21-25).

Em suma, os extensômetros foram posicionados no antebraço não dominante e na panturrilha ipsilateral e mantidos na altura do átrio direito. Foram colocados manguitos infláveis para oclusão venosa próximos aos extensômetros. A P_v foi determinada por meio do aumento gradual da pressão de oclusão, mantida até que fosse detectada qualquer alteração de volume do membro. O fluxo sanguíneo arterial foi determinado a partir da taxa de mudança no volume do membro após ciclos consecutivos de oclusão venosa súbita para 45 mmHg (E20 Rapid Cuff Inflator, D.E. Hokanson Inc., Bellevue, Washington, EUA), conforme descrito anteriormente (22). A resistência arterial ao fluxo foi calculada como: (PA média – P_v)/fluxo sanguíneo (24).

Para avaliar os parâmetros de filtração microvascular, usamos etapas de pressão de oclusão de 8 mmHg cumulativas, cada uma com duração de 3,5 min e começando no primeiro múltiplo que excedeu a P_v, até um máximo de 56 mmHg ou menos se a PA diastólica fosse menor. A pressão aplicada ao manguito e transmitida às veias induz sua distensão e seu preenchimento, com uma fase inicial curvilínea e um platô posterior (Figura Suplementar 2A). No entanto, acima de uma certa pressão de equilíbrio até a qual qualquer filtro

de fluido através da interface microvascular está sendo removido a uma taxa equivalente pela drenagem linfática, ocorre o acúmulo de fluido intersticial, que resulta em um aumento linear no volume do membro (Figura Suplementar 2B). Esse limite de pressão é chamado de pressão isovolumétrica (P_i). O curso de tempo (ou seja, inclinação) desse acúmulo de fluido intersticial foi calculado como a primeira derivada média do traçado pletismográfico de cada etapa de pressão hidrostática capilar (= pressão aplicada ao manguito), em porções desprovidas de artefatos de movimento e excluindo-se a fase de enchimento venoso (LabChart, ADInstruments, Sydney, Austrália); essas inclinações são proporcionais à pressão hidrostática por um coeficiente chamado coeficiente de filtração microvascular (K_f) ($\mu\text{L} \times 100 \text{ mL de tecido}^{-1} \times \text{min}^{-1} \times \text{mmHg}^{-1}$) (Figura Suplementar 2C) (21). O coeficiente de filtração, bem como a pressão quando o extravasamento e a drenagem linfática se equilibram e o aumento líquido no volume do tecido é nulo (ou seja, a interceptação da associação linear com o eixo x; P_i), foram determinados para cada membro e cada participante, com alocação cegada de grupo, por regressão de mínimos quadrados (Prism, versão 8; GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA). Foram excluídos da análise membros com <3 pontos livres de artefatos de movimento para ajuste de regressão (21,26) ou com critérios de exclusão específicos para membros predefinidos.

ANÁLISE ESTATÍSTICA. O recrutamento foi interrompido após 16 dos 20 indivíduos inicialmente previstos por grupo, quando a análise interina demonstrou futilidade em relação à hipótese primária de um K_f mais alto em pacientes com ICfEP em comparação a indivíduos CS. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando Prism e SPSS versão 25 (IBM Corporation, Armonk, Nova Iorque, EUA). As variáveis categóricas foram comparadas usando o teste do qui-quadrado. As variáveis contínuas foram testadas quanto à normalidade de distribuição usando plotagem gráfica e teste de Kolmogorov-Smirnov. Foram usados testes paramétricos ou não paramétricos não pareados e não ajustados para a comparação de desfechos primários (microvasculares) e secundários entre os grupos. Foi usado o ajuste de mínimos quadrados para as regressões linear e não linear. O nível α foi estabelecido em 0,05, e todos os testes estatísticos foram bicaudais.

Há uma descrição detalhada dos métodos de estudo disponível no Apêndice Suplementar.

RESULTADOS

CARACTERÍSTICAS DOS PARTICIPANTES E FUNÇÃO VASCULAR.

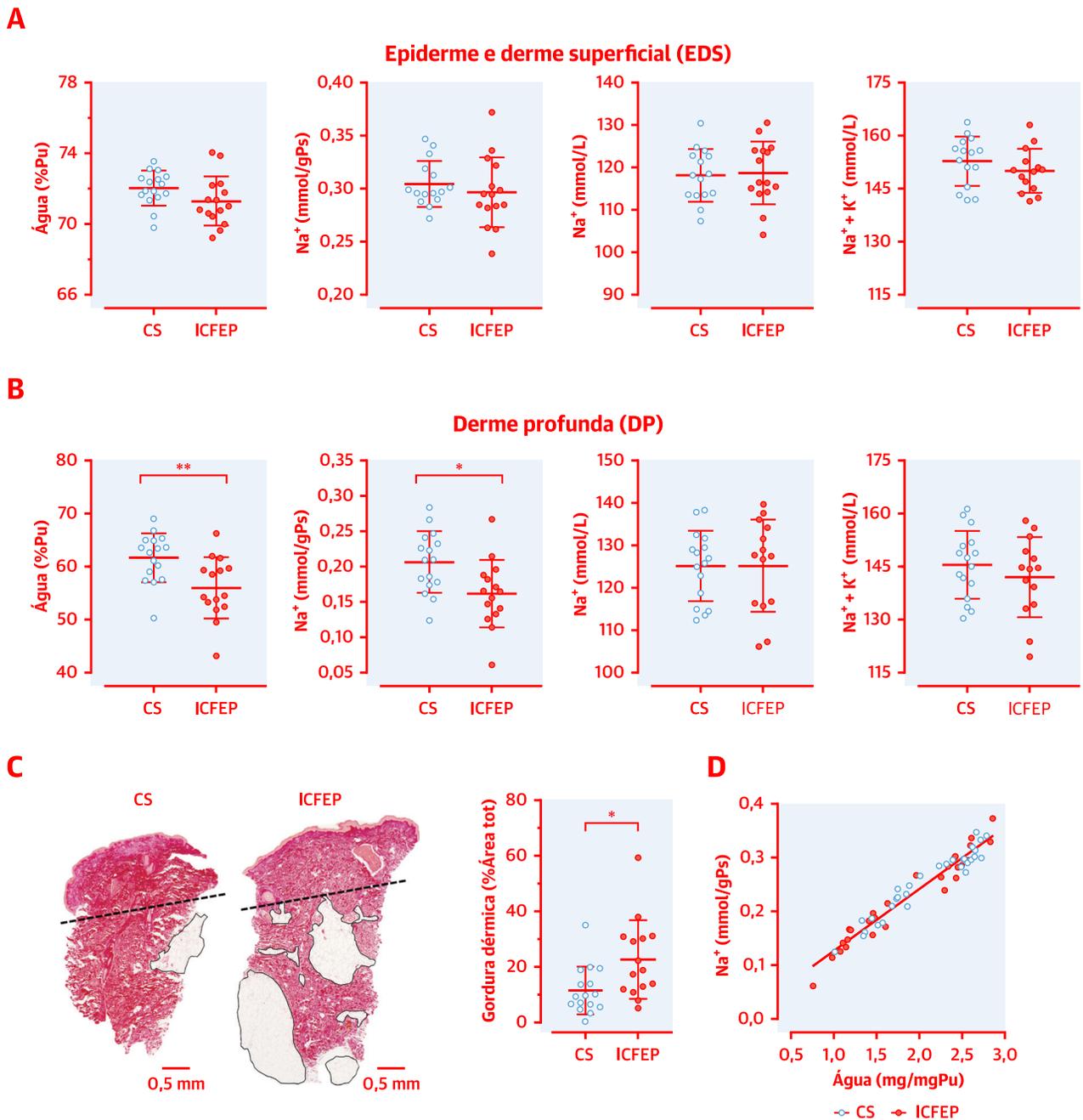
As características clínicas dos dois grupos

TABELA 1 Características do indivíduo			
	Indivíduos CS (n = 16)	Pacientes com ICfEP (n = 16)	Valor de p
Feminino	11 (69)	10 (63)	0,710
Idade, anos	68 ± 5	72 ± 6	0,060
IMC, kg/m ²	25,1 ± 2,9	33,9 ± 4,4	<0,001
Sobrepeso/obeso	8 (50)/1 (6)	4 (25)/12 (75)	<0,001
ASC, m ²	1,78 ± 0,21	2,00 ± 0,28	0,021
PAS, mmHg	130 ± 14	146 ± 21	0,017
PAD, mmHg	73 ± 8	71 ± 14	0,659
FC, batidas/min	60 ± 7	65 ± 16	0,256
Índice do volume atrial esquerdo, mL/m ²	23,3 ± 6,1	46,8 ± 12,8	<0,001
Índice da massa ventricular esquerda, g/m ²	84,3 ± 17,9	127,8 ± 26,6	<0,001
Fração de ejeção do ventrículo esquerdo, %	63,2 ± 3,5	60,8 ± 6,7	0,222
E/e'	8,0 ± 1,6	10,8 ± 2,9	0,001
Comorbidade			
Hipertensão	–	15 (94)	<0,001
Doença arterial coronariana	–	3 (20)	0,060
Fibrilação atrial	–	11 (69)	<0,001
Diabetes melito	–	7 (44)	0,003
Doença renal crônica	–	7 (44)	0,003
Tabagismo (atual/prévio)	0 (0)/2 (13)	3 (19)/7 (44)	0,011
Medicamento			
Inibidores da ECA/BRA	–	14 (88)	<0,001
BB	–	14 (88)	<0,001
BCC	–	3 (19)	0,069
Diurético (alça/tiazida)	–	15 (94)/1 (6)	<0,001
ARM	–	1 (6)	0,310
Nitratos de longa ação	–	2 (13)	0,144
Estatina	–	8 (50)	0,001
Digoxina	–	5 (31)	0,015
Aspirina	–	4 (25)	0,033
Anticoagulação	–	7 (44)	0,003
Na ⁺	140 (139-142)	140 (136-142)	0,361
K ⁺	4,5 (4,2-4,7)	4,2 (4,0-4,7)	0,224
Ureia, mmol/L	5,5 (4,7-6,0)	6,4 (5,9-9,8)	0,007
Creatinina, $\mu\text{mol/L}$	71 (59-84)	79 (67-90)	0,138
TGFe (CKD-EPI), mL/min/1,73 m ²	81,7 ± 11,0	70,9 ± 17,0	0,042
RAC urinário, mg/gCr	4,8 (3,2-6,1)	33,9 (10,7-87,4)	0,001
Hemoglobina, g/L	145 ± 8,8	133 ± 17	0,022
Hematócrito, %	44,1 ± 2,5	40,5 ± 4,7	0,013
Albumina, g/L	39,3 ± 3,1	37,8 ± 2,7	0,155
PNC, pg/mL	24 (16-32)	170 (93-320)	<0,001

Os valores são expressos como n (%), média ± desvio padrão ou mediana (intervalo interquartil). A doença renal crônica foi definida como TGFe <60 mL/min/1,73 m².
ARM = antagonista do receptor de mineralocorticoide; ASC = área de superfície corporal (Mosteller); BB = betabloqueador; BCC = bloqueadores de canal de cálcio; BNP = peptídeo natriurético tipo B; BRA = bloqueador dos receptores de angiotensina; CKD-EPI = *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration* (Colaboração de Epidemiologia de Doença Renal Crônica); CS = controle saudável; ECA = enzima conversora de angiotensina; E/e' = média da razão de velocidade septal e lateral; FC = frequência cardíaca; ICfEP = insuficiência cardíaca com fração de ejeção preservada; IMC = índice de massa corporal; PAD = pressão arterial diastólica; PAS = pressão arterial sistólica; RAC = razão albumina/creatinina; TGFe = taxa de filtração glomerular estimada.

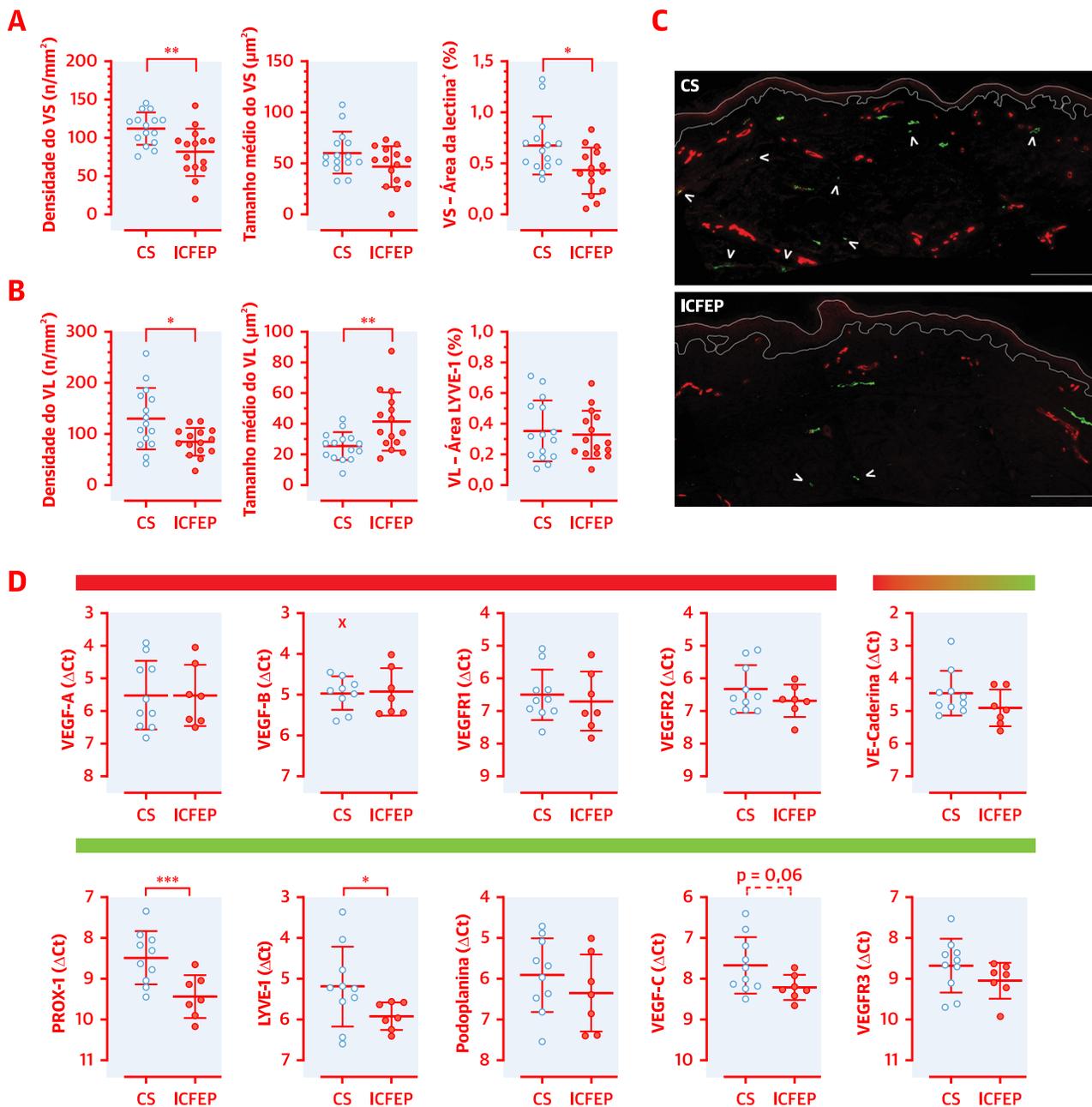
de estudo são apresentadas na Tabela 1. Pacientes com ICfEP e indivíduos CS apresentaram dados semelhantes quanto à distribuição por idade e sexo. Pacientes com ICfEP apresentaram características típicas, com alta prevalência de hipertensão, obesidade, fibrilação atrial paroxística ou permanente, hipertrofia ventricular esquerda e sinais de remodelação atrial ou disfunção diastólica (Tabela Suplementar 1), diabetes e doença

FIGURA 1 Análise química da pele



(A, B) Teor de água [% de peso úmido (Pu)], teor de Na^+ [mmol/g do peso seco (Ps) do tecido], concentração de Na^+ e concentração de $[\text{Na}^+ + \text{K}^+]$ (mmol/L de água de tecido) nas camadas externa [epiderme e derme superficial (EDS)] e interna [derme profunda (DP)] da biópsia da pele. (C) Seções de pele representativas de um sujeito de controle saudável (CS) e um paciente com insuficiência cardíaca com fração de ejeção preservada (ICFEP) (coloração com picrossírius vermelho). A **linha tracejada** identifica o plano de corte da separação de EDS e DP em todas as amostras do estudo, as barras de escala estão na parte inferior, e as **áreas circuladas em preto** representam a gordura dérmica, quantificada nas seções como % da área de biópsia, e foram mais abundantes em pacientes com ICFEP do que em indivíduos CS. (B) O excesso de gordura dérmica se iguala ao volume reduzido de distribuição de água e Na^+ e, da mesma forma, seu conteúdo reduzido observado na DP de pacientes com ICFEP. Todos os dados nos painéis A-C são apresentados como média \pm desvio padrão; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. (D) Associação entre Na^+ e conteúdo de água, incluindo valores de EDS e DP; a inclinação da linha de regressão foi a mesma entre os grupos de estudo.

FIGURA 2 Anatomia microvascular da pele e expressão gênica



Anatomia microvascular da pele avaliada como densidade (número de vasos/ mm^2 de tecido), área transversal média dos vasos (tamanho médio; μm^2) e área total de cora* (expressa como porcentagem da área dérmica) dos vasos identificados na seção. **(A)** Os vasos sanguíneos (VSs) apresentaram uma redução em número e área total; **(B)** os vasos linfáticos (VLs) foram reduzidos em número, mas, em média, apresentaram tamanho maior em pacientes com ICFEP em comparação a indivíduos com CS. **(C)** Seções representativas, mostrando vasos sanguíneos [lectina* (vermelho)] e vasos linfáticos [LYVE-1 (receptor de hialuronano endotelial de vaso linfático 1) (verde)]; as pontas de seta indicaram pequenos vasos linfáticos terminais, reduzidos em ICFEP em comparação a indivíduos CS, e os vasos maiores pareciam não afetados. Barra de escala na parte inferior direita = 200 μm . **(D)** Expressões gênicas, apresentadas como ΔCt (quanto maior o valor, menor a expressão gênica; β -actina como gene de referência); as barras coloridas no topo indicam sangue (vermelho), linfático (verde) ou especificidade vascular mista; x = exclusão detectada automaticamente (ROUT = 1%) (GraphPad Prism). Todos os dados são apresentados como média \pm desvio padrão; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. PROX-1 = proteína *prospero homeobox 1*; VEGF = fator de crescimento endotelial vascular; VEGFR = receptor do fator de crescimento endotelial vascular; outras abreviações conforme a Figura 1.

TABELA 2 Dinâmica microvascular			
	Indivíduos CS (n = 16)	Pacientes com ICPEP (n = 16)	Valor de p
Antebraço			
Pressão arterial média, mmHg	92 ± 7	94 ± 12	0,529
Fluxo sanguíneo, mL × 100 mL de tecido ⁻¹ × min ⁻¹	1,9 ± 0,8	1,9 ± 0,9	0,992
Resistência periférica arterial, mmHg/mL × 100 mL de tecido ⁻¹ × min ⁻¹	50,1 ± 14,5	56,3 ± 29,5	0,459
Pressão venosa, mmHg	5 (4-6)	8 (7-10)	<0,001
Coefficiente de filtração (K _f), μL × 100 mL de tecido ⁻¹ × min ⁻¹ × mmHg ⁻¹	5,66 (4,69-8,38)	5,16 (3,86-5,43)	0,234
Pressão isovolumétrica, mmHg	25 ± 5	17 ± 4	<0,001
Panturrilha			
Pressão arterial média, mmHg	94 ± 8	96 ± 14	0,555
Fluxo sanguíneo, mL × 100 mL de tecido ⁻¹ × min ⁻¹	3,3 ± 1,6	3,6 ± 1,4	0,573
Resistência periférica arterial, mmHg/mL × 100 mL de tecido ⁻¹ × min ⁻¹	33,1 ± 15,4	29,3 ± 11,8	0,459
Pressão venosa, mmHg	5 (4-5)	7 (7-9)	<0,001
Coefficiente de filtração (K _f), μL × 100 mL de tecido ⁻¹ × min ⁻¹ × mmHg ⁻¹	4,66 (3,70-6,15)	3,30 (2,33-3,88)	0,008
Pressão isovolumétrica, mmHg	22 ± 4	16 ± 4	0,003
Os valores foram expressos como média ± desvio padrão ou mediana (intervalo interquartil). Abreviaturas conforme a Tabela 1.			

renal crônica. Em comparação aos indivíduos CS, eles apresentaram BNP, albuminúria e ureia plasmática mais altos e taxa de filtração glomerular estimada (TGF_e) e hematócrito mais baixos, mas albumina plasmática semelhante.

A avaliação clássica da função vascular periférica também revelou maior velocidade da onda pulsada carotídeo-femoral, como uma medida da rigidez das grandes artérias, e menor dilatação mediada pelo fluxo braquial, que foi acompanhada por menor hiperemia reativa pós-isquêmica (Tabela Suplementar 2, Figura Suplementar 3). De modo consistente, a vasodilatação *ex vivo* das artérias de resistência subcutâneas foi reduzida em pacientes com ICPEP em comparação a indivíduos CS (Figura Suplementar 4).

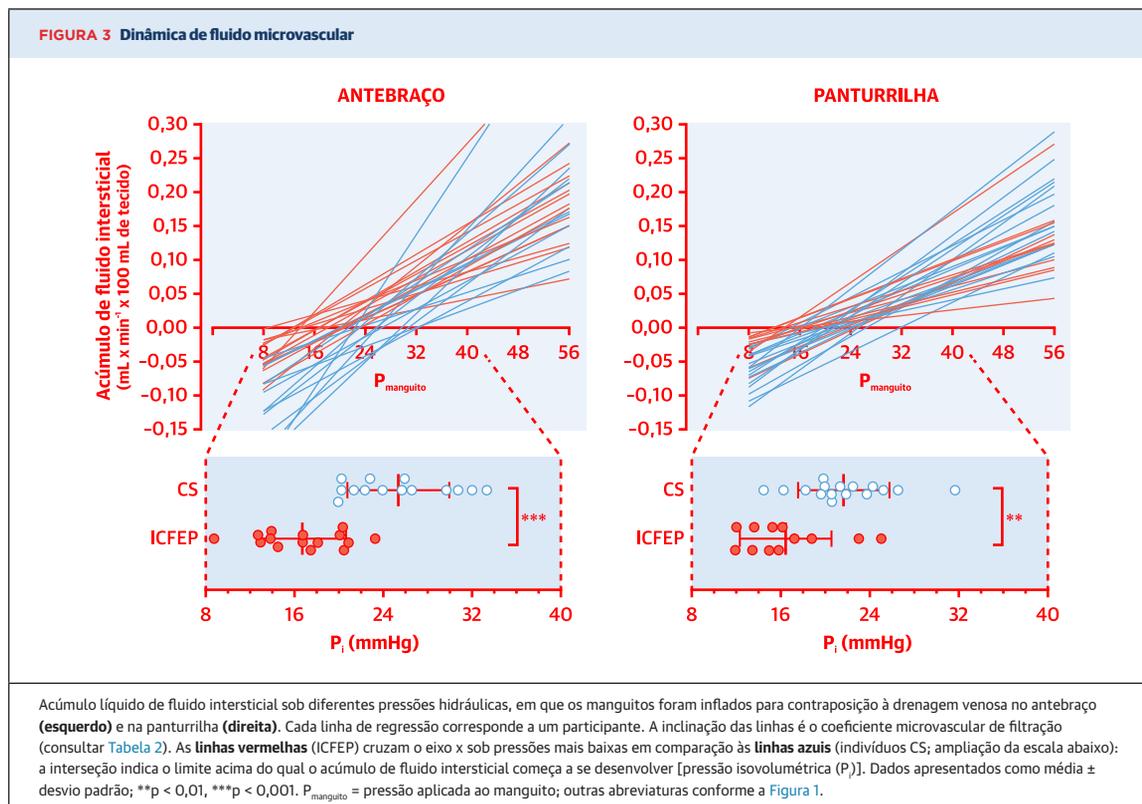
SAL DA PELE. A análise química das biópsias da pele glútea revelou que o conteúdo de água [% peso úmido (mg/mg peso seco) (não demonstrado)], a concentração de Na⁺ (mmol/L de água) e o conteúdo total de Na⁺ (mmol/gPu) na EDS foram semelhantes entre pacientes com ICPEP e indivíduos CS (Figura 1A). Na DP, o conteúdo de água e Na⁺ foi menor em pacientes com ICPEP do que indivíduos CS (Figura 1B), de acordo com a distribuição do índice de massa corporal e gordura dérmica (Figura 1C, Figura Suplementar 5), o que limita o volume de distribuição de água e de eletrólitos no tecido, deixando sua representação relativa geral inalterada. As concentrações de Na⁺ e (Na⁺ + K⁺) da DP (ou seja, após a normalização do conteúdo para água) foram semelhantes entre os grupos, como na EDS. A concentração de Na⁺ + K⁺ caiu consistentemente dentro de uma faixa fisiológica (140 a 155 mmol/L) (20) em ambas as camadas. De modo semelhante, a inclinação da linha de regressão para água da pele e conteúdo de Na⁺ não diferiu por grupo (p = 0,810) (Figura 1D) ou camada de tecido (EDS vs. DP, p = 0,922) (não demonstrado). Em

suma, não detectamos nenhum acúmulo de Na⁺ hipertônico e independente de água na pele de pacientes com ICPEP.

RAREFAÇÃO DO SANGUE DA PELE E DOS MICROVASOS LINFÁTICOS E EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL. Microvasos sanguíneos.

Pacientes com ICPEP apresentaram rarefação dérmica de microvasos sanguíneos em comparação a indivíduos CS (p = 0,003) (Figuras 2A e 2C), independentemente da idade (correlação de Spearman com número de vasos: r = -0,141, p = 0,449). Nenhuma diferença significativa foi observada no tamanho dos vasos da pele ou na expressão gênica do fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF-A) e VEGF-B e seus receptores específicos para vasos sanguíneos [receptor 1 de VEGF (VEGFR1) e VEGFR2]; e a expressão da caderina endotelial vascular, presente tanto nos vasos sanguíneos quanto nos vasos linfáticos, também não foi diferente (Figura 2D).

Microvasos linfáticos. Os vasos linfáticos foram reduzidos em número de modo semelhante (p = 0,012), mas foram maiores (p = 0,007) em pacientes com ICPEP em comparação a indivíduos CS (Figuras 2B e 2C). Nem o número nem o tamanho vascular médio apresentaram associações significativas com a idade (r = -0,009, p = 0,963; e r = 0,307, p = 0,099, respectivamente). Em pacientes com ICPEP, a PROX-1 cutânea [proteína 1 *prospero homeobox*, um fator de transcrição específico de células endoteliais linfáticas (LEC) que impulsiona o desenvolvimento e manutenção dinâmica de vasos e válvulas linfáticos] (27,28) e LYVE-1 (um marcador de células endoteliais linfáticas expressas a partir da maioria dos vasos iniciais), mas não a podoplanina (uma glicoproteína geralmente expressa no endotélio dos vasos linfáticos acima de um certo diâmetro) (29), foram reduzidos em comparação a indivíduos CS. O



VEGF-C apresentou tendência semelhante ($p = 0,06$), mas a expressão de seu receptor linfático específico VEGFR3 (receptor 3 do VEGFR) não diferiu entre os grupos (Figura 2D). Em geral, foram detectadas alterações linfáticas cutâneas estruturais e moleculares em pacientes com ICFEF.

DINÂMICA DO FLUIDO MICROVASCULAR: MICRO-FILTRAÇÃO E DEPURAÇÃO LINFÁTICA. Pacientes com ICFEF apresentaram PA média do antebraço e panturrilha, fluxo sanguíneo do membro em repouso (normalizado para mililitros de tecido) e resistência arterial semelhante a indivíduos CS; na variância, a P_v de repouso dos pacientes foi maior, embora não com valores sugestivos de descompensação evidente (Tabela 2).

Por causa dos artefatos de movimento, três traçados de antebraço (um paciente com ICFEF, dois indivíduos CS) e quatro traçados de panturrilha (três pacientes com ICFEF, um indivíduo CS) foram excluídos da análise de microfiltração; um traçado de panturrilha adicional de um paciente com ICFEF foi excluído de acordo com os critérios de exclusão específicos do procedimento (insuficiência venosa bilateral evidente). O extravasamento de fluido capilar líquido em direção ao interstício ($\text{mL} \times 100 \text{ mL de tecido}^{-1} \times \text{min}^{-1}$), induzido com P_v progressivamente mais alta por inflações escalonadas

de manguitos proximais, não foi maior em pacientes com ICFEF em comparação a indivíduos CS como foi inicialmente previsto. Na verdade, a inclinação da linha de regressão entre o acúmulo de fluido intersticial e a pressão do manguito foi menor em pacientes com ICFEF em comparação a indivíduos CS na panturrilha [K_f ; 3,30 (IQR: 2,33 a 3,88)] $\mu\text{L} \times 100 \text{ mL de tecido}^{-1} \times \text{min}^{-1} \times \text{mmHg}^{-1}$ vs. 4,66 (IQR: 3,70 a 6,15)] $\mu\text{L} \times 100 \text{ mL de tecido}^{-1} \times \text{min}^{-1} \times \text{mmHg}^{-1}$; $p = 0,010$]; uma tendência não significativa semelhante foi observada no antebraço [5,16 (IQR: 3,86 a 5,43)] $\mu\text{L} \times 100 \text{ mL de tecido}^{-1} \times \text{min}^{-1} \times \text{mmHg}^{-1}$ vs. 5,66 (IQR: 4,69 a 8,38)] $\mu\text{L} \times 100 \text{ mL de tecido}^{-1} \times \text{min}^{-1} \times \text{mmHg}^{-1}$] (Tabela 2, Figura 3). No entanto, os pacientes com ICFEF também apresentaram uma redução da P_i (panturrilha: $16 \pm 4 \text{ mmHg}$ vs. $22 \pm 4 \text{ mmHg}$; $p = 0,003$; antebraço: $17 \pm 4 \text{ mmHg}$ vs. $25 \pm 5 \text{ mmHg}$; $p < 0,001$): em nosso cenário experimental *in vivo*, o que reflete a pressão crítica até a qual a drenagem linfática pode compensar totalmente o extravasamento contínuo do fluido mesmo em P_v baixa, e não ocorre nenhum acúmulo líquido de fluido intersticial (ou seja, a interceptação das linhas com o eixo x) (Figura 3).

Em suma, a depuração do fluido intersticial falha precocemente em atender às demandas impostas pelo extravasamento capilar induzido pela pressão hidráulica (venosa) em ICFEF.

DISCUSSÃO

Pela primeira vez na compreensão da ICPEP, nosso estudo HAPPIFY estendeu o conceito de disfunção microvascular ao sistema linfático. Apesar da ausência de excesso de Na^+ hipertônico tecidual para facilitar o edema, mostramos que os vasos linfáticos de pacientes com ICPEP apresentam alterações estruturais e moleculares na pele e não conseguem fazer a compensação eficaz do extravasamento de fluido e o acúmulo intersticial por drenagem comensurada. Juntamente com a evidência direta *ex vivo* de artérias de resistência subcutâneas pequenas disfuncionais primárias e a rarefação dos vasos sanguíneos da pele, como já descrito no miocárdio (9) e no músculo esquelético (11,13), esse comprometimento vascular funcional e estrutural corrobora ainda mais a natureza sistêmica da síndrome de ICPEP (13).

RAREFAÇÃO DE MICROVASOS. O comprometimento da vasodilatação é uma característica estabelecida de pacientes com ICPEP e contribui para a incapacidade de fazer exercícios (4). Em nosso estudo, isso foi confirmado não apenas por abordagens indiretas clássicas, como dilatação mediada por fluxo braquial e hiperemia reativa pós-isquêmica, como também pela primeira análise *ex vivo* do relaxamento dependente do endotélio vascular (via acetilcolina) e independente do endotélio (via sódio nitroprussiato) das artérias de resistência sistêmicas (Figuras Suplementares 3 e 4). Na análise *in vivo*, no entanto, qualquer resposta de fluxo hiperêmico é criticamente afetada também pelo número de efetores finais (ou seja, vasos), como demonstrado pela ruptura experimental da microvasculatura coronária em porcos (30). Em pacientes com ICPEP, a densidade microvascular coronariana reduzida encontrada nas amostras de autópsia (9) pode causar heterogeneidade patológica e incompatibilidade no suprimento e na demanda sanguínea (31), prejudicando, assim, a extração e o desempenho de O_2 do miocárdio. Da mesma forma, a capacidade de exercício com ICPEP fica ainda mais reduzida pela baixa extração periférica de O_2 e pela densidade capilar do músculo esquelético (10-12). Nesse ponto, por um lado, mostramos que a rarefação dos microvasos sanguíneos na ICPEP ocorre também na pele, que é, de longe, o maior órgão humano e fundamental na regulação da hemodinâmica corporal. Por outro lado, e em discordância com os paradigmas amplamente “arteriocêntricos” mencionados anteriormente, nossos achados levam a uma reconsideração da função da microvasculatura como um todo, para incluir outras funções além da homeostase da resistência vascular e outras estruturas além das artérias na patogênese da ICPEP.

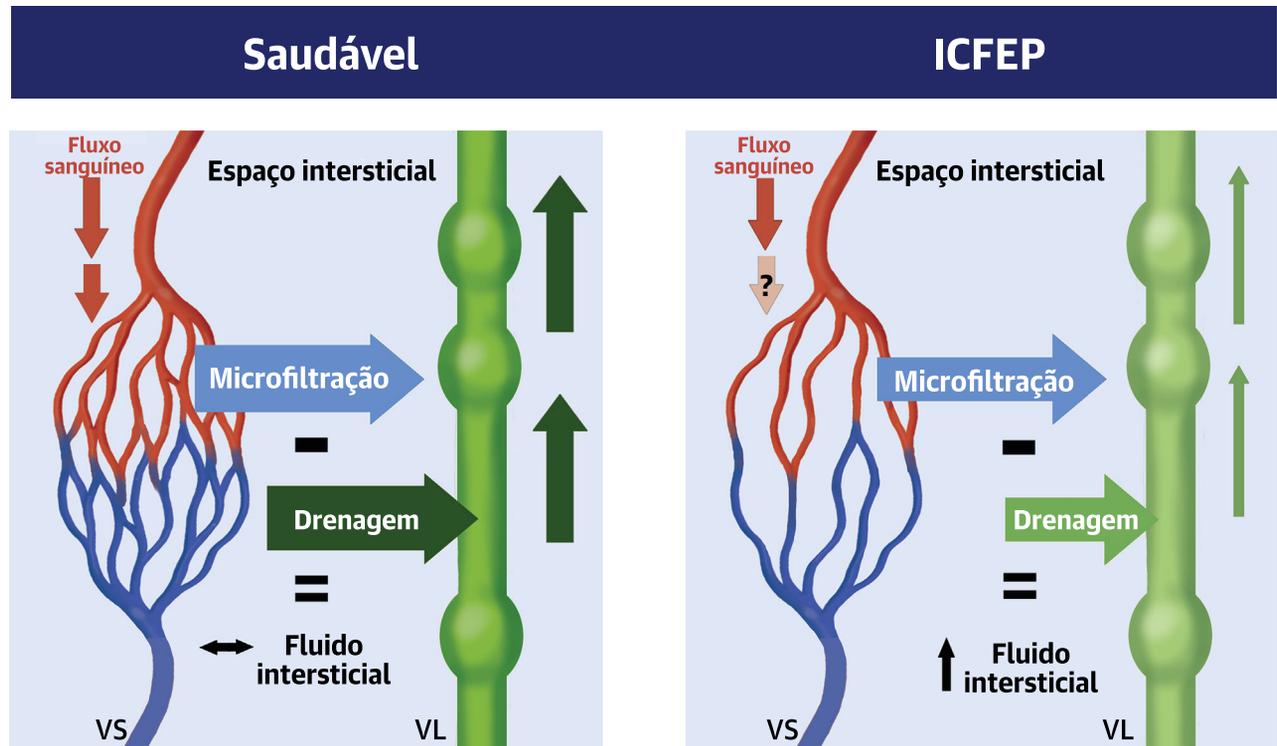
INTERSTÍCIO, MICROVASCULATURA E CONGESTÃO EM ICPEP. A congestão (ou seja, edema) é central para a síndrome de IC (5), mas, até onde sabemos, este estudo

é o primeiro a investigar a homeostase do fluido capilar-interstício fino em ICPEP.

Na última década, o excesso de Na^+ foi relatado na pele e no músculo esquelético de pacientes idosos hipertensos (16), pacientes diabéticos (17) e pacientes com doença renal crônica (18). Esse fenômeno foi originalmente descrito em roedores como independente de água (14) e capaz de estimular uma via de sinalização linfangiogênica para aumentar a drenagem do próprio Na^+ de tecido (15). Embora estivesse faltando uma demonstração direta em ICPEP, todas essas são comorbidades típicas de pacientes que apresentam a síndrome, e levantamos a hipótese de que o acúmulo de Na^+ hipertônico poderia arrastar o excesso de líquido para fora dos vasos, favorecendo o edema. Embora a concentração de Na^+ na pele de pacientes com ICPEP fosse alta quando comparada a uma coorte relatada anteriormente de indivíduos jovens e saudáveis (20) (dados nas Tabelas Suplementares 3 e 4 para referência), ela também foi acompanhada por maior teor de água e não foi diferente de indivíduos controle com distribuição de idade semelhante, provavelmente refletindo a falta de descompensação evidente de IC e edema em um local não dependente em nossa coorte de pacientes com ICPEP estável. O excesso de Na^+ e de conteúdo de água na pele de nossos participantes em comparação a jovens saudáveis é uma reminiscência da retenção isotônica de Na^+ dependente da idade, observada também em pacientes hipertensos sem complicações, refletindo a expansão do volume extracelular do tecido (20); como nessa coorte, a concentração idêntica ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$) entre os grupos de estudo exclui qualquer excesso de Na^+ hipertônico. Consequentemente, e ao contrário de nossas expectativas iniciais, a taxa de acúmulo de fluido nos tecidos induzida pelo aumento das pressões hidráulicas (ou seja, K_f) não foi maior em pacientes com ICPEP em comparação a indivíduos CS. Em consonância com a dependência de K_f da superfície vascular disponível para a troca de fluidos e com a rarefação dos vasos sanguíneos observada na ICPEP, essa taxa foi, na verdade, menor. É possível que o fluxo sanguíneo em ICPEP, que foi semelhante aos indivíduos CS quando normalizado pelo volume do membro, tenha sido parcialmente desviado da troca de capilares para a derivação funcional (31); em outras condições caracterizadas por aumento no fluxo sanguíneo local (por exemplo, síndrome de taquicardia postural), o K_f estava elevado (24).

Diferentemente das preparações *ex vivo*, nossa abordagem pletismográfica *in vivo* foi responsável não apenas pelo extravasamento de fluido capilar regulado pelo equilíbrio de Starling-Landis, como também pela drenagem de fluido simultânea para fora do tecido. Na verdade, medições diretas contemporâneas das forças intersticiais hidráulicas e oncóticas revelaram que, sob

ILUSTRAÇÃO CENTRAL Dinâmica de fluido microvascular e reserva linfática reduzida em ICPEP



Rossitto, G. et al. J Am Coll Cardiol. 2020;76(24):2817-29.

Em indivíduos saudáveis, a filtração de fluido para fora do leito capilar da vasculatura sanguínea (VS) é equilibrada uniformemente pela drenagem de fluido proporcional pela vasculatura linfática (VL); como resultado, a quantidade fisiológica de fluido intersticial é preservada homeostaticamente. Na insuficiência cardíaca com fração de ejeção preservada (ICPEP), o extravasamento líquido de fluido tende a ser menor por causa da superfície vascular reduzida disponível para a troca de fluido (ou seja, rarefação capilar) e o possível desvio do fluxo sanguíneo para derivações arteriovenosas; entretanto, a drenagem pelo sistema linfático comprometido não é capaz de atender às demandas e facilita o acúmulo de fluido intersticial em pressões venosas mais baixas. Os defeitos anatômicos e funcionais (verde claro) poderiam explicar a redução da reserva linfática.

a maioria das condições, não há reabsorção sustentada de fluido intersticial na extremidade venosa dos leitos capilares; que o fluxo transvascular é geralmente unidirecional (do lúmen capilar ao interstício); e que essa drenagem, até 8 L/dia, é fornecida pelos linfáticos (32). Partindo do pressuposto de que a pressão osmótica da albumina ($\sigma\pi$) foi semelhante entre os grupos de estudo baseados em concentrações plasmáticas semelhantes, a pressão hidráulica de equilíbrio acima da qual o extravasamento líquido de fluidos começa a transbordar o interstício (ou seja, gerar edema) é determinada principalmente pela drenagem linfática. Nossos resultados mostraram que essa pressão (P_i) foi menor em pacientes com ICPEP em comparação a indivíduos CS em relação a braços e pernas. Uma P_i mais baixa e uma PVC mais alta (como é possível estimar pelos valores da P_v na Tabela 2) deixam os pacientes com ICPEP com uma faixa de pressões muito mais baixa que pode ser compensada por seus vasos linfáticos. Em outras palavras, elas

parecem ter reduzido a “reserva linfática” (Ilustração Central).

O SISTEMA LINFÁTICO. Os vasos linfáticos são organizados em uma série de unidades funcionais coordenadas, cada uma chamada linfangion, separadas por válvulas intraluminais unilaterais e capazes de realizar atividade de bombeamento espontâneo. Sua fisiologia apresenta semelhanças marcantes com a função cardíaca (como um ciclo sístole-diástole e uma contratilidade modulada por pré- e pós-carga), proporcionando uma notável plasticidade em resposta ao aumento das necessidades (33). A complexidade da maquinaria contrátil, função valvar e coordenação eletromecânica sugere que o comprometimento funcional, e não somente a separação anatômica tradicionalmente implicada na maioria dos distúrbios linfáticos secundários, também pode contribuir para a doença sempre que um desequilíbrio se desenvolver entre a filtração microvascular e a drenagem linfática. Na verdade, foi sugerido que todo “edema crônico

poderia ser considerado sinônimo de linfedema” (34), previsto como uma insuficiência linfática relativa ou uma reserva inadequada. Nossos resultados funcionais corroboram essa contenção em ICPEP.

As alterações morfológicas observadas nos linfáticos da pele, com rarefação de capilares terminais e vasos residuais maiores, bem como a redução da expressão gênica de fatores importantes para a linfangiogênese e a manutenção da integridade valvar e vascular (27,28), oferecem apenas pistas preliminares sobre o que sustenta o defeito funcional observado em ICPEP. Em particular, não conseguimos identificar de maneira conclusiva a causa e o efeito. Com base em nossos resultados, podemos apenas especular se um defeito constitutivo ou uma reserva funcional limitada do sistema linfático é um fator predisponente primário de uma síndrome clínica evidente quando ocorrem insultos adicionais (ou seja, inflamação crônica impulsionada por comorbidade ou PVC elevada) ou, vice-versa, um resultado de seus efeitos prejudiciais potencialmente aditivos de longo prazo (35,36). Este último (ou seja, uma consequência de comorbidades e de lesão de órgão-alvo com disfunção diastólica) estaria de acordo com as alterações morfológicas e a capacidade máxima de bombeamento linfático prejudicada relatada em pacientes com circulação de Fontan, nos quais o aumento crônico da PVC induziria a compensação inicial do pós-carga, mas falha em longo prazo (26). Por outro lado, um defeito predisposto subjacente lembraria os casos com linfedema secundário, nos quais alterações sistêmicas na drenagem linfática precedem o início clínico do linfedema e afetam também os membros contralaterais (37,38). A detecção do comprometimento linfático nos membros superiores, em que nem mesmo traços de edema foram detectados nos grupos em comparação às panturrilhas ou aos tornozelos de alguns de nossos pacientes com ICPEP, sugere uma natureza sistêmica do fenômeno, embora o envolvimento de outros leitos microvasculares específicos a órgãos ainda precise ser investigado.

Independentemente de considerações sobre “o que vem primeiro”, a capacidade reduzida do sistema linfático para prevenir ou minimizar o desenvolvimento de edema pode marcar a distinção clínica e prognóstica entre pacientes com comorbidade sem complicações e aqueles que se apresentam como ICPEP (3). Além disso, ao direcionar o edema e suas implicações disfuncionais e inflamatórias, com a melhoria da função linfática, é possível: melhorar a qualidade de vida, o desempenho muscular e a tolerância ao exercício; interromper ciclos inflamatórios viciosos; e reduzir a necessidade ou a dose de tratamento diurético para manter a descongestão sustentada. É importante observar que, embora rotineiramente impraticável em sua abordagem cirúrgica,

a drenagem do ducto torácico externo com sucesso na IC avançada já se mostrou uma promessa terapêutica como prova de conceito (39).

LIMITAÇÕES DO ESTUDO. Além da já mencionada falta de demonstração de causalidade, o que justifica estudos adicionais dedicados, outras limitações merecem ser mencionadas. Indivíduos saudáveis foram escolhidos como indivíduos controle, e não houve a comparação de ICPEP com pacientes com comorbidade compatível; de modo semelhante, uma comparação entre pacientes com ICPEP com e sem obesidade (35) definiria melhor a especificidade de nossos achados. É importante observar que nenhuma das classes de medicamentos em uso no estudo, incluindo bloqueadores dos canais de cálcio (40), foi relatada como tendo afetado adversamente a função linfática *in vivo*. Para nossas conclusões, assumimos pressões osmóticas semelhantes de albumina (σ_{II}), que são críticas para a pressão isovolumétrica *ex vivo* (32), entre os grupos; como a medição precisa do vazamento de vasos sanguíneos para albumina (ou seja, σ) é incômoda e inviável em ambientes clínicos, a suposição foi baseada em concentrações plasmáticas de albumina semelhantes. Notavelmente, mesmo que o excesso de permeabilidade dos vasos sanguíneos em ICPEP fosse demonstrado, a compensação relativa fornecida pelos linfáticos continuaria sendo inadequada. Por fim, avaliamos vários parâmetros fisiológicos e não podemos excluir a presença de erro do tipo I; da mesma forma, nosso tamanho de amostra evitou a subfenotipagem da coorte de ICPEP.

CONCLUSÕES

Este estudo fornece a primeira descrição das alterações morfológicas e funcionais na vasculatura linfática em ICPEP, resultando na redução da depuração do fluido extravasado. Juntamente com a demonstração de uma densidade microvascular do sangue reduzida na pele, esses achados chamam atenção para uma microcirculação global e sistemicamente defeituosa. Essa definição se estende além da disfunção arterial tradicional e exige uma melhor compreensão do papel de artérias, veias, vasos linfáticos e sua relação mútua com a homeostase do fluido do tecido (e provavelmente inflamatória) na patogênese dessa doença síndrômica multifacetada.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a K. Brooksbank, A. Brown e à equipe do centro de pesquisa clínica pela coordenação da pesquisa; a J. Gamble e A. Montezano pelas contribuições metodológicas; a M. Beglan, H. Yu, S. Lacchini, A. Anagnostopoulou e Prof. N. Al-Attar pelo apoio em todas as análises *ex vivo*; às sedes de “Bearsden and Milngavie” e

“Glasgow West End” da University of the Third Age pela contribuição ativa para o recrutamento de voluntários; e, principalmente, a todos os nossos participantes.

DECLARAÇÕES DOS AUTORES

Esse estudo recebeu apoio dos *British Heart Foundation Centre of Research Excellence Awards*, concedido aos Drs. Touyz, Delles, Petrie e Rossitto (RE/13/5/30177 e RE/18/6/34217+). A Dra. Touyz recebe apoio do *British Heart Foundation Chair Award* (CH/12/29762). Os autores informaram não ter relações relevantes para os conteúdos deste artigo a serem declaradas.

PERSPECTIVAS

COMPETÊNCIA EM CONHECIMENTO MÉDICO: Em pacientes com ICPEP, a disfunção microvascular sistêmica, incluindo a rarefação vascular, envolve os vasos capilares e linfáticos, reduzindo a reserva linfática e desregulando a homeostase do fluido intersticial vascular.

PANORAMA TRANSLACIONAL: Uma compreensão melhor dos mecanismos estruturais e moleculares responsáveis pela redução da reserva linfática pode facilitar o desenvolvimento de intervenções farmacológicas que melhorem a drenagem do fluido intersticial em pacientes com drenagem do fluido de ICPEP.

REFERÊNCIAS

1. Benjamin EJ, Virani SS, Callaway CW, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2018 Update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2018;137:e67-492.
2. Chang PP, Wruck LM, Shahar E, et al. Trends in hospitalizations and survival of acute decompensated heart failure in four US communities (2005-2014): ARIC study community surveillance. *Circulation* 2018;138:12-24.
3. Campbell RT, Jhund PS, Castagno D, Hawkins NM, Petrie MC, McMurray JJ. What have we learned about patients with heart failure and preserved ejection fraction from DIG-PEF, CHARM-preserved, and I-PRESERVE? *J Am Coll Cardiol* 2012;60:2349-56.
4. Borlaug BA, Melenovsky V, Russell SD, et al. Impaired chronotropic and vasodilator reserves limit exercise capacity in patients with heart failure and a preserved ejection fraction. *Circulation* 2006;114:2138-47.
5. Pfeffer MA, Shah AM, Borlaug BA. Heart failure with preserved ejection fraction in perspective. *Circ Res* 2019;124:1598-617.
6. Paulus WJ, Tschope C. A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation. *J Am Coll Cardiol* 2013;62:263-71.
7. Shah SJ, Lam CSP, Svedlund S, et al. Prevalence and correlates of coronary microvascular dysfunction in heart failure with preserved ejection fraction: PROMIS-HFpEF. *Eur Heart J* 2018;39:3439-50.
8. D'Amario D, Migliaro S, Borovac JA, et al. Microvascular dysfunction in heart failure with preserved ejection fraction. *Front Physiol* 2019;10:1347.
9. Mohammed SF, Hussain S, Mirzoyev SA, Edwards WD, Maleszewski JJ, Redfield MM. Coronary microvascular rarefaction and myocardial fibrosis in heart failure with preserved ejection fraction. *Circulation* 2015;131:550-9.
10. Haykowsky MJ, Brubaker PH, John JM, Stewart KP, Morgan TM, Kitzman DW. Determinants of exercise intolerance in elderly heart failure patients with preserved ejection fraction. *J Am Coll Cardiol* 2011;58:265-74.
11. Kitzman DW, Nicklas B, Kraus WE, et al. Skeletal muscle abnormalities and exercise intolerance in older patients with heart failure and preserved ejection fraction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2014;306:H1364-70.
12. Dhakal BP, Malhotra R, Murphy RM, et al. Mechanisms of exercise intolerance in heart failure with preserved ejection fraction: the role of abnormal peripheral oxygen extraction. *Circ Heart Fail* 2015;8:286-94.
13. Kitzman DW, Upadhyya B, Vasu S. What the dead can teach the living: systemic nature of heart failure with preserved ejection fraction. *Circulation* 2015;131:522-4.
14. Titze J, Lang R, Ilies C, et al. Osmotically inactive skin Na₂ storage in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;285:F1108-17.
15. Machnik A, Neuhofer W, Jantsch J, et al. Macrophages regulate salt-dependent volume and blood pressure by a vascular endothelial growth factor-C-dependent buffering mechanism. *Nat Med* 2009;15:545-52.
16. Kopp C, Linz P, Dahlmann A, et al. 23Na magnetic resonance imaging-determined tissue sodium in healthy subjects and hypertensive patients. *Hypertension* 2013;61:635-40.
17. Karg MV, Bosch A, Kannenkeril D, et al. SGLT-2-inhibition with dapagliflozin reduces tissue sodium content: a randomised controlled trial. *Cardiovasc Diabetol* 2018;17:5.
18. Schneider MP, Raff U, Kopp C, et al. Skin sodium concentration correlates with left ventricular hypertrophy in CKD. *J Am Soc Nephrol* 2017;28:1867-76.
19. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, et al. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J* 2016;37:2129-200.
20. Rossitto G, Mary S, Chen JY, et al. Tissue sodium excess is not hypertonic and reflects extracellular volume expansion. *Nat Commun* 2020;11:4222.
21. Gamble J, Gartside IB, Christ F. A reassessment of mercury in silastic strain gauge plethysmography for microvascular permeability assessment in man. *J Physiol* 1993;464:407-22.
22. Wilkinson IB, Webb DJ. Venous occlusion plethysmography in cardiovascular research: methodology and clinical applications. *Br J Clin Pharmacol* 2001;52:631-46.
23. Gamble J. Realisation of a technique for the non-invasive, clinical assessment of microvascular parameters in man; the KM factor. *Eur Surg Res* 2002;34:114-23.
24. Stewart JM. Microvascular filtration is increased in postural tachycardia syndrome. *Circulation* 2003;107:2816-22.
25. Bauer A, Christ F, Gamble J. Can lymphatic drainage be measured non-invasively in human limbs, using plethysmography? *Clin Sci* 2004;106:627-33.
26. Mohanakumar S, Telinius N, Kelly B, et al. Morphology and function of the lymphatic vasculature in patients with a Fontan circulation. *Circ Cardiovasc Imaging* 2019;12:e008074.
27. Srinivasan RS, Oliver G. Prox1 dosage controls the number of lymphatic endothelial cell progenitors and the formation of the lymphovenous valves. *Genes Dev* 2011;25:2187-97.
28. Cha B, Geng X, Mahamud MR, et al. Complementary Wnt sources regulate lymphatic vascular development via PROX1-dependent Wnt/beta-catenin signaling. *Cell Rep* 2018;25:571-84.
29. Henri O, Pouehe C, Houssari M, et al. Selective stimulation of cardiac lymphangiogenesis reduces myocardial edema and fibrosis leading to improved cardiac function following myocardial infarction. *Circulation* 2016;133:1484-97.

30. Fearon WF, Balsam LB, Farouque HM, et al. Novel index for invasively assessing the coronary microcirculation. *Circulation* 2003;107:3129-32.
31. Pries AR, Reglin B. Coronary microcirculatory pathophysiology: can we afford it to remain a black box? *Eur Heart J* 2017;38:478-88.
32. Levick JR, Michel CC. Microvascular fluid exchange and the revised Starling principle. *Cardiovasc Res* 2010;87:198-210.
33. Scallan JP, Zawieja SD, Castorena-Gonzalez JA, Davis MJ. Lymphatic pumping: mechanics, mechanisms and malfunction. *J Physiol* 2016;594:5749-68.
34. Mortimer PS, Rockson SG. New developments in clinical aspects of lymphatic disease. *J Clin Invest* 2014;124:915-21.
35. Escobedo N, Oliver G. The lymphatic vasculature: its role in adipose metabolism and obesity. *Cell Metab* 2017;26:598-609.
36. Scallan JP, Hill MA, Davis MJ. Lymphatic vascular integrity is disrupted in type 2 diabetes due to impaired nitric oxide signalling. *Cardiovasc Res* 2015;107:89-97.
37. Stanton AW, Modi S, Bennett Britton TM, et al. Lymphatic drainage in the muscle and subcutis of the arm after breast cancer treatment. *Breast Cancer Res Treat* 2009;117:549-57.
38. Burnand KM, Glass DM, Mortimer PS, Peters AM. Lymphatic dysfunction in the apparently clinically normal contralateral limbs of patients with unilateral lower limb swelling. *Clin Nucl Med* 2012;37:9-13.
39. Witte MH, Dumont AE, Clauss RH, Rader B, Levine N, Breed ES. Lymph circulation in congestive heart failure: effect of external thoracic

duct drainage. *Circulation* 1969;39:723-33.

40. Telinius N, Mohanakumar S, Majgaard J, et al. Human lymphatic vessel contractile activity is inhibited in vitro but not in vivo by the calcium channel blocker nifedipine. *J Physiol* 2014;592:4697-714.

PALAVRAS-CHAVE edema, fração de ejeção preservada, insuficiência cardíaca, interstício, linfático, microcirculação, rarefação vascular

APÊNDICE Para acesso às seções de Métodos e Referências expandidas, bem como figuras e tabelas suplementares, confira a versão on-line deste artigo.