



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**ANAÍARA LUCENA QUEIROZ**

**PROTEÍNA KLOTHO, BIOMARCADORES DE LESÃO ENDOTELIAL E DÉFICIT  
COGNITIVO EM PACIENTES COM DOENÇA RENAL CRÔNICA NÃO DIALÍTICA**

**FORTALEZA**

**2023**

ANAIARA LUCENA QUEIROZ

PROTEÍNA KLOTHO, BIOMARCADORES DE LESÃO ENDOTELIAL E DÉFICIT  
COGNITIVO EM PACIENTES COM DOENÇA RENAL CRÔNICA NÃO DIALÍTICA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Farmacologia. Área de concentração: Neurofarmacologia.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Danielle Macêdo Gaspar.

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

Q42p Queiroz, Anaiara Lucena.  
Proteína Klotho, biomarcadores de lesão endotelial e déficit cognitivo em pacientes com doença renal crônica não dialítica / Anaiara Lucena Queiroz. – 2023.  
105 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2023.  
Orientação: Prof. Dr. Danielle Macêdo Gaspar.

1. Doença renal crônica. 2. Declínio cognitivo. 3. Proteínas Klotho. 4. Fator de Crescimento de Fibroblastos 23. 5. VCAM-1. I. Título.

CDD 615.1

---

ANAIARA LUCENA QUEIROZ

PROTEÍNA KLOTTHO, BIOMARCADORES DE LESÃO ENDOTELIAL E DÉFICIT  
COGNITIVO EM PACIENTES COM DOENÇA RENAL CRÔNICA NÃO DIALÍTICA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Farmacologia. Área de concentração: Neurofarmacologia.

Aprovada em: 10/07/2023.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Danielle Macêdo Gaspar (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Elizabeth de Francesco Daher  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Geraldo Bezerra da Silva Júnior  
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Bernardete Cordeiro de Sousa  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Liana Rosa Elias  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais, Regilânio (*in memoriam*) e

Ana.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer inicialmente à minha orientadora, a professora e doutora Danielle Macedo, que considero uma grande pesquisadora, que me acolheu como sua aluna de doutorado, com sua gentileza e inteligência, foi fundamental neste estudo, abrilhantando com o seu saber esta pesquisa de doutorado. Tenho uma enorme admiração!

Aos meus pais Regilanio (in memoriam) e Ana Maria, por toda dedicação e por todas as renúncias que fizeram por mim. Ambos exerceram a profissão de médicos exemplarmente e foram espelho para que eu seguisse o mesmo caminho. Amo vocês!

Aos meus filhos, Ana Clara e Mateus, vocês são o estímulo que tenho diariamente de crescer tanto profissionalmente como pessoalmente.

Ao Wesley, que mesmo de longe, me deu todo apoio e demonstrou todo o cuidado, nas longas horas de estudo e nos momentos de mais aflição. Muito obrigada amor!

À neuropsicóloga Allisandra, que me acompanhou na árdua jornada de aplicação e análise dos testes neuropsicológicos, que demandaram longas horas de trabalho. Agradeço enormemente sua competência, parceria e disponibilidade sempre que precisei.

À enfermeira Marylane, que nos auxiliou com grande habilidade na coleta dos exames laboratoriais e sempre muito prestativa. Obrigada!

Ao colega médico e pesquisador doutor Adriano, que quando ainda interno, me incentivou a dar início a jornada do doutorado e me apresentou ao Laboratório de Farmacologia da professora Danielle Macedo. Gratidão!

A Deus, por proporcionar mais essa conquista na minha vida, me capacitando e providenciando tudo perfeitamente para a concretização desta pesquisa.

Aos grandiosos professores participantes da banca examinadora, pelo tempo despendido para ler o trabalho e pelas valiosas colaborações e sugestões a fim de torná-lo ainda melhor. Meu sincero obrigada!

“Klotho gira o fio da vida, Lachesis determina seu comprimento e Atropos o corta.”

*(Mitologia grega, autor desconhecido).*

## RESUMO

A Doença Renal Crônica (DRC) caracteriza-se por um dano renal progressivo evidenciado através da redução da taxa de filtração glomerular. Déficit cognitivo é comum em pacientes com DRC e a fisiopatologia exata não é completamente compreendida. Os níveis séricos da proteína Klotho são significativamente menores em pacientes com DRC que em pacientes saudáveis, reduzindo também os níveis de Klotho cerebral. A proteína Klotho, produzida pelo rim, correceptor para o FGF23, parece ser necessária para a neuroproteção. Para compreender a correlação da proteína Klotho com os distúrbios cognitivos, foram selecionados 52 pacientes, 40 portadores de DRC em tratamento conservador acompanhados no ambulatório de Nefrologia do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), Universidade Federal do Ceará (UFC), e 12 pacientes do grupo controle. Função cognitiva foi avaliada através da aplicação dos seguintes testes neuropsicológicos: Teste de Aprendizagem Auditivo-Verbal de Rey, Teste dos cinco dígitos, Tarefa de Alcance de Dígitos Ordens Direta e Inversa, Tarefa de Cubos de Corsi, Teste de Stroop, Teste de Trilhas, Tarefas de Fluência Verbal Semântica e Fonêmica. Dosagem sérica de Klotho, FGF23 e biomarcadores de lesão endotelial (VCAM-1, Angiopietina 1 e 2) foram mensurados. Níveis séricos de Klotho foram significativamente diminuídos em pacientes com DRC quando comparado ao grupo controle ( $p=0,015$ ). VCAM-1 e Angiopietina 2 foram significativamente aumentados nos pacientes com DRC comparados com o grupo controle ( $p=0,012$  e  $p=0,03$ , respectivamente). Aumento dos níveis de FGF23 foi associado a redução da taxa de filtração glomerular ( $\rho=-0,636$ ,  $p=0,035$ ) e a menor pontuação em um teste de memória RAVLT ( $\rho=-0,626$ ,  $p=0,04$ ) em pacientes com DRC moderada/severa. Foi evidenciado de forma contundente que a redução dos níveis séricos da proteína Klotho em pacientes com DRC moderada/severa ( $\text{TFG} < 45 \text{ mL/min/1,73m}^2$ ) estão associados com níveis elevados de VCAM-1 ( $p=0,019$ ) e ambos, a redução dos níveis séricos de Klotho e aumento do VCAM-1 foram associados a pior desfecho em vários domínios de cognição nos testes neurocognitivos. Esses dados correlacionam a proteína Klotho sérica a déficit cognitivo, e sugerem que a dosagem de Klotho sérico seja um possível marcador de dano cognitivo incipiente, mesmo em pacientes sem diagnóstico clínico de doença cerebrovascular.

**Palavras-chave:** Doença Renal Crônica; Declínio Cognitivo; Proteínas Klotho; Fator de Crescimento Fibroblastos 23; VCAM-1.

## KLOTHO PROTEIN, BIOMARKERS OF ENDOTHELIAL DAMAGE AND COGNITIVE IMPAIRMENT IN PATIENTS WITH NON-DIALYSIS CHRONIC KIDNEY DISEASE

### ABSTRACT

Chronic Kidney Disease (CKD) is characterized by progressive kidney damage evidenced by a reduction in the glomerular filtration rate. Cognitive dysfunction is common in patients with CKD and the exact pathophysiology of cognitive impairment in CKD is not completely understood. Serum levels of Klotho protein are significantly lower in patients with CKD than in healthy patients, also reducing cerebral Klotho levels. The Klotho protein, produced by the kidney, coreceptor of FGF23, appears to be necessary for neuroprotection. To understand the correlation of the Klotho protein with cognitive disorders, 52 patients were selected, 40 with non-dialytic CKD followed at the Nephrology outpatient clinic of the Walter Cantídio University Hospital (HUWC), Federal University of Ceará (UFC), and 12 patients from the group control. Cognitive function was assessed through the application of the following neuropsychological tests: Rey's Auditory-Verbal Learning Test (RAVLT), Five Digit Test (FDT), Forward and backward digit span, Corsi's Cube Task, Stroop Test, Trial Making Test (TMT) and Phonemic and Semantic verbal fluency tasks. Serum levels of Klotho, FGF23 and endothelial injury biomarkers (VCAM-1, Angiopoietin 1 and 2) were measured. Klotho serum levels were significantly decreased in patients with CKD when compared to the control group ( $p=0,015$ ). VCAM-1 and Angiopoietin 2 were significantly increased in patients with CKD compared to the control group ( $p=0,012$  and  $p=0,03$ , respectively). Increased FGF23 levels were associated with reduced glomerular filtration rate ( $\rho=-0,636$ ,  $p=0,035$ ) and lower scores on a RAVLT memory test ( $\rho= -0.626$ ,  $p=0,04$ ) in patients with moderate/severe CKD. It was strongly evidenced that the reduction of Klotho protein serum levels in patients with moderate/severe CKD ( $GFR < 45 \text{ mL/min/ } 1,73\text{m}^2$ ) are associated with elevated levels of VCAM 1 ( $p=0,019$ ) and both, the reduction of serum Klotho levels and increased VCAM-1 were associated with worse outcome in several domains of cognition on neurocognitive tests. These data correlate serum Klotho protein with cognitive impairment and suggest that serum Klotho levels are a marker of incipient cognitive impairment, even in patients without a clinical diagnosis of cerebrovascular disease.

**Keywords:** Chronic Kidney Disease; Cognitive Dysfunction; Klotho Proteins; Fibroblast Growth Factor-23; VCAM-1.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Classificação e prognóstico da doença renal crônica baseada na taxa de filtração glomerular e albuminúria.....	20
Figura 2 – Achados neurovasculares em pacientes com doença renal crônica .....	24
Figura 3 – Atrofia do hipocampo associada a albuminúria e redução da taxa de filtração glomerular .....	27
Figura 4 – Efeito da expressão de Klotho na diferenciação da Microglia de M1 para M2	31
Figura 5 – Interação entre Klotho e FGF23 e o seu papel na doença renal .....	33
Figura 6 – Complexo estrutural da proteína Klotho e do FGF23 .....	35
Figura 7 – Complexo de ligação Klotho-FGF23.....	39
Figura 8 – Alterações do eixo de controle do PTH, Klotho e FGF23 na doença renal crônica.....	40

## LISTA DE GRÁFICOS E FLUXOGRAMAS

Gráfico 1	Prevalência de pacientes em diálise no Brasil, 2001-2021 .....	18
Gráfico 2	Déficit cognitivo em pacientes em hemodiálise .....	22
Gráfico 3	Variação dos níveis séricos de Klotho de acordo com a taxa de filtração glomerular e relação com parâmetros do metabolismo mineral .....	36
Gráfico 4	Prevalência do uso de inibidores do Sistema Renina Angiotensina Aldosterona nos grupos de pacientes estudados.....	59
Gráfico 5	Comparação dos níveis de Klotho entre grupos conforme estágio de doença renal crônica.....	63
Gráfico 6	Comparação dos níveis de FGF23 entre grupos conforme estágio de doença renal crônica.....	65
Gráfico 7	Comparação dos níveis de VCAM-1 entre grupos conforme estágio de doença renal crônica.....	67
Gráfico 8	Comparação dos níveis de Angiopietina 2 entre grupos conforme estágio de doença renal crônica .....	68
Gráfico 9	Correlação entre níveis sistêmicos de Klotho com o biomarcador endotelial VCAM-1 .....	69
Fluxograma 1	Desenho do estudo .....	55
Fluxograma 2	Divisão dos grupos de pacientes de acordo com taxa de filtração glomerular e albuminúria .....	56

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1	Classificação dos grupos de pacientes por taxa de filtração glomerular e albuminúria .....	57
Tabela 2	Antecedentes médicos dos pacientes estudados .....	58
Tabela 3	Comparação entre parâmetros clínicos, comorbidades e aspectos de saúde mental entre os grupos estudados .....	61
Tabela 4	Comparação entre os biomarcadores séricos e os diferentes graus de doença renal crônica.....	62
Tabela 5	Correlação entre biomarcadores endoteliais com níveis de Klotho e FGF23 em pacientes com estágio moderado/severo de doença renal crônica .....	69
Tabela 6	Comparação entre parâmetros da avaliação neuropsicológica de acordo com grupos conforme estágio de doença renal crônica .....	72
Tabela 7	Correlação entre parâmetros da avaliação neuropsicológica com níveis de Klotho e FGF23 em pacientes com estágio moderado/severo de doença renal crônica .....	73
Tabela 8	Associação entre níveis de Klotho no grupo estudado com a classificação dos aspectos neuropsicológicos .....	78
Tabela 9	Correlação entre parâmetros da avaliação neuropsicológica com níveis séricos de VCAM-1 e Angiopietina 2 em pacientes com estágio moderado/severo de doença renal crônica .....	82
Quadro 1	Testes neuropsicológicos e domínios cognitivos avaliados .....	47

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
Ang 1	Angiopietina 1
Ang 2	Angiopietina 2
ANOVA	Análise de Variância
BRA	Bloqueador do Receptor de Angiotensina
CA	<i>Cornu ammonis</i>
COX-2	Ciclooxigenase-2
CICr	<i>Clearance</i> de Creatinina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DRC	Doença renal crônica
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ELISA	Ensaio Imunoenzimático (do inglês: <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
E.P.M	Erro Padrão da Média
e.v.	Endovenosa
FDT	Teste dos Cinco Dígitos (do inglês: <i>Five Digit Test</i> )
FVF	Fluência Verbal Fonêmica
FVS	Fluência Verbal Semântica
FGFR	Receptor do fator de crescimento fibroblástico (do inglês: <i>Fibroblast growth factor receptor</i> )
FGF23	Fator de crescimento fibroblástico 23 (do inglês: <i>Fibroblast growth factor 23</i> )
g	Grama
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
ICAM -1	Molécula de adesão intercelular-1 (do inglês: <i>Intercellular adhesion molecule-1</i> )
iECA	Inibidor da enzima conversora de angiotensina
IFN $\gamma$	Interferon gama
IL-6	Interleucina-6
IMC	Índice de massa corporal
IP-IB	Imunoprecipitação-imunoblot
IRA	Injúria Renal Aguda

KDIGO	(do inglês: <i>Kidney Disease: Improving Global Outcomes</i> )
kg	Kilograma
KL	Klotho sérico
L	Litro
min	Minuto
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mmHg	Milímetro de mercúrio
mmol	Milimol
m <sup>2</sup>	Metro quadrado
NFκB	Fator de transcrição nuclear Kappa B (do inglês: <i>Nuclear factor Kappa B</i> )
ng	Nanograma
NO	Óxido nítrico (do inglês: <i>Nitric oxide</i> )
NOS	Enzima óxido nítrico sintase (do inglês: <i>Nitric oxide sintase</i> )
pg	Picograma
PAS	Pressão Arterial Sistólica
RACU	Relação albumina/creatinina urinária
RAVLT	Teste de Aprendizagem Auditivo-Verbal de Rey
RNAm	Ácido Ribonucleico mensageiro
s	Segundo
SNC	Sistema Nervoso Central
SRRA	Sistema renina angiotensina aldosterona
TGF	Taxa de filtração glomerular
TGF-β	Fator transformador de crescimento-beta (do inglês: <i>Transforming growth factor-beta</i> )
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa (do inglês: <i>Tumoral necrosis factor-alpha</i> )
TMT	Teste de Trilhas (do inglês: <i>Trail Making Test</i> )
VCAM-1	Proteína de adesão celular vascular 1 (do inglês: <i>Vascular cell adhesion protein 1</i> )
VEGF 2	Fator de crescimento endotelial vascular 2 (do Inglês: <i>Vascular Endothelial Growth Factor 2</i> )

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>1.1</b>	<b>Epidemiologia da Doença Renal Crônica</b> .....	18
<b>1.2</b>	<b>Definição e Estadiamento da Doença Renal Crônica</b> .....	19
<b>1.3</b>	<b>Déficit cognitivo na Doença Renal Crônica</b> .....	21
1.3.1	<i>Fisiopatologia do déficit cognitivo na Doença Renal Crônica</i> .....	23
1.3.2	<i>Klotho e déficit cognitivo</i> .....	30
<b>1.4</b>	<b>Proteína Klotho: Função, Eliminação e Ação Sistêmica</b> .....	34
<b>1.5</b>	<b>Klotho e Doença Renal</b> .....	37
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	41
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	42
<b>3.1</b>	<b>Geral</b> .....	42
<b>3.2</b>	<b>Específicos</b> .....	42
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	43
<b>4.1</b>	<b>Delineamento, Local e Período do estudo</b> .....	43
<b>4.2</b>	<b>População do estudo</b> .....	43
4.2.1	<i>Critérios de inclusão (Grupo de pacientes com DRC)</i> .....	43
4.2.2	<i>Critérios de Exclusão</i> .....	43
4.2.3	<i>Grupo Controle</i> .....	44
<b>4.3</b>	<b>Desenho do Estudo</b> .....	44
4.3.1	<i>Avaliação Laboratorial</i> .....	44
4.3.2	<i>Entrevista Médica</i> .....	45
4.3.3	<i>Avaliação Neuropsicológica</i> .....	46
4.3.3.1	<i>Teste de Aprendizagem Auditivo-Verbal de Rey – RAVLT</i> .....	48
4.3.3.2	<i>Teste dos Cinco Dígitos -Five Digit Test- FDT</i> .....	48
4.3.3.3	<i>Tarefa de Alcance de Dígitos Ordens Direta e Inversa</i> .....	49
4.3.3.4	<i>Tarefa de Cubos de Corsi Ordens Direta e Inversa</i> .....	50
4.3.3.5	<i>Teste Stroop Victoria (Versão Adaptada)</i> .....	51
4.3.3.6	<i>Teste de Trilhas - Trail Making Test (TMT) - Partes A e B</i> .....	52
4.3.3.7	<i>Tarefa de Fluência Verbal Semântica (FVS) - Categoria Animais e Tarefa de Fluência Verbal Fonêmica (FVF) Letras F-A-S</i> .....	52
<b>4.4</b>	<b>Aspectos éticos</b> .....	53

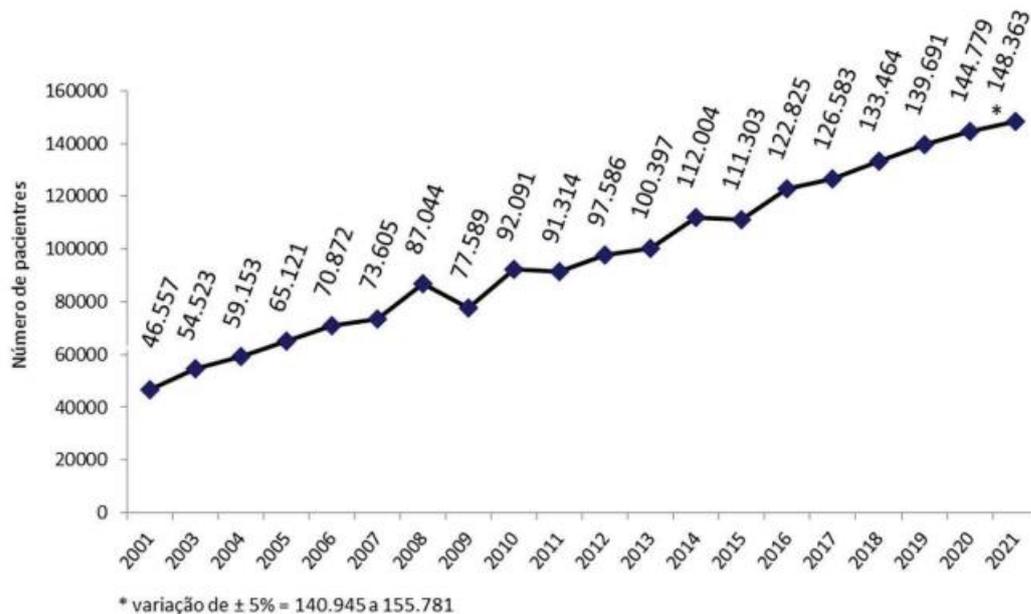
4.5	Análise estatística .....	53
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	55
5.1	Amostra, parâmetros clínicos e demográficos .....	55
5.2	Quantificação dos níveis séricos de Klotho em pacientes com DRC .....	61
5.3	Quantificação dos níveis séricos de FGF23 nos pacientes com DRC .....	64
5.4	Quantificação dos níveis séricos de marcadores de lesão endotelial VCAM-1 e Angiopietina 2 em pacientes com DRC .....	66
5.5	Correlação entre níveis séricos de Klotho e VCAM-1 em DRC moderada/severa .....	69
5.6	Correlação níveis séricos de Klotho e Albuminúria em pacientes com DRC moderada/severa .....	70
5.7	Correlação entre parâmetros de avaliação neuropsicológica e classificação da DRC .....	71
5.8	Correlação entre níveis séricos de Klotho e Testes Neuropsicológicos em pacientes com DRC moderada/severa .....	74
5.8.1	<i>Teste dos Cinco dígitos-FDT (Five Digit Test)</i> .....	74
5.8.2	<i>Tarefa de Alcance de Dígitos Ordem Inversa</i> .....	75
5.8.3	<i>Tarefa de Cubos de Corsi Ordens Direta e Inversa</i> .....	75
5.8.4	<i>Teste Stroop Victoria (Versão Adaptada)</i> .....	76
5.8.5	<i>Teste de Trilhas-Trail Making Test (TMT) - Partes A e B</i> .....	76
5.9	Correlação entre níveis séricos de FGF23 e RAVLT em pacientes com DRC moderada/severa .....	80
6	Correlação entre níveis séricos de VCAM-1 e Angiopietina 2 e Testes Neuropsicológicos em pacientes com DRC moderada/severa .....	81
7	<b>CONCLUSÃO</b> .....	83
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	84
	<b>ANEXO – PARECER COMITÊ DE ÉTICA</b> .....	98
	<b>APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO</b> .....	100
	<b>APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO UTILIZADO NA ENTREVISTA</b> .....	103

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Epidemiologia da Doença Renal Crônica

A Doença Renal Crônica (DRC) caracteriza-se por um dano renal progressivo evidenciado através da redução da taxa de filtração glomerular. A incidência de DRC tem aumentado nos últimos anos devido ao envelhecimento da população e aumento da expectativa de vida. A prevalência global estimada de pacientes em diálise crônica no Brasil conforme o relatório do Censo Brasileiro de Diálise de 2021 foi de 148.363 (Gráfico 1) (NERBASS *et al.*, 2022).

**Gráfico 1 - Prevalência de pacientes em diálise no Brasil, 2001 a 2021.**



Fonte: Censo Brasileiro de Diálise 2021: análise de dados da década 2001 a 2021. (NERBASS *et al.*, 2022).

Segundo o Censo Brasileiro de Diálise de 2021, as causas mais comuns de DRC no Brasil são a hipertensão (32%) e o diabetes (30%), seguidos por glomerulonefrites crônicas (8%) e doença policística renal (4%). Outras condições foram responsáveis por 11% dos casos, e em 15%, a causa da DRC não foi estabelecida. Estas percentagens não têm mudado significativamente nos últimos anos (NERBASS *et al.*, 2022).

## 1.2 Definição e estadiamento da Doença Renal Crônica

Doença renal crônica é definida como anormalidade na estrutura ou função renal presente em pelo menos três meses com importantes implicações na saúde. Estas alterações, conforme a diretriz do KDIGO (*The Kidney Disease Improving Global Outcome*), incluem diminuição da taxa de filtração glomerular (TFG)  $< 60 \text{ mL/min/1,73m}^2$  ou marcadores de dano renal, mesmo com TFG superior a  $60 \text{ mL/min/1,73m}^2$  (STEVENSON; LEVIN, 2013). Os marcadores de dano renal representam as seguintes alterações: albuminúria (albuminúria  $>$  ou  $= 30 \text{ mg/24 horas}$  ou relação albumina/creatinina urinária  $>$  ou  $= 30 \text{ mg/g}$ ), alterações do sedimento urinário, anormalidades detectadas na histologia renal, anormalidades estruturais detectadas por exames de imagem, anormalidades eletrolíticas causadas por tubulopatias e histórico de transplante renal (EKNOYAN; LAMEIRE, 2013).

A diretriz KDIGO recomenda classificar os indivíduos de acordo com as seis categorias da TFG e três categorias de albuminúria. Através da combinação da avaliação da TFG e o status de albuminúria, um paciente pode ser melhor avaliado como sendo de baixo, moderado, alto ou muito alto risco para piora da função renal e outras complicações, facilitando tomada de decisões no monitoramento e manejo destes pacientes, demonstrado na Figura 1 (LEVIN; STEVENSON, 2014).

**Figura 1 - Classificação e prognóstico da doença renal crônica baseada na taxa de filtração glomerular e albuminúria.**

Prognosis of CKD by GFR and Albuminuria Categories: KDIGO 2012				Persistent albuminuria categories Description and range		
				A1	A2	A3
				Normal to mildly increased	Moderately increased	Severely increased
				<30 mg/g <3 mg/mmol	30-300 mg/g 3-30 mg/mmol	>300 mg/g >30 mg/mmol
GFR categories (ml/min/ 1.73 m <sup>2</sup> ) Description and range	G1	Normal or high	≥90			
	G2	Mildly decreased	60-89			
	G3a	Mildly to moderately decreased	45-59			
	G3b	Moderately to severely decreased	30-44			
	G4	Severely decreased	15-29			
	G5	Kidney failure	<15			

Green: low risk (if no other markers of kidney disease, no CKD); Yellow: moderately increased risk; Orange: high risk; Red, very high risk.

Fonte: KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease (EKNOYAN; LAMEIRE, 2013).

O critério da TFG é classificado em estágios dependendo do grau de diminuição da TFG: estágio I corresponde a TFG > 90 mL/min/1,73m<sup>2</sup>, estágio II corresponde a TFG entre 60 e 90 mL/min/1,73m<sup>2</sup>, estágio III corresponde a TFG entre 30 e 60 mL/min/1,73m<sup>2</sup>, estágio IV corresponde a TFG < 30 mL/min/1,73m<sup>2</sup> e estágio V corresponde a TFG < 15 mL/min/1,73m<sup>2</sup>. (EKNOYAN; LAMEIRE, 2013).

Em relação a albuminúria, o paciente é classificado em A1=albuminúria normal (relação albumina creatinina urinária-RACU) <30mg/g ou <3 mg/mmol), A2=albuminúria moderadamente elevada (RACU: 30-300 mg/g ou < 3-30 mg/mmol) e A3=albuminúria severamente elevada (RACU > 300 mg/g ou 30mg/mmol) (LEVIN; STEVENS, 2014).

Albuminúria é uma manifestação de doenças que afetam a membrana capilar glomerular alterando a permeabilidade seletiva, está associada a aumento da morbidade e mortalidade cardiovascular, mesmo na ausência de diagnóstico prévio de hipertensão arterial sistêmica (HAS) ou diabetes (BERZING; SALANT, 2021).

A DRC caracteriza-se por diversas complicações metabólicas e funcionais, e estas

complicações agravam-se com a piora progressiva da função renal. As principais complicações da DRC são anemia, HAS, doença cardiovascular, doença mineral óssea, distúrbios hidroeletrólíticos, imunossupressão, risco aumentado para infecções, déficit cognitivo, entre outras.

Fortes evidências têm demonstrado alta prevalência de distúrbios neuropsiquiátricos, principalmente cognitivos, depressão e ansiedade em pacientes com DRC. Estas condições neuropsiquiátricas estão associadas a piores desfechos clínicos, incluindo piora na qualidade de vida, hospitalização prolongada e aumento de risco de mortalidade (SILVA *et al.*, 2019).

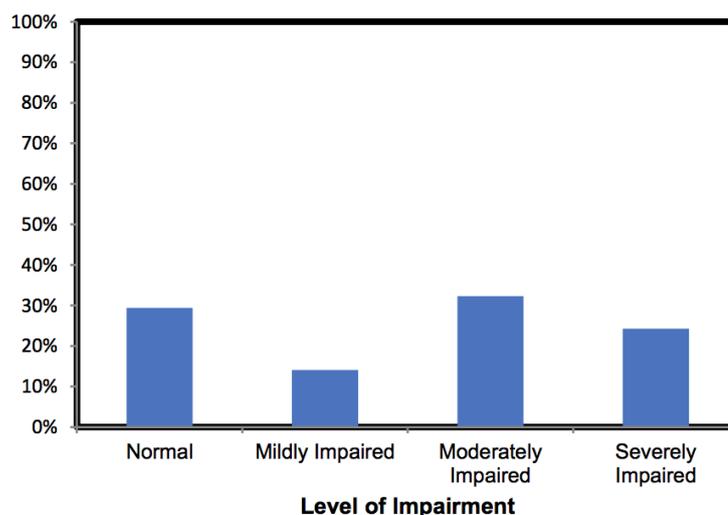
### **1.3 Déficit cognitivo na Doença Renal Crônica**

Várias evidências têm demonstrado uma alta prevalência de distúrbios neuropsiquiátricos, principalmente declínio cognitivo, depressão e ansiedade em pacientes com DRC (SILVA *et al.*, 2019). Déficit cognitivo está associado a aumento da morbidade e mortalidade em pacientes com DRC. A taxa de déficit cognitivo chega a atingir cerca de 27-67% de pacientes com DRC severa (TFG  $\leq$  ou = 15 mL/min/1,73m<sup>2</sup>). Nesta população, é um preditor independente para mortalidade e sobrevida em pacientes em diálise e piora na qualidade de vida destes pacientes (BERGER *et al.*, 2016). Em pacientes com DRC, a prevalência de distúrbios cognitivos (incluindo distúrbios cognitivos leve e demência) é aumentada mesmo em pacientes jovens (21-44 anos de idade) (VIGGIANO *et al.*, 2020).

A DRC, além de ser um importante fator de risco para déficit cognitivo leve, também está relacionada à demência. Em um estudo longitudinal na população geral, o efeito da DRC no risco de déficit cognitivo leve e demência foi superado apenas de acidente vascular encefálico (AVE) e uso crônico de ansiolíticos, e foi superior ao efeito dos fatores genéticos (VIGGIANO *et al.*, 2020).

Em uma amostra de 314 pacientes dialíticos submetidos a testes neurocognitivos na primeira hora de terapia dialítica, apenas 30% dos pacientes tinham uma função cognitiva intacta, enquanto mais da metade apresentou déficit cognitivo de grau moderado a severo (DREW *et al.*, 2019). Gráfico 2 ilustra esta prevalência.

**Gráfico 2 - Déficit cognitivo em pacientes em hemodiálise.**



Fonte: Cognitive Impairment in CKD: Pathophysiology, Management, and Prevention (DREW *et al.*, 2019, p.783).

Baixo desempenho cognitivo é frequente em pacientes em hemodiálise, afetando principalmente as funções executivas. O desempenho normal no Mini Exame do Estado Mental (*Mini Mental State Examination*-MMSE) não exclui o comprometimento cognitivo, porque mesmo nos indivíduos com pontuação MMSE > ou igual a 24, existe uma frequência aumentada de baixa performance cognitiva. Este exame deve ser utilizado apenas como uma rápida triagem para déficit cognitivo (SARNAR *et al.*, 2013).

Após o controle do fator idade, alterações cognitivas nos diferentes estágios de DRC parecem estar relacionadas à presença e ao grau de albuminúria. Em pacientes com DRC e TFG estimada > 60 mL/min/1,73m<sup>2</sup>, a presença de albuminúria está associada a déficit cognitivo leve (VIGGIANO *et al.*, 2020).

Foi demonstrada uma relação entre disfunção renal e déficit cognitivo em idosos. Marcadores de DRC, como cistatina C e albumina urinária, estão significativamente associados a déficit cognitivo e podem ser usados como marcadores precoces e efetivos para o *screening* do déficit cognitivo em idosos (WEI; WEI; ZHU, 2017; YAFFE *et al.*, 2014).

O déficit cognitivo em pacientes portadores de DRC é predominantemente de natureza cortical, além de alguns distúrbios em menor grau de natureza temporal (JONES *et al.*, 2015). Elias e colaboradores demonstraram que pacientes com diminuição da TFG tiveram redução em testes de memória visual e espacial, memória de curto prazo, concentração e atenção

(ELIAS et al., 2009). Também, foi sugerido por alguns autores que áreas da linguagem, também localizadas no córtex temporal, responsável pela fluência de palavras e compreensão verbal, parecem estar comprometidas em pacientes com DRC avançada (LUX *et al.*, 2010).

Déficit cognitivo é avaliado em domínios cognitivos específicos, incluindo atenção, memória, habilidade visual espacial, linguagem e funções executivas. Pacientes com DRC demonstram déficit de atenção e controle inibitório prejudicado, que é a incapacidade de suprimir ações inapropriadas. Muitas regiões cerebrais são requeridas para a atenção e controle inibitório, incluindo o córtex pré-frontal e o *locus coeruleus* na ponte dorsal, que produzem norepinefrina. Comparado com indivíduos normais, pacientes em hemodiálise tem espessura do córtex pré-frontal reduzida e aumento de conexões para o córtex pré-frontal em comparação com indivíduos normais. Habilidades de linguagem também estão comprometidas em pacientes com DRC, e este é o único domínio cognitivo que mostra correlação linear com o declínio da TFG. Nestes pacientes também há comprometimento de funções executivas e estas ocorrem em maior frequência na DRC que comprometimento na linguagem, memória e habilidades visuoespaciais (VIGGIANO *et al.*, 2020).

Ambas as memórias explícitas e implícitas parecem estar alteradas na DRC. O armazenamento da memória requer a integridade do córtex cerebral, hipocampo e a atividade de neurônios colinérgicos no núcleo *basalis of Meynert*. Em modelos animais, a DRC induz morte neuronal no hipocampo e reduz a atividade colinérgica no núcleo *basalis de Meynert* (JONES *et al.*, 2015).

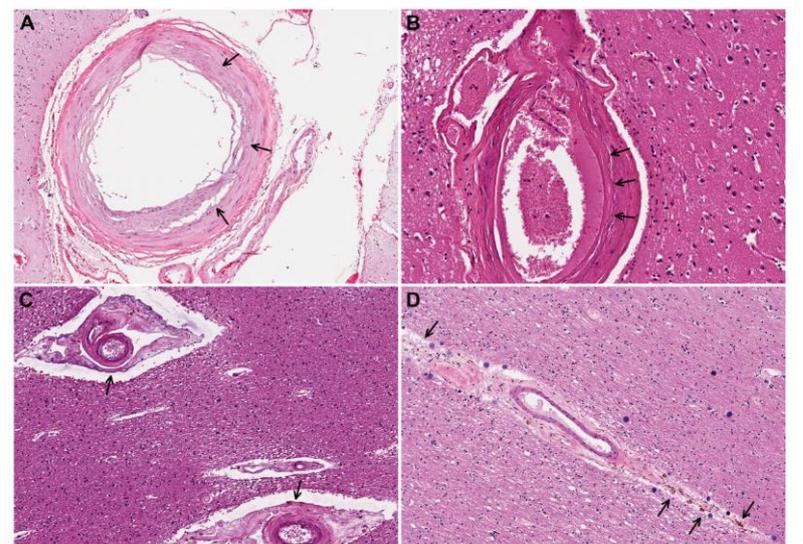
### 1.3.1 Fisiopatologia do déficit cognitivo na DRC

A fisiopatologia exata do déficit cognitivo na DRC não é completamente compreendida, várias funções cerebrais estão comprometidas. A teoria vascular, a principal delas, se deve às similaridades hemodinâmicas entre o rim e o cérebro. Similaridade anatômica e funcional do tecido renal e cerebral leva a susceptibilidade de ambos os órgãos a dano vascular e a fatores de risco cardiovasculares, incluindo envelhecimento, obesidade, diabetes, HAS, dislipidemia e tabagismo. A DRC é um fator de risco para acidente vascular cerebral e demência vascular (SILVA *et al.*, 2019).

Um estudo analisou 40 autópsias de cérebros de pacientes com DRC e observaram uma alta prevalência de aterosclerose e arterioloesclerose (Figura 2). Além disso, os autores chamaram atenção para achados de calcificação vascular severa. Alterações minerais e ósseas, como hiperfosfatemia e hipercalcemia, têm um impacto importante na fisiopatologia da

calcificação vascular. Existem evidências de transformação da musculatura lisa vascular para um fenótipo osteogênico na DRC (VINTERS; MAGAKI; WILLIAMS, 2021).

**Figura 2 - Achados neurovasculares em pacientes com doença renal crônica.**



Fonte: Neuropathologic findings in chronic kidney disease (VINTERS *et al.*, 2021, p. 3).

Descrição: A e B: Artéria meníngea com aterosclerose e hiperplasia da camada íntima; C: Arteríolas de substância branca mostrando hiperplasia canada média e adventícia; D: Macrófagos contendo hemossiderina.

Biomarcadores relacionados a injúria endotelial vascular estão elevados em pacientes com DRC em hemodiálise e estão relacionados à aterosclerose, doença cardiovascular, mortalidade cardiovascular e mortalidade por outras causas. Em pacientes com DRC em hemodiálise níveis de ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*), VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*), e MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) foram significativamente aumentados quando comparados a pacientes saudáveis e os níveis ainda foram maiores após a sessão de hemodiálise (PAPAYIANNI *et al.*, 2002). Um estudo recente demonstrou uma associação estatisticamente significativa entre três biomarcadores de lesão endotelial (ICAM-1, Angiopietina 2 (Ang 2), SYNDECAN-1) e função cognitiva em pacientes DRC dialíticos, demonstrando evidência que doença vascular parece ser um importante fator fisiopatológico do déficit cognitivo em pacientes com DRC. Estes marcadores de lesão endotelial também foram associados com mortalidade cardiovascular nesse grupo de pacientes (MEDEIROS *et al.*, 2020). Em uma amostra de 95 pacientes não dialíticos com DRC (estágios 3-5) e grupo controle com 31 pacientes, foi evidenciado níveis elevados de VCAM-1, fator de Von Willebrand e Angiopietina 2 (Ang 2), no grupo com disfunção renal (PADBERG *et al.*, 2014).

Um estudo mostrou correlação independente, quando ajustado fatores confundidores, de Angiotensina 2 plasmática e albuminúria em pacientes com DRC. O mecanismo que conecta disfunção endotelial, albuminúria e doença cardiovascular é que a disfunção endotelial aumenta a permeabilidade vascular e as perdas albumina no glomérulo (CHANG *et al.*, 2013).

O estudo *Sprint Mind* avaliou o controle pressórico e declínio cognitivo em pacientes com TGF < 60 mL/min/1,73m<sup>2</sup>. Incluiu um detalhado número de testes cognitivos e avaliou especialmente o declínio cognitivo como um dos desfechos secundários. Os resultados deste estudo demonstraram que o grupo de pacientes randomizados para o grupo de controle pressóricos intensivo (pressão arterial sistólica (PAS) < 120 mmHg) foi associada a menor incidência de distúrbio cognitivo leve comparado com o grupo controle (PAS<140 mmHg) (WILLIAMSON *et al.*, 2019).

Uma revisão sistemática, incluindo 38 publicações relevantes, demonstrou que drogas anti-hipertensivas, particularmente bloqueadores do canal de cálcio e bloqueadores do Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRAA) parecem ser benéficos em prevenir distúrbios cognitivos e demência (ROUCH *et al.*, 2015). Após análise multivariada dos dados do estudo ONTARGET/TRANSCEND, no qual 25% dos pacientes tinham DRC, foi evidenciado que em pacientes com redução parcial ou completa da albuminúria tiveram 20% a 40% menor risco de diminuição na pontuação do teste Mini-Mental (3 ou mais pontos) comparado àqueles que tiveram aumento ou nenhuma mudança na albuminúria (BARZILAY *et al.*, 2011).

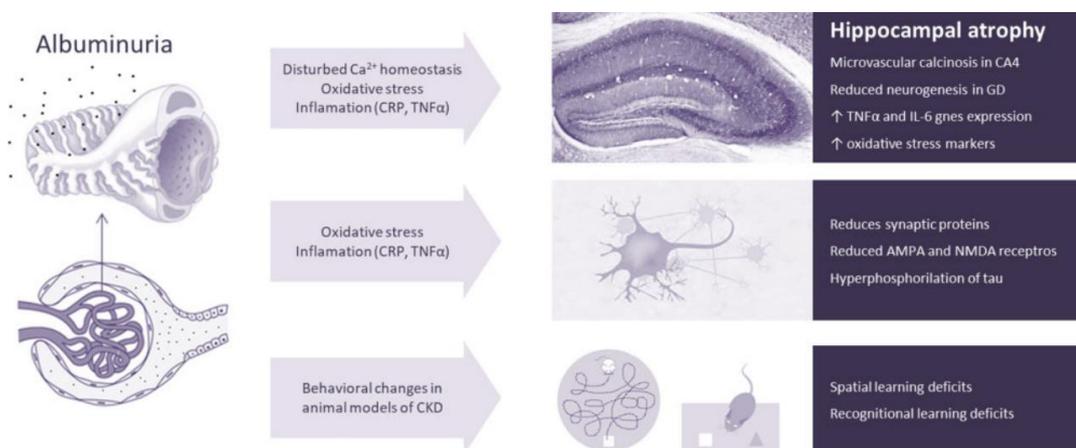
O potencial efeito do SRAA no *cross-talk* rim-cérebro também está sendo investigado. O tratamento com iECA ou BRA exerce efeitos neuroprotetores contra doenças degenerativas, além de serem nefroprotetores. Pacientes portadores de doença de Alzheimer em uso de iECA têm uma taxa reduzida de declínio funcional e o mesmo já foi demonstrado na doença de Parkinson (SILVA *et al.*, 2019).

Os primeiros estudos publicados que demonstram associação entre albuminúria e demência estavam limitados apenas à população idosa. Em um estudo em pacientes idosos do *Cardiovascular Health Cognition Study*, foi evidenciada uma associação entre aumento da albuminúria e demência. Essa associação permaneceu significativa após ajuste de fatores também associados à demência, como HAS, diabetes e prevalência de doença cardiovascular. O autor sugere que este achado pode ser em parte explicado pelas muitas similaridades anatômicas microvasculares encontradas nos cérebros de pacientes com demência e nos rins de pacientes com albuminúria (BARZILAY *et al.*, 2008).

O estudo *Prevention of Renal and Vascular End-Stage Disease* (2017), conduzido na população geral, demonstrou que albuminúria elevada, mas não a estimativa da TFG, estava associada a pior função cognitiva. Esta associação estava apenas presente na amostra de pacientes mais jovens (por volta de 42 anos de idade). Pacientes jovens com albuminúria aumentada, 6 anos antes da aplicação do teste, tiveram pior performance no teste do que aqueles que tinham valores estáveis de albuminúria. Essa associação na população mais jovem, reforça este achado, pois em jovens a prevalência das comorbidades confundidoras é baixa (JOOSTEN *et al.*, 2011).

O aumento da RACU na população geral foi fortemente associada com a presença de imagens cerebrais com doença de pequenos vasos em pacientes adultos jovens e pacientes idosos baseado no estudo de Rotterdam (AKOUDAD *et al.*, 2015), e no estudo Hisayama, aumento da intensidade do volume da substância branca em imagens de ressonância magnética (refletindo deterioração da substância branca cerebral causado por distúrbio de mielina) (YAMASAKI *et al.*, 2020).

**Figura 3 - Atrofia do hipocampo associada a albuminúria e redução da taxa de filtração glomerular.**



Fonte: Albuminúria and cognitive impairment (BIKBOV *et al.*, 2021, p.58).

Albuminúria e queda da TFG podem contribuir para redução do volume do hipocampo com concomitante dano microvascular, resultando em declínio anatômico e funcional hipocampal (Figura 3). O hipocampo faz parte do sistema límbico do cérebro, além de outras funções fisiológicas, está envolvido no processo de formação, consolidação e recuperação da memória (BIKBOV *et al.*, 2021).

O hipocampo é composto por sub-regiões incluindo o *cornu ammonis* (CA) subdividido em partes de 1–4 (CA1–CA4), o ‘giro denteado’ e o ‘*subiculum*’. As regiões do CA contêm três camadas neuronais com células piramidais excitatórias e se conectam por vários circuitos neurais a outras partes do hipocampo. O giro denteado é considerado uma das regiões do cérebro capaz de neurogênese no adulto e parece estar envolvida na manutenção da função cognitiva em especial memória espacial e não espacial (BIKBOV *et al.*, 2021).

Diferentes fatores podem afetar a taxa de neurogênese no adulto e pode contribuir para muitas condições neurológicas e psiquiátricas. Atrofia cerebral está associada ao envelhecimento fisiológico, contudo em pacientes com DRC uma maior prevalência de atrofia cerebral tem sido encontrada, até mesmo em pacientes relativamente jovens com idade média de 60 (+ ou - 12 anos). Em pacientes com DRC, declínio no volume da substância cinzenta parece ser mais rápido e com consequente evolução para déficit cognitivo (TSURUYA; YOSHIDA, 2018). Estudos em vivo utilizando ressonância magnética mostraram que pacientes com DRC têm menor volume de substância cinzenta e hipocampal, além de

diminuição da espessura cortical (CHANG *et al.*, 2017).

Evidências sugerem que a inflamação renal, envolvendo citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento são fatores chave na patogênese da doença renal crônica (GIUNTA *et al.*, 2008; MORTEGA; FORMANI, 2010). Inflamação sistêmica, incluindo aumento de citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio são encontrados em pacientes com DRC, porém pouco se sabe como a inflamação pode contribuir para função anormal do cérebro (DEGASPARI *et al.*, 2015). Inflamação é um achado comum em lesões cerebrais e renais, portanto, é razoável assumir que mediadores inflamatórios podem facilitar o *cross-talk* rim-cérebro. O perfil proteômico de mediadores inflamatórios séricos como IL-10 e proteína C reativa exibiu 93% de acurácia em predizer déficit cognitivo secundária a DRC (SILVA *et al.*, 2019).

Alterações na permeabilidade da barreira hematoencefálica, estresse oxidativo, neuroinflamação, neurotransmissores, neurotrofinas, neurogênese, apoptose, e disfunção nas conexões sinápticas são frequentemente presentes na maioria das doenças neurológicas. A DRC e doenças do SNC (Sistema Nervoso Central) têm algumas características comuns, particularmente estresse oxidativo e inflamação. Na DRC particularmente, ocorre retenção de vários solutos que normalmente são excretados. A presença de doença neurológica em pacientes com DRC sob tratamento dialítico implica o potencial efeito patogênico de solutos não dialisáveis. O sulfato de p-Cresol, um tipo de toxina urêmica ligada a proteína, é gerada no fígado e por bactérias intestinais através da lise da tirosina e fenilalanina. Este metabólito é produzido pelo microbiota intestinal e progressivamente acumula em pacientes com DRC devido sua alta ligação a proteínas plasmáticas e já foi identificado como um potencial contribuinte para complicações clínicas (SUN *et al.*, 2020).

Em ratos nefrectomizados submetidos a sobrecarga de p-Cresol exógeno, foi evidenciada aumento do estresse oxidativo, neuroinflamação, alteração de níveis de neurotrofinas e neurotransmissores, sendo evidenciado nestes animais alterações comportamentais e cognitivas (SUN *et al.*, 2020).

A razão aumentada de p-Cresol no fluido cérebro espinhal/ concentração plasmática é observada em pacientes com Doença de Parkinson (BARTLOMIEJ *et al.*, 2020). Esses achados sugerem que a associação de DRC e doenças do SNC podem estar relacionadas a acúmulo e até mesmo deposição no SNC de p-Cresol (SUN *et al.*, 2020).

Em pacientes com DRC avançada, a terapia dialítica tem sido associada a déficit cognitivo. Hemodiálise, em contraste com diálise peritoneal resulta em rápidas variações de fluidos que levam a mudanças bruscas na pressão arterial. Hipotensão intradialítica tem sido

associada a atrofia cerebral (DREW *et al.*, 2019).

Alterações no sono na DRC são muito comuns e distúrbios do sono estão ligados fortemente a déficit cognitivo leve e demência, porém não está claro se induzem ainda maior disfunção cerebral, já que a restauração farmacológica do sono, não induz melhora cognitiva (VIGGIANO *et al.*, 2020).

A Apneia Obstrutiva do Sono ocorre frequentemente em pacientes com DRC e é caracterizada por uma cessação da respiração repetidas vezes enquanto o paciente está dormindo. A prevalência desta patologia na população geral é de 2-4% comparado com pacientes com DRC avançada que chega a 70-80% dos pacientes, baseados em diagnósticos firmados através de exame de polissonografia. Apneia obstrutiva em pacientes com DRC avançada pode causar distúrbios do sono e distúrbios cognitivos, diminuindo a funcionalidade do paciente durante o período diurno (LIN; LURIE; LYONS, 2020).

A depressão, incluindo depressão subclínica, contribui para distúrbio cognitivo. Um estudo em pacientes em hemodiálise mostrou que depressão foi associada a déficit cognitivo neste grupo de pacientes (AGGANIS *et al.*, 2010).

Apesar de dados limitados em pacientes com DRC, a polifarmácia também contribui para o déficit cognitivo. Uso de inúmeras medicações, combinado ao risco de interações medicamentosas e *clearance* renal reduzido, gera alto risco para sedação, delirium e distúrbio cognitivo (DREW *et al.*, 2019).

Distúrbios do metabolismo do cálcio e fósforo na DRC são associados a inúmeros achados neuropatológicos, incluindo aterosclerose, microaneurismas e calcinose microvascular, estando o hipocampo acometido por estas alterações. Autópsias de pacientes com DRC demonstraram calcinose microvascular e microaneurismas na região C4 do hipocampo. Essas alterações neuroanatômicas se correlacionam com uma performance cognitiva deficiente (VINTERS *et al.*, 2021).

Dados de estudos de coortes transversais e longitudinais sugerem uma associação de distúrbios cognitivos e deficiência de vitamina D. Metanálise de cinco estudos de coortes transversais e dois estudos longitudinais com um total de 7.688 participantes mostrou um risco aumentado de déficit cognitivo em pacientes com níveis séricos baixos de vitamina D comparado com pacientes com níveis dentro do valor da normalidade (OR 2,39, IC 95% 1,91-3,00;  $p < 0,0001$ ) (ETGEN *et al.*, 2012). A doença renal crônica é uma patologia caracterizada por um déficit de vitamina D, principalmente em sua forma ativada, o calcitriol (1,25 vitamina D). Estudos recentes mostram que a 1,25 dihidroxivitamina D age aumentando a expressão de Klotho RNAm (FORSTER *et al.*, 2011).

### 1.3.2 Klotho e déficit cognitivo

Níveis séricos de Klotho estão reduzidos na DRC, e estudos levam a crer que a proteína Klotho, produzida pelo rim, seja necessária para neuroproteção. Os rins são a maior fonte da proteína Klotho no sangue e níveis aumentados de Klotho séricos estão associados a risco reduzido de declínio cognitivo. A disfunção renal reduz níveis de Klotho séricos e de Klotho no cérebro de animais, e esta diminuição está relacionada a déficit cognitivo (DEGASPARI *et al.*, 2015).

Níveis de proteína Klotho no SNC tem uma função importante para manutenção da saúde cerebral durante a vida, e a perda de Klotho com o avançar da idade contribui para neurodegeneração e déficit cognitivo (LOPES-CARARO *et al.*, 2017).

Atualmente existem abundantes evidências que a proteína Klotho solúvel é neuroprotetora. Isto inclui resistência a estresse oxidativo e proteção a citotoxicidade induzida por Doença de Alzheimer (CHENG *et al.*, 2015; ZELDICH *et al.*, 2014). Experimentos mostraram a participação de Klotho na resistência a estresse oxidativo em neurônios corticais e células granulosas cerebelares. A estimulação da expressão de Klotho por desmetilação de DNA diminuiu a morte celular por apoptose induzida por tratamento com peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (XIN *et al.*, 2015). O controle da mielinização neuronal parece ser um efeito fisiológico da proteína Klotho cerebral demonstrado através da evidente remielinização em ratos com expressão aumentada de Klotho cerebral (ZELDICH *et al.*, 2015).

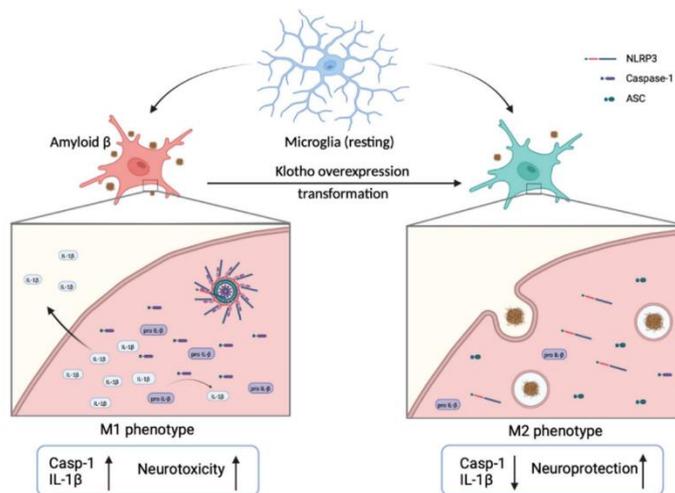
Ratos deficientes em Klotho demonstraram aumento de mediadores de estresse oxidativo no hipocampo na quinta semana de vida, seguido por um importante déficit cognitivo ao longo da sétima semana de vida (PAVLATOU *et al.*, 2016). Klotho cerebral funciona com um fator solúvel que altera o funcionamento do neurônio, através da modulação e transdução de sinais e cascatas intracelulares. Apesar desta importância para o funcionamento cerebral, ainda não foi identificado o receptor de membrana através do qual  $\alpha$ -Klotho exerce sua atividade (LOPES-CARARO *et al.*, 2017).

Evidências têm demonstrado que a expressão de Klotho está reduzida no cérebro devido ao envelhecimento, do mesmo modo como em cérebros de pacientes em estágios iniciais de doença de Alzheimer (LOPES-CARARO *et al.*, 2017). Em pacientes com Doença de Alzheimer, níveis baixos de Klotho foram confirmados no fluido cérebro espinhal (SEMBA *et al.*, 2014). Um estudo prospectivo evidenciou que indivíduos com maiores níveis de Klotho plasmático têm maiores escores medidos no Teste do Mini Mental e menor declínio de pontuação em exames subsequentes (SHARDELL *et al.*, 2016).

Expressão de Klotho promove autofagia (LIM *et al.*, 2019). Autofagia é uma via essencial para manutenção da homeostase celular em eucariotas. Ajuda na degradação e remoção de uma variedade de substâncias nas células, desde proteínas relacionadas ao envelhecimento, organelas danificadas até mesmo bactérias. Autofagia é particularmente importante nos neurônios, porque ao sofrerem de senescência tendem a acumular toxinas e organelas danificadas que devem ser removidas por autofagia. Defeitos na autofagia contribuem para processos patogênicos em diferentes patologias, incluindo doenças neurodegenerativas (FUNG *et al.*, 2022).

Expressão aumentada de Klotho promove diferenciação da micróglia no cérebro. Klotho ativa a diferenciação de micróglia M1, que tem um efeito pró-inflamatório, para micróglia M2, induzindo ativação de propriedades protetoras da micróglia, como o *clearance* de amiloide  $\beta$  ( $A\beta$ ) através de micropinocitose e fagocitose (FUNG *et al.*, 2022).

**Figura 4 - Efeito da expressão de Klotho na diferenciação da Micróglia de M1 para M2.**



Fonte: Klotho an Autophagy Stimulator as a Potential Therapeutic Target for Alzheimer's Disease: A Review (Fung *et al.*, 2022).

Doença renal crônica leva a diminuição dos níveis séricos de vitamina D, ambas as situações, disfunção renal e diminuição dos níveis séricos de vitamina D são responsáveis por redução dos níveis séricos de Klotho (LOPES-CARARO *et al.*, 2017).

Klotho se expressa no plexo coróide cerebral. Camundongos com deficiência de Klotho apresentam lesões do SNC incluindo hipomielinização, perda sináptica, e alterações comportamentais como demência e déficit cognitivo. A deficiência de Klotho no cérebro altera a barreira hemato encefálica e promove distúrbios do SNC imunomediados (NEYRA *et*

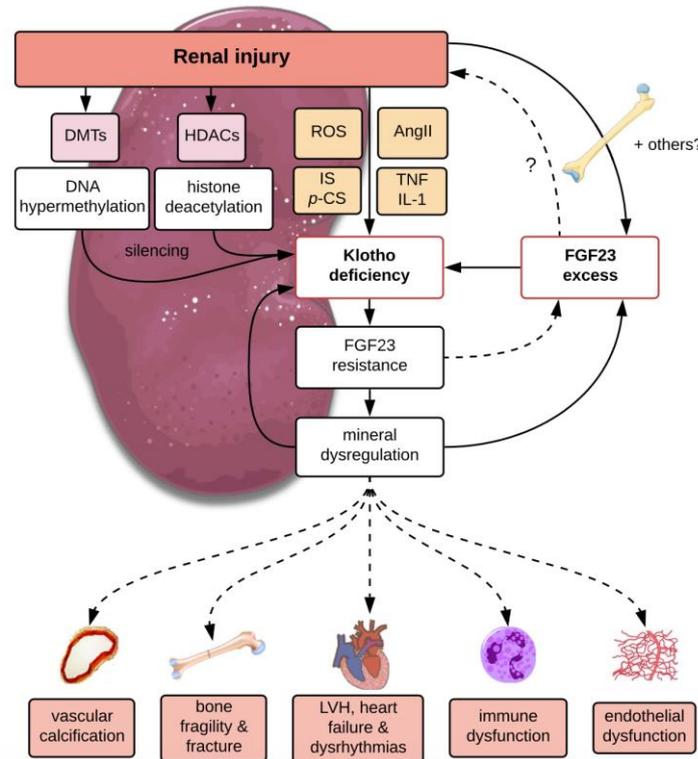
*al.*, 2020).

A relevância biológica da relação do fator fibroblástico 23 (FGF23) e Klotho no cérebro ainda é incerta, mas algumas evidências sugerem que o FGF23 age diretamente nos neurônios do hipocampo reduzindo a memória e a capacidade de aprendizado na DRC (SMITH *et al.*, 2019, MUÑOZ-CASTAÑEDA *et al.*, 2020). Klotho é um antagonista da atividade da via de sinalização da Wnt/ $\beta$ -catenina, e, portanto, reduz a atividade Wnt. Ativação da sinalização do Wnt, gerando transdução de diversos genes, causa exaustão e depleção de células tronco neurais (SATO *et al.*, 2012; MUÑOZ-CASTAÑEDA *et al.*, 2020).

A associação de Klotho com demência e distúrbios cognitivos pode ser explicada primeiramente por que ambos, aumento do FGF23 e deficiência de Klotho estão associados à doença vascular. O processo aterosclerótico é também associado à ativação da sinalização Wnt. Existe uma correlação positiva da severidade da lesão aterosclerótica e níveis séricos de Wnt5a (MUÑOZ-CASTAÑEDA *et al.*, 2020).

Modelos murinos com deficiência de Klotho exibem redução da disponibilidade de óxido nítrico, distúrbio na angiogênese, inflamação e disfunção endotelial acelerada. Klotho restaura a biodisponibilidade de óxido nítrico nas células endoteliais *in vitro* e reverte e reverte a vasoconstrição induzida por FGF23 em anéis aórticos de murino, suprime a expressão de VCAM-1 e ICAM-1 induzida por ativação de NF- $\kappa$ B (ROUMELIOTIS *et al.*, 2020).

**Figura 5 - Interação entre Klotho e FGF23 e o seu papel na doença renal.**



Fonte:  $\alpha$ Klotho-FGF23 interactions and their role in kidney disease: a molecular insight (SMITH; HOLT; HEWITSON, 2019). AngII, angiotensina II; DMTs, dimetiltransferases; FGF23, fator fibroblástico 23; HDACs, histona desacetilases; IL-1, interleucina-1 $\beta$ ; IS, indoxil sulfato LVH, hipertrofia ventricular esquerda; p-CS; sulfato de p-Cresol; ROS, espécies reativas de oxigênio; TNF, fator de necrose tumoral- $\alpha$ .

Klotho também tem um papel fundamental na regulação do tamanho do telômero e atividade da telomerase. Klotho e o telômero regulam o processo de envelhecimento de células tronco (MUÑOZ-CASTAÑEDA *et al.*, 2020).

Na DRC, acidose metabólica crônica é uma condição comum nos estágios mais avançados, em que a carga diária de ácidos excede a capacidade dos rins de excretar H<sup>+</sup> e regenerar HCO<sub>3</sub> consumido pelo metabolismo. Estudos pilotos recentes demonstraram que o tratamento da acidose metabólica com bicarbonato oral por quatro semanas, em pacientes com DRC, aumentou a excreção de Klotho urinário, demonstrando efeito benéfico desta reposição. Estudos adicionais são necessários para estudar a função do Klotho no cérebro e sua sensibilidade às alterações no metabolismo ácido-base (HAGE *et al.*, 2019).

O metabolismo cerebral e o líquido cefalorraquidiano são sensíveis ao pH e alterações no pH podem contribuir para déficit cognitivo na DRC. O metabolismo cerebral é controlado por múltiplos fatores incluindo o fluxo sanguíneo cerebral e mecanismos dependentes do pH. O status ácido-base também impacta diretamente na atividade sináptica. Acidose tende a

reduzir, enquanto a alcalose tende a aumentar a excitabilidade neuronal (IMENEZ *et al.*, 2021).

A acidose metabólica crônica resulta em perda renal de magnésio e hipomagnesemia é comumente um achado da acidose. A hipomagnesemia consequente da acidose, pode contribuir para o déficit cognitivo. Magnésio regula a transmissão neuronal, síntese proteica, e o metabolismo energético e a deficiência de magnésio afeta principalmente o sistema nervoso e cardiovascular. Magnésio está também implicado na memória e neuroplasticidade, atuando como modulador dos receptores do N-metil-D-aspartato envolvidos no potencial de longa duração (TSUJI *et al.*, 2021).

Em um modelo animal, uma dieta com baixos níveis de magnésio resultou em neuroinflamação, afetando o hipocampo e córtex, e prejudicando a formação da memória (RODELO-HAAD *et al.*, 2020). E ainda, níveis baixos de magnésio aceleram a perda da expressão renal de Klotho (SAKAGUCHI *et al.*, 2019).

#### **1.4 Proteína Klotho: função, eliminação e ação sistêmica**

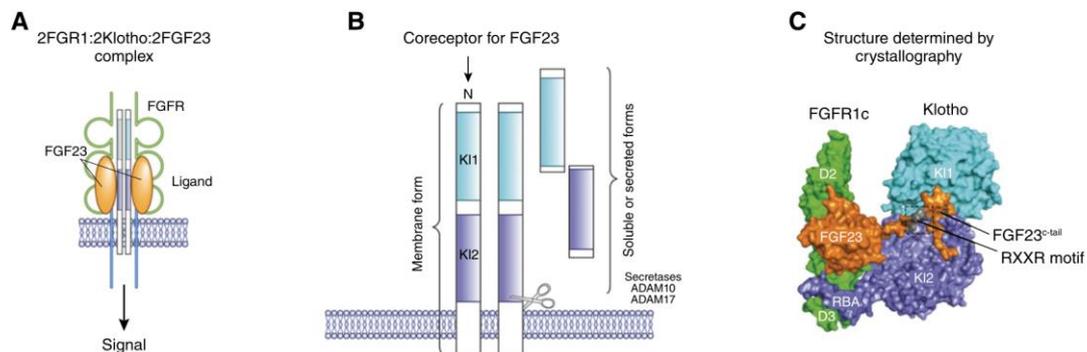
Em 1997, Kuro-o *et al.* identificaram um novo gene que se relacionava com um fenótipo antienvhecimento, ao qual deram o nome de gene Klotho em homenagem a deusa grega do destino (KURO-O *et al.*, 1997). Estudos subsequentes realizados sobre este gene, sugerem que o Klotho pode estar envolvido na regulação do processo de envelhecimento humano e do surgimento das doenças relacionadas ao envelhecimento. O gene Klotho pode ser encontrado em múltiplos órgãos incluindo os rins, cérebro, paratireoide e a glândula hipófise, sendo expresso principalmente no rim, paratireoide e plexo coroide (HU *et al.*, 2011; IMURA *et al.*, 2004). Dentre estes órgãos, os rins foram aqueles que apresentaram os mais elevados níveis de expressão do gene Klotho, principalmente nos túbulos contorcidos distais (KIM *et al.*, 2013). Tal gene é responsável por codificar duas proteínas Klotho, sendo a primeira, uma proteína transmembrana de passagem única, expressa na superfície celular, nomeada de mKlotho, e a segunda, um pequeno domínio extracelular da mKlotho que é clivada pela ação de proteases e liberada no sangue, nomeada de sKlotho ou porção solúvel ou secretável de Klotho (HU *et al.*, 2011; IMURA *et al.*, 2004).

Estas duas proteínas são caracterizadas por possuírem funções biológicas distintas. A mKlotho forma um complexo com os receptores do fator de crescimento de fibroblastos (FGFR) e funciona como um correceptor do fator de crescimento de fibroblastos 23 (FGF23) possuindo ação importante para a manutenção da homeostase mineral óssea no organismo. A

forma sKlotho pode ser encontrada livre na circulação, podendo ser dosada através de ensaios do tipo ELISA. Esta proteína é creditada como a principal proteína Klotho, agindo como hormônio circulante, protegendo as células contra estresse oxidativo, hipóxia, inflamação, inibindo a apoptose celular e a fibrose de tecidos (HU *et al.*, 2011; IMURA *et al.*, 2004).

A proteína Klotho existe de cinco formas diferentes, uma proteína transmembrana, três formas clivadas, e uma proteína secretada, estas duas últimas formas são proteínas solúveis, e a primeira transmembrana, ligada a membrana plasmática, conforme esquematizado na Figura 6.

**Figura 6 - Complexo estrutural da proteína Klotho e do FGF23.**



Fonte: *Klotho in clinical Nephrology: Diagnostic and Therapeutics Implications* (NEYRA, *et al.*, 2020).

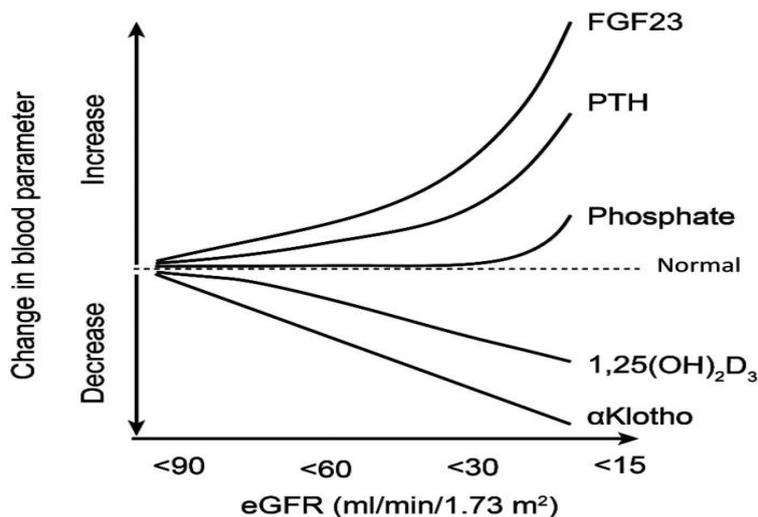
O rim é o órgão principal na manutenção da homeostase da Klotho, contribuindo para níveis circulantes de Klotho. A eliminação de Klotho é parcialmente mediada pelos rins, além de ser encontrada no lúmen tubular renal onde exerce sua ação fisiológica. Portanto, os rins assumem várias funções na homeostase da Klotho: contribuem para os níveis de Klotho sistêmicos endócrinos, eliminação de Klotho e secreção de Klotho no lúmen tubular (HU *et al.*, 2016).

Klotho solúvel é filtrado pelos glomérulos e secretado ao longo dos túbulos renais, da membrana basolateral para membrana luminal, sendo excretado pela urina. A expressão Klotho é diminuída durante a injúria renal aguda (IRA) e crônica (NEYRA *et al.*, 2020).

Através deste mecanismo regulatório dos níveis séricos de cálcio, fósforo e vitamina D e PTH, a proteína Klotho transmembrana é essencial para a saúde do corpo e especialmente do cérebro. A saúde cerebral parece estar sujeita a controle via a proteína transmembrana e

através das formas solúveis produzidas principalmente pelos rins (LOPES-CARARO *et al.*, 2017). Na Figura 7 podemos observar a variação dos níveis séricos de Klotho no paciente com DRC e relação com outros parâmetros do metabolismo mineral.

**Gráfico 3 - Variação dos níveis séricos de Klotho de acordo com a taxa de filtração glomerular e relação com parâmetros do metabolismo mineral.**



Fonte: *Klotho in clinical Nephrology: Diagnostic and Therapeutics Implications* (NEYRA, *et al.*, 2020).

A deficiência de Klotho em ratos mostrou ter profundos efeitos sistêmicos, produzindo um fenótipo semelhante ao envelhecimento humano. Este fenótipo consiste além de outros traços, meia vida curta, calcificação vascular e aterosclerose, osteoporose, enfisema pulmonar, déficits cognitivos, surdez, atrofia de pele, músculos, gônadas e de muitos outros órgãos (KURO-O *et al.*, 1997; MENCKE *et al.*, 2016). Tem sido demonstrado que aumentar os níveis de Klotho em ratos, aumenta a sobrevivência em 120-130% (KUROSU *et al.*, 2005), melhora a função cognitiva (DUBAL *et al.*, 2014; 2015), resistência contra doença renal (DOI *et al.*, 2011; GHAN *et al.*, 2014; HARUNA *et al.*, 2007; ZHOU *et al.*, 2013), doença cardíaca (HU *et al.*, 2015; XIE *et al.*, 2012), doença pulmonar (RAVIKUMAR *et al.*, 2014; 2016), calcificação vascular (MENCKE *et al.*, 2016), diabetes (LIN & SUN, 2015a,b), estresse oxidativo (HSIEH *et al.*, 2010) e age com supressor tumoral *in vivo* (ABRAMOVITZ *et al.*, 2011; DOI *et al.*, 2011).

Níveis totais de Klotho no sangue e fluido cerebrospinal de humanos e ratos diminuem com a idade e a expressão desta proteína está reduzida na substância branca de

ratos e macacos. Algumas evidências sugerem que a perda do Klotho é um fator central no envelhecimento de mamíferos (LOPES *et al.*, 2017; SEMBRA *et al.*, 2014; YAMAZAKI *et al.*, 2010). KUROSU *et al.* (2005) evidenciaram que ratos que têm expressão excessiva de Klotho, têm 30% a mais de sobrevivência que o grupo controle (KUROSU *et al.*, 2005; LOPES-CARARO *et al.*, 2017).

Klotho tem atraído muita atenção na biologia vascular (MENCKE *et al.*, 2016). O fenótipo vascular da deficiência de Klotho é muito similar ao envelhecimento humano e o envelhecimento acelerado da doença renal crônica (KURO-O *et al.*, 1997). Em humanos, deficiência genética de Klotho (a mutação do gene H193R) também leva a severa calcificação vascular (MENCKE *et al.*, 2016). Portanto, Klotho pode estar relacionado à patogênese das complicações cardiovasculares da doença renal crônica, que são as causas mais comuns de morte nestes pacientes (GO *et al.*, 2004; MENCKE *et al.*, 2016).

Hipertensão arterial sistêmica é uma complicação da DRC que contribui para a progressão da DRC e da doença cardiovascular. Camundongos com deficiência de Klotho desenvolvem HAS sensível a sódio após uma sobrecarga de sódio (ZHOU *et al.*, 2015) e aumento da rigidez arterial (GAO *et al.*, 2016). Um polimorfismo genético de um único nucleotídeo (KL rs9536314) está associado a hipertensão sensível a sódio em adultos com HAS recentemente diagnosticada (CITTERIO *et al.*, 2020).

## 1.5 Klotho e doença renal

A doença renal crônica é um estado de deficiência de Klotho adquirida (BARKER *et al.*, 2015; HU *et al.*, 2011; KOH *et al.*, 2001). Foi demonstrado que a expressão RNA mensageiro do gene Klotho no rim de pacientes com doença renal crônica é significativamente menor que em controles (KOH *et al.*, 2001). Recentemente, estudos demonstraram que níveis séricos de Klotho foram significativamente menores em pacientes com DRC que em controles, e foi evidenciado que estes níveis eram progressivamente menores com o agravamento da DRC (PAVIK *et al.*, 2013; KIM *et al.*, 2013). Pesquisas recentes comprovaram que os níveis séricos de Klotho estão significativamente reduzidos em pacientes com DRC estágios 2-5 em comparação com DRC estágio 1 e correlacionaram-se com a TGF estimada, creatinina sérica e níveis de FGF23 (KIM *et al.*, 2013; SHIMAMURA *et al.*, 2012).

Diminuição da expressão de Klotho na DRC não é apenas pela perda de tecido renal, mas também pode ser atribuído a hiperfosfatemia e hipermetilação ou desacetilação do gene promotor do Klotho por citocinas inflamatórias e toxinas urêmicas, como a indol sulfato

(NEYRA *et al.*, 2020).

Klotho solúvel age como um hormônio que exerce ação antiestresse oxidativo, antienvhecimento, e anti-apoptótica. Sua deficiência causa inflamação, disfunção endotelial e calcificação vascular (KUROSU *et al.*, 2005; KURO-O *et al.*, 1997). Tem sido reportado efeito protetor do Klotho contra lesão renal aguda em estudos experimentais, mostrando redução de apoptose na IRA (SUGIURA *et al.*, 2005) e melhora da função renal em glomerulonefrite mediada por imunocomplexos (HANURA *et al.*, 2007). Além disso, níveis de Klotho séricos e urinários têm níveis reduzidos em pacientes com IRA (HU *et al.*, 2010). Diante destes achados pode-se propor que o fator Klotho possa ser útil como biomarcador de lesão renal, tanto na IRA, como na DRC.

A IRA é uma síndrome com uma miríade de citocinas inflamatórias como por exemplo o TNF- $\alpha$  que promove redução da expressão de Klotho no rim através da ativação do NF- $\kappa$ B em camundongos submetidos a IRA (MORENO *et al.*, 2011). Em outras condições inflamatórias como doença inflamatória intestinal, TNF- $\alpha$  e IFN reduziram a expressão de Klotho no rim de camundongos (THURSTON *et al.*, 2010). A redução do Klotho no rim é parcialmente mediada pelo aumento da produção de óxido nítrico, estresse oxidativo (MITOBE *et al.*, 2005), porém os mecanismos precisos como a inflamação diminui a regulação do Klotho na IRA não é conhecido (THURSTON *et al.*, 2010; MITOBE *et al.*, 2005).

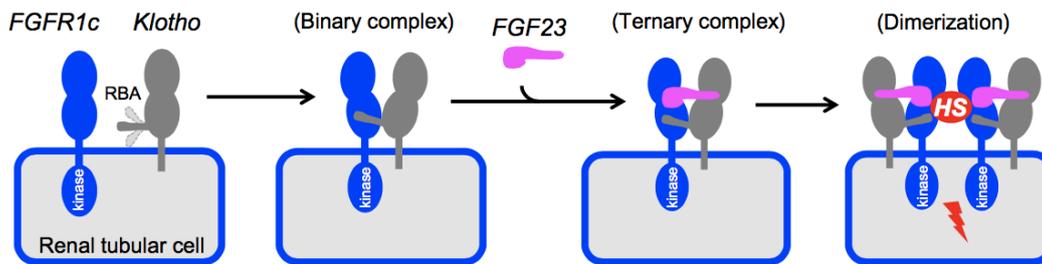
Dados experimentais recentes afirmam que a redução do Klotho não é somente um biomarcador de dano renal, mas tem efeito patogênico *per se*. Camundongos com deficiência de Klotho, diminuição da expressão renal de Klotho e níveis séricos de Klotho solúvel reduzidos, tem dano renal mais severo e maior fibrose além de risco aumentado de transição da IRA para DRC comparado com camundongos controles submetidos a insultos renais distintos, indicando que a deficiência de Klotho torna o rim mais suscetível a insultos agudos (HU *et al.*, 2010; SHI *et al.*, 2011; PANESSO *et al.*, 2014; JORGE *et al.*, 2019).

Quando a proteína Klotho recombinante é injetada após injúria isquêmica, camundongos tiveram dano renal semelhante, porém recuperação foi muito mais rápida que no grupo controle (SHI *et al.*, 2016). Administração intravenosa de vesículas extracelulares contendo Klotho em camundongos recuperaram os níveis renais de Klotho em rins acometidos por injúria renal induzida por glicerol e promoveram recuperação da função renal após injeção de glicerol (GRANGE *et al.*, 2014).

A proteína Klotho funciona como um correceptor para o FGF23. A proteína Klotho forma complexos binários com formas específicas dos receptores de FGF23 (FGFR),

(FGFR1c, FGFR3c e FGFR4), causando uma ligação de maior afinidade, de até 20 vezes maior, que a ligação do FGF23 aos seus receptores (FGFRs) ou Klotho isoladamente, portanto o complexo Klotho-FGFR é necessário para a ação fisiológica do FGF23 (KUROSU *et al.*, 2006; SMITH *et al.*, 2019).

**Figura 7 - Complexo de ligação Klotho-FGF23.**



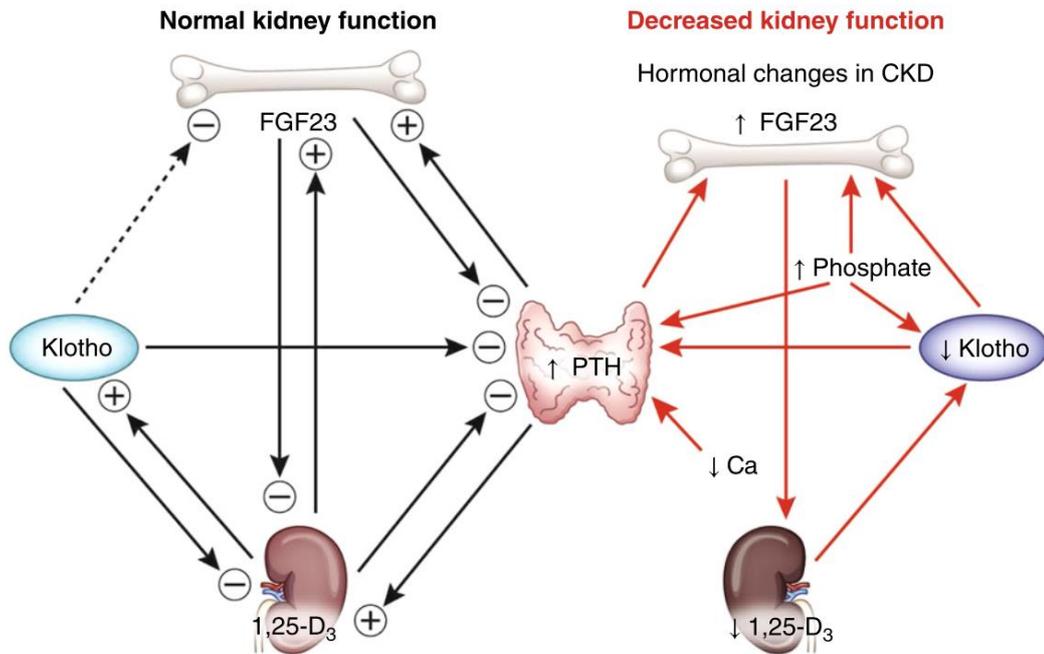
Fonte: *Aging and FGF23-klotho system* (KURO-O *et al.*, 2021).

Em resposta a ingestão de fósforo, FGF23 é secretado pelo osso, circula na corrente sanguínea, e se liga ao complexo Klotho-FGFR expressado nas células tubulares renais, para promover excreção de fosfato. O sistema endócrino FGF23-Klotho é indispensável para a manutenção da homeostase do fósforo. Mutações no FGF23 ou Klotho causam fenótipos incluindo calcificação ectópica e hiperfosfatemia (KURO-O *et al.*, 2019).

Klotho solúvel promove a internalização do cotransportador NaPi2a nos túbulos proximais, reduzindo a reabsorção urinária e contribuindo para excreção de fosfato. Klotho parece ser supressor da vitamina D e da produção do FGF23, porque ratos com deficiência de Klotho exibem o gene CYP27B1 e produção de FGF23 (NEYRA *et al.*, 2020).

Hiperparatireoidismo secundário é associado com morbidade e mortalidade cardiovascular na DRC. Na DRC, a glândula paratireoide não responde aos sinais inibitórios FGF23 possivelmente pelos níveis baixos de Klotho e FGFR1 na glândula paratireoide (GALITZER *et al.*, 2010; KURO-O *et al.*, 2019). Na Figura 8, podemos ver o eixo endócrino PTH, Klotho e FGF23, onde se observa a interação entre hormônios.

**Figura 8 - Alterações do eixo de controle do PTH, Klotho e FGF23 na DRC.**



Fonte: *Klotho in clinical Nephrology: Diagnostic and Therapeutics Implications* (NEYRA *et al.*, 2020).

A correção do Klotho para tratamento da homeostase mineral não somente traz benefícios para o metabolismo mineral como também atenua a doença cardiovascular e melhora a qualidade de vida em pacientes com DRC (NEYRA *et al.*, 2017).

Evidências recentes mostram que a deficiência da proteína Klotho está associada a déficit cognitivo. Klotho tem um efeito neuroprotetor contra estresse oxidativo, autofagia, regulação do telômero, proteção contra danos vasculares, entre outros. Dessa forma, pesquisa neste campo de conhecimento é de extrema importância. Este presente estudo se propõe a avaliar e elucidar a correlação biológica entre a proteína Klotho, marcadores de lesão endotelial e distúrbios cognitivos em pacientes com DRC.

## 2 JUSTIFICATIVA

O déficit cognitivo, desde uma disfunção cognitiva leve até quadro demencial mais grave, é uma complicação comum em pacientes com DRC, muitas vezes negligenciada na prática clínica. Existem mais evidências desta patologia em pacientes com doença renal crônica submetidos a terapia dialítica. Por este motivo, se torna imprescindível um olhar cuidadoso desta patologia mesmo nos estágios precoces da DRC, para entender melhor os mecanismos fisiopatológicos, e possíveis marcadores biológicos que possam prever o risco de desenvolvimento desta complicação e o seu diagnóstico precoce.

Nos últimos anos, intensificou-se o interesse pela proteína Klotho, tendo sido amplamente estudada por suas diversas ações anti-inflamatórias, proteção contra estresse oxidativo e calcificação vascular, sendo conhecida como proteína antienvelhecimento. Estudos experimentais, demonstram que níveis séricos reduzidos de Klotho na DRC estão diretamente associados a déficit cognitivo, porém dados mais robustos em relação a esta associação são necessários. Recentemente, estudos demonstraram que biomarcadores de lesão endotelial estão aumentando em pacientes com déficit cognitivo na DRC e a correlação da lesão endotelial e proteína Klotho ainda precisam ser estudados.

Além disso, o quão precoce a redução dos níveis de Klotho podem prever o risco de desenvolvimento do déficit cognitivo na DRC não é conhecido. Percebe-se que a proteína Klotho tem um efeito importantíssimo como um agente antienvelhecimento do SNC. Portanto, pesquisas neste mérito parecem ser vitais para avaliar o papel da proteína Klotho como um possível biomarcador e alvo terapêutico para o déficit cognitivo em pacientes portadores de DRC.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

Investigar a correlação da proteína Klotho com déficit cognitivo em pacientes portadores de DRC.

#### **3.2 Específicos**

- Comparar a função neurocognitiva de pacientes portadores de DRC nos diferentes estágios de DRC.
- Analisar a correlação entre níveis séricos Klotho e marcadores de dano endotelial: VCAM-1, Angiopietina 1, Angiopietina 2 e albuminúria na DRC.
- Avaliar se os níveis séricos de Klotho e FGF23 estão associados a disfunção neurocognitiva.
- Investigar se há correlação entre os níveis séricos de biomarcadores de lesão endotelial (VCAM-1, Angiopietina 1, Angiopietina 2) e função neurocognitiva em pacientes com DRC.
- Demonstrar a relação de Klotho como um biomarcador de déficit cognitivo em pacientes com DRC não dialítica.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Delineamento, local e período do estudo

Trata-se de um estudo metodológico do tipo observacional, transversal e não intervencionista, utilizando métodos quantitativos. A pré-seleção da amostra de pacientes com DRC ocorreu de setembro de 2020 a dezembro de 2021 e este período contemplou o cadastramento de pacientes com DRC acompanhados no ambulatório de Nefrologia do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), Universidade Federal do Ceará (UFC).

Os pacientes pré-selecionados foram convidados para comparecerem as visitas do estudo, que ocorreu durante o período de janeiro de 2022 a outubro de 2022. Esta etapa aconteceu através de uma única visita multiprofissional presencial para cada paciente da pesquisa, realizada pelo médico, enfermeiro e neuropsicóloga, sendo esta etapa realizada no Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) pertencente ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará (UFC).

### 4.2 População do estudo

A população do estudo foi composta por pacientes adultos com diagnóstico confirmado de DRC, com idade entre 18 e 80 anos, de ambos os sexos.

#### 4.2.1 Critérios de inclusão (Grupo de pacientes com DRC)

- Pacientes de ambos os sexos, com idade entre 18 e 80 anos.
- Pacientes portadores de uma TFG estimada  $< 60 \text{ mL/min/1,73m}^2$
- Pacientes portadores de uma TFG estimada  $> 60 \text{ mL/min/1,73m}^2$ , associados a presença de albuminúria definida por RACU  $> 30\text{mg/g}$ .
- Assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

#### 4.2.2 Critérios de Exclusão

- Pacientes com diagnóstico de DRC em hemodiálise ou diálise peritoneal, ou que já realizaram diálise pelo menos 3 meses antes do início do estudo.
- Pacientes transplantados renais ou que já realizaram o transplante renal no passado.

- Pacientes com diagnóstico prévio de demência ou déficit cognitivo (Ex.: Doença de Alzheimer, Demência por múltiplos infartos, demência frontotemporal, entre outras).
- Paciente portador de alguma doença neurológica prévia que interfere na função cognitiva (Acidente Vascular Cerebral, Doença de Parkinson, entre outras)
- Paciente acometido por doença psiquiátrica (Depressão maior, Transtorno de Ansiedade Generalizada, Esquizofrenia, entre outros)
- Paciente portador de deficiência visual ou auditiva que impeça o mesmo ser avaliado através de avaliação neuropsicológica.
- Uso de alguma medicação neuroléptica que afete a função cognitiva e atenção.

#### *4.2.3 Grupo controle*

- Pessoas sadias de ambos os sexos, feminino ou masculino, com idade entre 18 e 80 anos.
- Pacientes portadores de uma TFG estimada  $> 60 \text{ mL/min/1,73m}^2$  e albuminúria normal, definida por RACU  $< 30\text{mg/g}$ .
- Assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

### **4.3 Desenho do estudo**

No ambulatório de Nefrologia do Hospital Universitário Walter Cantídio, pacientes foram cadastrados e neste momento foi realizado, durante a visita ao médico nefrologista assistente, uma pré-seleção dos pacientes.

No início da visita, antes de qualquer procedimento do estudo, foi informado ao paciente detalhes sobre o conteúdo estudo, esclarecido suas dúvidas, riscos e benefícios da pesquisa. O paciente após concordar em participar da pesquisa, ler e assinar o TCLE, seguia durante a visita, pela equipe multiprofissional, em 03 etapas.

#### *4.3.1 Avaliação Laboratorial*

A primeira etapa da visita consistia em coleta de amostras urina e sangue, no período da manhã, colhida em jejum de 12 horas, realizada por uma enfermeira habilitada para tal procedimento. As amostras de urina e sangue foram centrifugadas e então enviadas para o Laboratório de Nefrologia e Doenças Tropicais da Universidade Federal do Ceará, aonde foram aliquotadas e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posteriormente serem analisadas.

A avaliação laboratorial incluiu os seguintes exames laboratoriais: Ureia (Ur), Creatinina (Cr), Cálcio ( $\text{Ca}^{++}$ ), Fósforo (P), Klotho plasmático (KL), FGF23 plasmático (FGF23), Angiopietina 1 e Angiopietina 2 plasmáticos, VCAM-1 e Relação Albumina/Creatinina Urinária (RACU). A Taxa de Filtração Glomerular (TFG) foi estimada através da Creatinina Plasmática (Cr) aplicando a fórmula do CKD-EPI (*Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*). Os resultados das concentrações dos biomarcadores urinários (albuminúria) serão expressos pela relação albumina/creatinina urinária (mg/g), colhidos em amostra única.

Os biomarcadores (Angiopietina 1, Angiopietina 2, VCAM-1 e Klotho) foram quantificados por meio da técnica do imunoensaio ligado à enzima (ELISA) sanduíche, utilizando kit comercial fornecido pelos fabricantes. VCAM-1 foi medido utilizando o kit ELISA (Abcam, Cambridge, UK), utilizando-se o coeficiente intra ensaio de 5,9%. Angiopietina 2 foi medida utilizando o kit ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), utilizando-se o coeficiente intra ensaio de 5,3%. Klotho foi medida utilizando o kit ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), utilizando-se o coeficiente intra ensaio de 6,0%.

A técnica do ELISA sanduíche se baseia na quantificação do antígeno (o biomarcador) através de sua ligação com anticorpos específicos adsorvidos em placa de 96 poços (placa sensibilizada e fornecida no kit pelo fabricante). Foram seguidos os procedimentos de acordo com as normas do fabricante. Para a leitura colorimétrica foi utilizado espectrofotômetro com comprimento de onda de 450 nm.

#### 4.3.2 Entrevista Médica

A segunda etapa da visita consistia em uma coleta de dados clínicos referente a história médica do paciente através de uma entrevista, realizada pelo pesquisador e respondida pelo paciente. No apêndice B está anexado modelo do questionário utilizado na entrevista médica. Os dados a seguir foram coletados durante a entrevista.

- a) Dados sociodemográficos: idade, sexo, cor, profissão, escolaridade, naturalidade, procedência.
- b) Medicações em uso: medicações anti-hipertensivas em uso, incluindo uso de iECA/BRA, e uso de neurolépticos, ou antidepressivos.
- c) Exame físico: peso, estatura, índice de massa corporal (IMC).
- d) Etiologia da DRC: nefropatia diabética, nefrosclerose hipertensiva, glomerulopatia, litíase renal, doença policística renal, entre outras.

- e) Antecedentes patológicos: diabetes, HAS, doença cardiovascular, insuficiência cardíaca, acidente vascular cerebral, dislipidemia.
- f) Hábitos: tabagismo, etilismo, uso de drogas ilícitas.
- g) Horas de sono: tempo de horas de sono por dia.
- h) História familiar de demência.

#### 4.3.3 Avaliação neuropsicológica

Na terceira etapa da visita, após a coleta de exames laboratoriais, os pacientes eram alimentados e posteriormente realizada a entrevista neuropsicológica. Essa avaliação foi realizada por uma psicóloga com especialização em neuropsicologia e consistiu na aplicação de testes neuropsicológicos validados internacionalmente, inclusive no Brasil. Foram aplicados individualmente para cada paciente, oito testes padronizados, em uma visita com duração de aproximadamente 60 minutos.

Estes testes permitem compreender as funções cognitivas por meio de uma avaliação específica, breve e abrangente dos construtos cognitivos de pacientes portadores de DRC e grupo controle. Os instrumentos utilizados para as avaliações neuropsicológicas foram os seguintes: 1) Teste de Aprendizagem Auditivo-Verbal de Rey (RAVLT), 2) *Five Digit Test* – Teste dos cinco dígitos - FDT, 3) Tarefa de Alcance de Dígitos Ordens Direta e Inversa, 4) Tarefa de Cubos de Corsi Ordens Direta e Inversa, 5) Teste de *Stroop* Versão Victoria (adaptado), 6) *Trial Making Test* (TMT) – Partes A e B, 7) Tarefa de Fluência Verbal Semântica Categoria Animais (FVS), 8) Tarefa de Fluência Verbal Fonêmica Letras (F-A-S). No Quadro 1 demonstra os principais domínios cognitivos avaliados por cada teste separadamente.

**Quadro 1. Testes neuropsicológicos e domínios cognitivos avaliados.**

<b><u>Testes Neuropsicológicos</u></b>	<b><u>Domínio Cognitivo</u></b>	<b><u>Subdomínio Cognitivo</u></b>
<b>RAVLT</b>	Memória	Memória Verbal Episódica
<b>FDT</b>	Atenção Função Executiva	Atenção automática Controle Inibitório Flexibilidade Cognitiva
<b>Dígitos Ordem Direta</b>	Atenção	Atenção
<b>Dígitos Ordem Indireta</b>	Memória Função Executiva	Memória Operacional Memória de Trabalho Auditiva
<b>Cubos de Corsi</b>	Memória	Memória Visuoespacial
<b>Teste de STROOP</b>	Atenção Função Executiva	Atenção Seletiva Controle Inibitório Flexibilidade Cognitiva Velocidade de processamento
<b>Teste de Trilhas</b>	Atenção Memória Função Executiva	Atenção Seletiva e Alternada Memória operacional Velocidade de Processamento Flexibilidade Cognitiva
<b>Fluência Verbal Semântica</b>	Linguagem Função Executiva	Fluência Verbal
<b>Fluência Verbal Fonêmica</b>	Linguagem Função Executiva	Fluência Verbal

Fonte: o próprio autor.

RAVLT- Teste de Aprendizagem Auditivo-Verbal de Rey; FDT-Teste dos 5 dígitos.

A avaliação neuropsicológica é uma avaliação de aplicabilidade regulamentar elucidada através de investigações que se fundamentam no desempenho das mais diversas predisposições cognitivas (HARVEY, 2012). Harvey (2012) e Fonseca *et al.* (2015) endossam a avaliação neuropsicológica como um processo amplo e complexo que avalia o desempenho funcional do indivíduo através das suas funções cognitivas. Com essas definições entende-se que a avaliação neuropsicológica é uma avaliação do funcionamento cognitivo geral para levantar possíveis sintomas.

A avaliação neuropsicológica deste estudo ocorreu de forma psicométrica através de testes neuropsicológicos, os quais são importantes por representarem, segundo Haase & Júlio-Costa (2017), instrumentos refinados e que são indispensáveis para o diagnóstico neuropsicológico. Seabra *et al.* (2012) corroboram desta significância dos testes neuropsicológicos quando afirmam que a avaliação neuropsicológica através desses instrumentos tem se expandido em todo o mundo, ampliando a criação de ferramentas resguardadas e respaldadas nos preceitos da psicometria. Abaixo, serão apresentados os oito

instrumentos da avaliação neuropsicológica utilizados neste estudo.

#### 4.3.3.1 *Teste de Aprendizagem Auditivo-Verbal de Rey – RAVLT*

O teste RAVLT é um instrumento de avaliação da memória sendo um dos testes mais utilizados para avaliar a aprendizagem, como também a memória verbal episódico-semântica (SALLES, 2018). O instrumento dispõe de uma lista (A) de 15 palavras, que são lidas para o indivíduo e apresentadas algumas vezes (A1 a A5). Ressalta-se que a cada apresentação dessa listagem é solicitado ao sujeito a evocação espontânea das palavras apresentadas (PAULA e MALLOY-DINIZ, 2018).

Posteriormente, apresenta-se uma segunda lista (B) que também contém 15 palavras, a qual o avaliando em seguida terá que evocar espontaneamente. Logo após essa segunda listagem é solicitado ao paciente que recorde livremente a primeira lista (A6). Decorridos 20 minutos, pede-se ao indivíduo que evoque as palavras da primeira lista (A7). Ademais, é executado um teste de reconhecimento das palavras da lista (A), no qual o participante identifica com “sim ou não” as palavras da primeira listagem que são apresentadas novamente. Porém, no reconhecimento contém outras 35 palavras distratoras (PAULA e MALLOY-DINIZ, 2018).

Nesta pesquisa foram utilizadas as seguintes medidas: 1) reconhecimento, 2) índices de aprendizagem (score total e aprendizagem ao longo das tentativas (ALT)), 3) índice de retenção (velocidade de esquecimento), 4) índices de interferência (interferência proativa e interferência retroativa).

#### 4.3.3.2. *Teste dos Cinco Dígitos -Five Digit Test- FDT*

O instrumento *Five Digit Test- FDT* foi desenvolvido pelo neuropsicólogo espanhol Manuel Sedó com o objetivo de ser utilizado em qualquer idioma para avaliar e obter as métricas da velocidade de processamento, da atenção e das funções executivas (controle inibitório e flexibilidade cognitiva). Também busca identificar características que ajudem no diagnóstico de pacientes que apresentem “transtornos neurológicos ou psiquiátricos” (DE PAULA; MALLOY-DINIZ, 2015; CAMPOS *et al.*, 2016).

O teste é composto por quatro partes: leitura, contagem, escolha e alternância. Destaca-se que as duas primeiras etapas são referentes aos conhecimentos mínimos de linguística e relacionadas a medidas cognitivas como a “atenção automática” (CAMPOS *et al.*, 2016) e a “velocidade de processamento” (CAMPOS *et al.*, 2016). Em relação às duas

partes posteriores, destinam-se a avaliação da “atenção controlada, atenção executiva” (CAMPOS *et al.*, 2016) na busca de verificar a diminuição do desempenho do paciente (DE PAULA; MALLOY-DINIZ, 2015).

A etapa da Leitura é mais compreensível e apresenta numerais de 1 a 5, equivalentes aos seus valores (ex.: “um 1, dois 2, três 3, etc.”). Nesse segmento do teste o sujeito apenas reconhecerá e lerá os dígitos apresentados (DE PAULA; MALLOY-DINIZ, 2015). A Contagem é representada por asteriscos que são agrupados nas quantidades de 1 a 5. O indivíduo tem que identificar o grupo de asterisco(s) e verbalizar qual número é equivalente a quantidade de cada conjunto. (DE PAULA; MALLOY-DINIZ, 2015).

Nos ciclos da Escolha e Alternância, o esforço do avaliando é aumentado, pois terá que realizar um trabalho controlado e consciente que exigirá um maior empenho ao desenvolver a atividade na qual despenderá um funcionamento mental de nível mais elevado. Na Escolha é apresentado conjuntos com números que não equivalem às quantidades compostas em cada grupo (ou seja, um 3, dois 4, três 2, e etc.). Em se tratando da alternância em cada grupo de cinco conjuntos dos dígitos um é destacado por linhas mais grossas. Nessa etapa o participante alternará entre contar os dígitos dos conjuntos das bordas mais finas, mas mudará a regra e terá que ler os dígitos dos conjuntos das bordas mais grossas. Ao mudar a regra, muda-se também o esforço cognitivo do indivíduo (DE PAULA; MALLOY-DINIZ, 2015, p. 10).

Após obter os resultados das etapas supracitadas, é indispensável duas medidas complementares: Inibição e Flexibilidade (DE PAULA; MALLOY-DINIZ, 2015, p. 22). As pontuações dessas medidas são obtidas através de um cálculo simples que é realizado com as pontuações diretas. O cálculo se dá “Inibição = Escolha – Leitura” e “Flexibilidade = Alternância – Leitura. Essas medidas terão apenas os resultados do tempo, pois não houve inclusão para os erros na padronização do teste dos cinco dígitos (DE PAULA; MALLOY-DINIZ, 2015, p. 23). Para esta pesquisa foram incluídas todas as medidas de avaliação que o instrumento FDT apresenta.

#### *4.3.3.3 Tarefa de Alcance de Dígitos Ordens Direta e Inversa*

A tarefa de alcance de dígitos faz parte do grupo dos subtestes da Bateria Wais-III: Escala de Inteligência Wechsler para Adultos. Essa atividade tem o objetivo de investigar a memória de curto prazo relacionada à memória operacional/trabalho auditiva, avaliando a capacidade do indivíduo de repetição e propensão de recordação imediata (WECHSLER,

1896).

A atividade consiste em duas ordens: Direta e Inversa, que são realizadas uma independente da outra. Nas duas etapas o avaliador lê para o examinando em tom de voz audível uma sequência de números que são disponibilizados em série. Na Ordem Direta, o avaliando terá que reproduzir na mesma ordem a sequência dos dígitos apresentada pelo examinador. Já na Ordem Inversa, o participante repetirá a sequência dos números em sentido contrário ao que o avaliador apresentou. Para cada sequência há duas tentativas e cada uma apresenta a mesma quantidade de numerais, contudo, com diferentes dígitos. A tarefa é interrompida caso o sujeito erre em ambas as tentativas de mesma quantidade de itens. Ressalta-se que as ordens: Direta e Inversa são realizadas separadamente (WECHSLER, 1896).

Para este estudo os resultados foram baseados nos escores brutos e seguiu como parâmetro para as análises o artigo de normatização para a população brasileira “Desempenhos nas Duas Tarefas do Subteste Dígitos do WISC-III e do WAIS-III” (FIGUEIREDO; NASCIMENTO, 2007).

#### *4.3.3.4 Tarefa de Cubos de Corsi Ordens Direta e Inversa*

A tarefa de Cubos de Corsi é extensamente utilizada na clínica e em estudos experimentais com “alcance internacional” (BERCH; KRIKORIAN; HUHA, 1998) com a finalidade de avaliar a memória de curto prazo no que tange a memória operacional/trabalho visuoespacial (ANTUNES; JÚLIO-COSTA; HAASE, 2017; DE PAULA *et al.*, 2010)). É um teste similar a Tarefa de Alcance de Dígitos, sendo que é uma atividade não-verbal importante, e amplamente executada em avaliações neuropsicológicas (BERCH; KRIKORIAN; HUHA, 1998). O instrumento é formado por uma “base quadrada” (DE PAULA *et al.*, 2010), na qual são distribuídos nove blocos semelhantes que são tocados primeiramente pelo avaliador, o qual segue uma sequência (DE PAULA *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2011) de dígitos visíveis apenas ao examinador.

A tarefa consiste em duas partes que são realizadas nas ordens: Direta e Inversa (ANTUNES; JÚLIO-COSTA; HAASE, 2017). Inicialmente, a atividade segue uma sequência de dois cubos, podendo as séries atingirem o limite de nove cubos (COSTA *et al.*, 2011). A primeira parte do teste acontece na Ordem Direta e após o examinador apresentar a sequência tocando nos blocos o avaliando tocará eles seguindo a mesma ordem. Na etapa referente à Ordem Inversa, o indivíduo realiza a tarefa no “sentido contrário” apresentado pelo avaliador

(KESSELS *et al.*, 2000).

Destaca-se que as etapas do instrumento são executadas em momentos distintos e a tarefa é interrompida quando o participante erra ambas as sequências com as mesmas quantidades de cubos a serem tocados.

Os resultados desta pesquisa foram analisados a partir dos pontos brutos e teve como referência o estudo de normatização para a população brasileira adulta “Normas do Cubos de Corsi para população adulta” (SANTANA *et al.*, 2021).

#### 4.3.3.5 Teste Stroop Victoria (Versão Adaptada)

O teste *Stroop* foi desenvolvido por John Ridley Stroop no ano de 1935 e com o passar dos anos foram surgindo outras versões (DUNCAN, 2006), uma delas é a Versão Victória que segundo Campanholo *et al.* (2014) é considerada “a mais útil”, e foi com essa versão que neste estudo foram realizadas as coletas dos dados tanto dos pacientes portadores de doença renal crônica, como dos controles. Utilizou-se o Teste *Stroop* Versão Victória com a finalidade de investigar as funções executivas referentes à atenção seletiva e controle inibitório.

O instrumento é composto por três diferentes cartões (1 – cor, 2 – palavras e 3 – interferência), os quais são apresentados separadamente ao indivíduo. No primeiro cartão (cor) o participante nomeia as cores que estão representadas em retângulos nas cores rosa, marrom, verde e azul (SILVA *et al.*, 2017; CAMPANHOLO, 2018).

Nos cartões 2 e 3 não há leitura das palavras, mas nomeação das cores que elas representam. O segundo cartão é representado por palavras neutras (cada, hoje, nunca e tudo). A tarefa é finalizada com o terceiro cartão, no qual há palavras impressas com os nomes das cores rosa, marrom, verde e azul, mas a escrita não corresponde à nomeação da cor (SILVA *et al.*, 2017; CAMPANHOLO, 2018).

O avaliando é orientado a nomear as cores de cada cartão o mais rápido que puder e o tempo é registrado em segundos. O registro do tempo de execução da tarefa é feito separadamente (SILVA *et al.*, 2017; CAMPANHOLO, 2018).

Nesta pesquisa os dados encontrados foram analisados pelo tempo em segundos levando em consideração a idade e anos de escolaridade dos partícipes. As análises foram guiadas pelas orientações do estudo de normatização para a população brasileira adulta *Performance of an adult Brazilian sample on the Trail Making Test and Stroop Test* (CAMPANHOLO *et al.*, 2014).

#### 4.3.3.6 Teste de Trilhas- *Trail Making Test (TMT) - Partes A e B*

O *Trail Making Test (TMT)*, também nomeado por Teste de Trilhas é amplamente utilizado em avaliações neuropsicológicas com a premissa de avaliar a atenção (seletiva e alternada), velocidade de processamento e flexibilidade cognitiva (TOUMBAUGH, 2004; SALVADOR *et al.*, 2017; CAMPANHOLO *et al.*, 2018).

O teste é dividido em duas partes TMT-A e TMT-B. O material utilizado é lápis, papel branco A4 e cronômetro (SALVADOR *et al.*, 2017).

Antes da execução do teste o examinando passa por um breve treinamento referente a cada parte da tarefa e é orientado em ambas as etapas realizar a atividade o mais rápido possível sem tirar o lápis do papel (SALVADOR *et al.*, 2017; CAMPANHOLO *et al.*, 2018).

Na primeira etapa TMT-A, o sujeito tem que ligar em ordem crescente numerais de 1 a 25 que estão aleatoriamente disponibilizados dentro de círculos. Na segunda parte TMT-B, o indivíduo deve interligar alternadamente números que vão de 1 a 13 e letras de A ao L (ex.: 1A, 2B, 3C etc.) que também se encontram dentro de círculos e dispostos aleatoriamente. Essa etapa da atividade segue a ordem crescente dos números e a ordem alfabética ao executar a tarefa (CAMPANHOLO *et al.*, 2014; SALVADOR *et al.*, 2017; CAMPANHOLO *et al.*, 2018).

Tanto o TMTA como o TMTB são aplicados separadamente. As pontuações para esta pesquisa foram aferidas pelo tempo de execução das tarefas e os parâmetros para análises foram conforme o estudo de Campanholo *et al.*, (2014) que foi realizado para normatização do teste para a população brasileira adulta.

#### 4.3.3.7 Tarefa de Fluência Verbal Semântica (FVS) - Categoria Animais e Tarefa de Fluência Verbal Fonêmica (FVF) Letras F-A-S

O Teste de Fluência Verbal está relacionado à capacidade de precisão da linguagem na produção fluente da fala (HAZIN *et al.*, 2016; BERTOLA, 2020) e é extensamente utilizado nos “domínios de letras e categorias” (HAZIN *et al.*, 2016). Por estas razões foram inseridas essas tarefas de Fluência Verbal Semântica (FVS) Categoria Animais e Fluência Verbal Fonêmica (FVF) Letras F-A-S neste estudo com o objetivo de investigar a memória semântica, velocidade de processamento e função executiva.

No FVS é solicitado ao indivíduo que no tempo de 1 minuto, evoque a maior quantidade possível o mais rápido que puder palavras de determinada categoria (ex.: animais,

frutas, roupas) (ESTEVEES *et al.*, 2015; CAMPANHOLO, 2018). Como supracitado, para esta pesquisa optou-se pela categoria animais.

No que tange ao FVF o participante também tem que falar o mais rápido possível o máximo de palavras (MOURA *et al.*, 2017). O sujeito é orientado a produzir palavras que iniciem com as letras F-A-S. O avaliando tem o tempo de 60 segundos por letra e terá que seguir algumas regras de inibição, as quais são: não pode falar substantivos próprios (nomes de pessoas, países nem de cidades), não deve evocar palavras parecidas como verbos conjugados nem a mesma palavra com “sufixo diferente” (MACHADO *et al.*, 2009; MOURA *et al.*, 2017).

Em ambos os Testes de Fluência cada etapa ocorre separadamente e as pontuações são dadas pela soma das produções de palavras evocadas corretamente (ESTEVEES *et al.*, 2015) e para este trabalho seguiu-se os dados de normatização para a população brasileira disponibilizados no estudo *Impact of sociodemographic variables on executive functions* (CAMPANHOLO *et al.*, 2017).

#### **4.4 Aspectos éticos**

A pesquisa seguiu os preceitos éticos vigentes na Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Walter Cantídio da Universidade Federal do Ceará (HUWC-UFC), conforme registro nº 34337420.3.0000.5045 e parecer nº 4.201.482. Todos os participantes da pesquisa assinaram o TCLE, antes de qualquer procedimento do estudo. Em anexo, parecer do comitê de ética e no apêndice A, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

#### **4.5 Análise estatística**

As variáveis categóricas foram apresentadas como contagens e frequência relativa em porcentagem. Para avaliar a associação entre variáveis categóricas foram usados os testes de qui-quadrado ou teste exato de Fisher. As variáveis contínuas foram avaliadas primeiramente quanto à normalidade, usando teste de normalidade de Shapiro-Wilk, bem como analisando gráficos Q-Q, histogramas e medidas de dispersão. Variáveis consideradas normais foram apresentadas como média  $\pm$  desvio e não normais como mediana e amplitude interquartil. Para as comparações de dados contínuos normais entre três grupos independentes (Controle vs DRC leve vs DRC moderada/severa) foi usado ANOVA, e para as comparações múltiplas

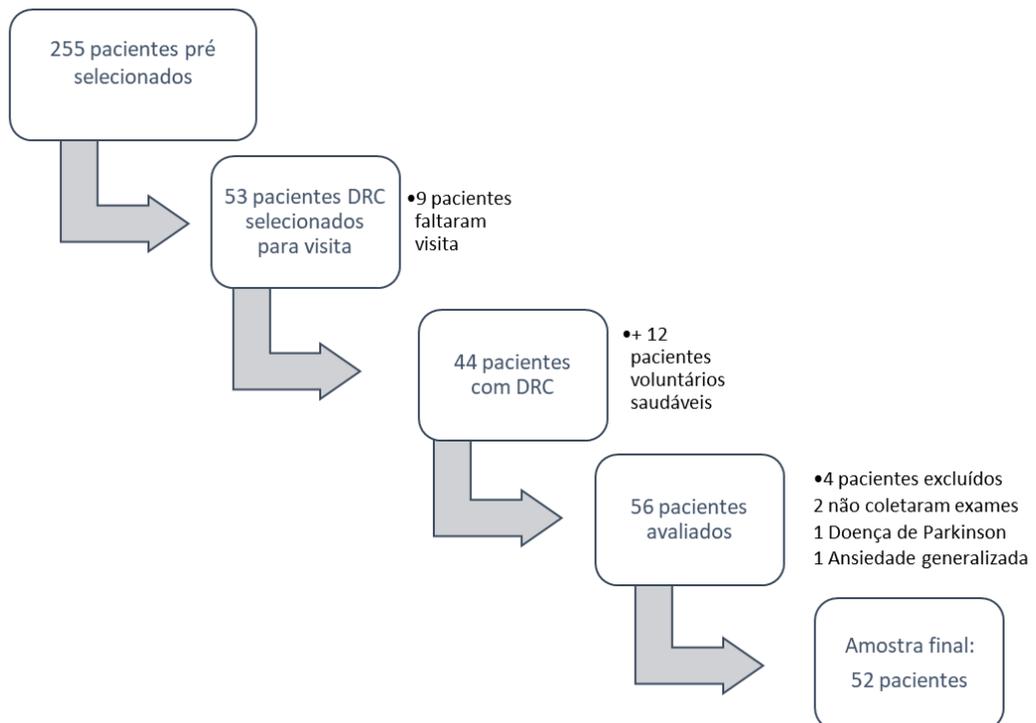
entre os grupos em casos significativos ( $p < 0,05$ ) foi usado o pós-teste de Tukey. Para dados contínuos não normais, foi usado o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Além disso, análises de correlação de *Spearman* foram feitas entre os biomarcadores e parâmetros da avaliação neuropsicológica. O coeficiente  $\rho$  de *Spearman* foi calculado. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. Os dados foram analisados pelo software IBM SPSS Statistics para Macintosh (Versão 23.0. Armonk, NY: IBM Corp).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Amostra, parâmetros clínicos e demográficos

De um total de 255 pacientes inicialmente pré-selecionados do ambulatório de DRC, um total de 53 pacientes foram selecionados para as visitas. Destes pacientes, 9 pacientes não compareceram às visitas agendadas. Um total de 44 pacientes portadores de DRC compareceram à visita, além de 12 voluntários saudáveis. Um total de 04 pacientes foram posteriormente excluídos, 02 porque não conseguiram concluir a avaliação neuropsicológica, 01 deles por distúrbio de ansiedade generalizada durante o exame neuropsicológico o que impossibilitou a aplicação dos testes, e outro paciente por Doença de Parkinson. Além desses, outros 02 pacientes foram excluídos por não ter sido possível realizar coleta de amostra de sangue destes pacientes, por dificuldade técnica na coleta. A amostra final de pacientes que concluíram todas as etapas da pesquisa foram 52 pacientes e está desenhada no Fluxograma 1.

#### Fluxograma 1 - Desenho do estudo.



Fonte: Feito pelo autor.

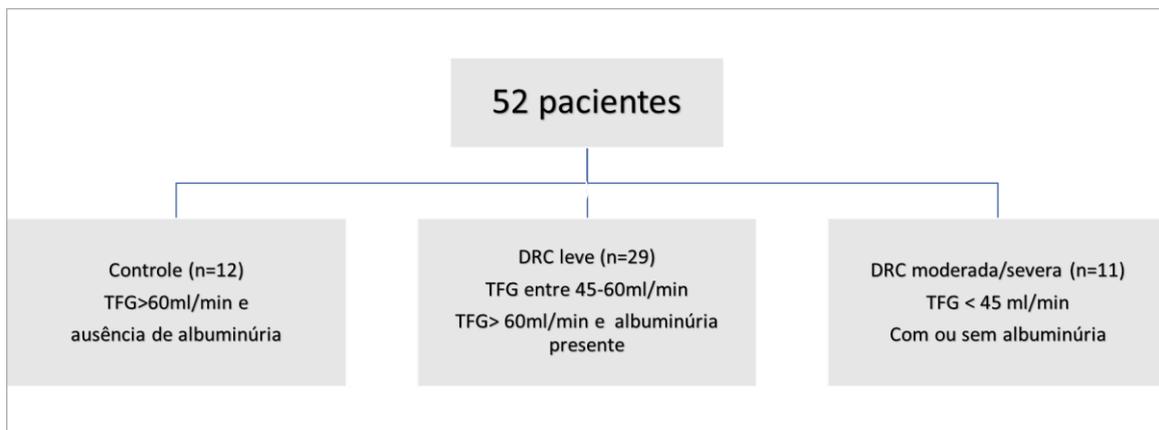
Houve uma divisão da amostra de pacientes, em 03 grupos distintos, baseados na TFG:

- Grupo 1 (G1) - Grupo controle, TFG estimada  $\geq$  ou igual 60 mL/min/ 1,73m<sup>2</sup> e albuminúria normal definida por RACU  $<$  30mg/g, composto por um total de 12 pacientes.

- Grupo 2 (G2) - DRC leve, TFG estimada em 45 a 59 mL/min/1,73m<sup>2</sup> ou TFG  $>$  60 mL/min/ 1,73m<sup>2</sup> e albuminúria anormal, definida por uma RACU  $>$  30mg/g, composto por um total 29 pacientes.

- Grupo 3 (G3) - DRC moderada a severa, TFG estimada  $<$  45 mL/min/1,73m<sup>2</sup> (calculados pela fórmula do CKD-EPI), composto por um total de 11 pacientes.

### Fluxograma 2 – Divisão dos grupos de pacientes de acordo com taxa de filtração glomerular e albuminúria.



Fonte: Feito pelo autor. TFG-taxa de filtração glomerular, DRC-doença renal crônica.

Em relação a distribuição do grupo, 31 pacientes (59,6%) eram do sexo feminino e 21 pacientes do sexo masculino (40,4%), a média de idade em anos foi de  $53,3 \pm 15,4$  anos. Os pacientes portadores de DRC moderada a severa tinham média de idade  $59,4 \pm 16,4$  anos, um pouco mais elevada que a média de idade quando comparado ao grupo controle  $48,8 \pm 18,2$  anos, porém não houve significância estatística, entre as médias de idade entre os grupos.

Em relação a presença de albuminúria, a média de albuminúria foi de 67,24 mg/g (6,97 - 219,35). Um total de 21 pacientes (40,4 %) tinham albuminúria normal,  $<$ 30mg/g, 23 pacientes (44,2%) tinham albuminúria moderadamente elevada, 30-300 mg/g, e um total de 8 pacientes (15,4%) tinham albuminúria severamente aumentada,  $>$ 300 mg/g. A média de albuminúria do grupo Controle, RACU= 7,35 mg/g do grupo DRC leve, RACU= 290 mg/g, e do grupo DRC moderada/severa RACU= 159 mg/g. A média de TFG entre os grupos estudados foi  $70,3 \pm 32,8$  mL/min/1,73m<sup>2</sup>. O grupo Controle apresentou TFG média = 96

mL/min/1,73m<sup>2</sup>. DRC leve teve TFG média = 77 mL/min/1,73m<sup>2</sup> e DRC moderada a severa TFG média = 26 mL/min/1,73m<sup>2</sup>. Tabela 1 descreve a valores de albuminúria e TFG entre os grupos estudados. O IMC médio dos pacientes foi de 28,7 ± 4,8 Kg/m<sup>2</sup>. A Tabela 1 mostra os valores de albuminúria, TGF e IMC descritos acima.

**Tabela 1.** Classificação dos grupos de pacientes por taxa de filtração glomerular e albuminúria.

	<b>Grupo total (n=52)</b>
<b>Sexo (N, %)</b>	
Feminino	31 (59,6)
Masculino	21 (40,4)
<b>Idade, anos</b>	53,3 ± 15,4
<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	28,7 ± 4,8
<b>TFG (mL/min/1,73 m<sup>2</sup>)</b>	70,3 ± 32,8
Controle	96 (66 – 135)
DRC Leve	77 (46 – 128)
DRC Moderada/Severa	26 (14 – 44)
<b>Albuminúria (mg/g)</b>	206,0
Controle	7,35
DRC Leve	290,0
DRC Moderada/Severa	159,0
<b>Albuminúria (N, %)</b>	
Normal	21 (40,4%)
> 30mg/g	31 (59,6%)
<b>Albuminúria (N, %)</b>	
Abaixo de 30 mg/g	21 (40,4%)
Entre 30 e 300 mg/g	23 (44,2%)
Acima de 300 mg/g	8 (15,4%)

Dados categóricos expressos como contagem absoluta e porcentagens entre parêntesis.

Dados quantitativos expressos como média ± desvio padrão ou como mediana e amplitude interquartil entre parêntesis.

As principais comorbidades presentes neste grupo de pacientes com DRC, ilustradas na Tabela 2, foram: HAS- 32 pacientes (61,5%), Dislipidemia- 19 pacientes (36,5%), Diabetes Mellitus- 16 pacientes (30,8%), Litíase renal - 11 pacientes (21,2%), Infecção urinária recorrente- 06 pacientes (11,5%), Nefrite Lúpica- 06 (11,5%), Doença Policística Renal - 04 pacientes (7,7%). Estes achados evidenciam a HAS e o diabetes, duas patologias frequentes nestes pacientes, e corroboram com os dados da literatura que evidenciam estas como as duas

principais etiologias de DRC no Brasil e no mundo, a HAS e o diabetes (EKNOYAN; LAMEIRE, 2013).

**Tabela 2. Antecedentes médicos dos pacientes estudados.**

	<b>Grupo total (n=52)</b>
Hipertensão Arterial Sistêmica	61,5%
Dislipidemia	36,5%
Diabetes Mellitus	30,8%
Litíase Renal	21,2%
Infecção Urinária	11,5%
Nefrite Lúpica	11,5%
Rim Policístico	7,7%
<b>Horas de sono</b>	
Não Informado	1 (1,9%)
8 a 10 horas/dia	19 (36,5%)
7 a 6 horas/dia	20 (38,5%)
<5 horas/dia	12 (23,1%)
<b>História familiar de demência</b>	16 (30,8%)
<b>Uso de álcool</b>	29 (55,8%)
<b>Tabagismo</b>	13 (25%)
<b>Uso de drogas ilícitas</b>	2 (3,8%)

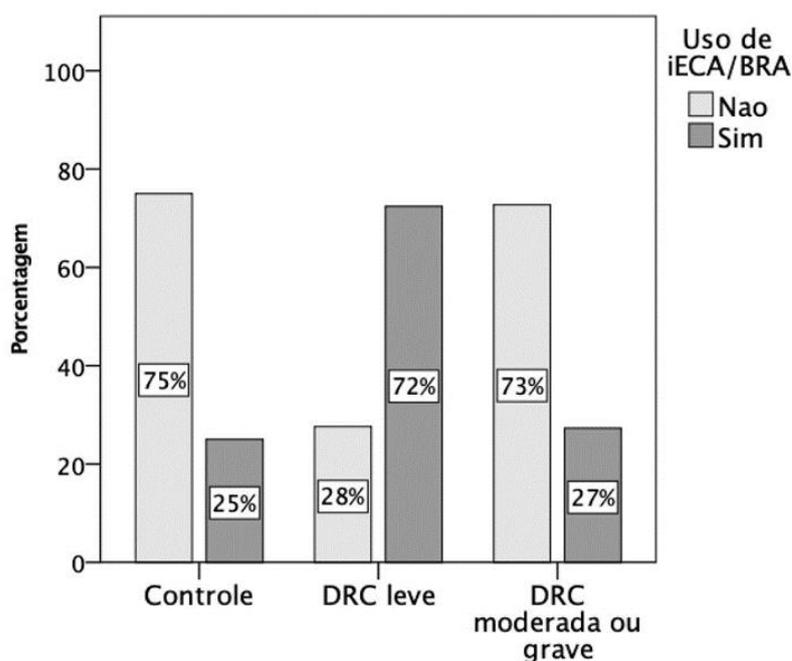
Dados categóricos expressos como contagem absoluta e porcentagens entre parêntesis.

Em relação aos hábitos de vida, na Tabela 2, observamos que 13 pacientes (25%) tinham histórico de tabagismo, 29 (55,8%) relataram fazer uso de bebidas alcoólicas (uso prévio ou atual), e 2 pacientes apenas (3,8%) relataram uso prévio de drogas ilícitas. Um total de 16 (30,8%) pacientes relatou história familiar positiva para demência. Um total de 12 pacientes (23,1 %) relataram distúrbios do sono (5 ou menos horas de sono).

Em relação ao uso de medicamentos anti-hipertensivos nefro protetores (iECA ou BRA), apenas 3 pacientes (25%) do grupo Controle faziam uso, enquanto 21 (72,4%) pacientes do grupo DRC leve faziam uso da medicação, e apenas 3 pacientes (27,3%) do Grupo DRC moderada/severa faziam uso da medicação. Essa diferença foi estatisticamente significativa entre os grupos ( $p < 0,004$ ). Percebe-se uma baixa frequência de uso dessas medicações em pacientes com DRC moderada/severa. Isso pode ser justificado pelo receio dos profissionais médicos na prescrição desta classe de medicação na DRC em estágios mais

avanzados de DRC pelo risco de complicação com hipercalemia ou diminuição da TFG, e, portanto, neste grupo percebemos baixo uso dos inibidores do Sistema Renina Angiotensina Aldosterona. O gráfico 4 abaixo ilustra a baixa prevalência do uso de tais medicações em pacientes com DRC moderada/severa.

**Gráfico 4 – Prevalência do uso de inibidores do Sistema Renina Angiotensina Aldosterona nos grupos de pacientes estudados.**



Fonte: Feito pelo autor.

Evidências atuais orientam a utilização e manutenção de iECA ou BRA, ambos inibidores do Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRAA), mesmo nos estágios mais avançados pelo benefício em diminuir albuminúria e retardar progressão de DRC. Em um recente estudo, multicêntrico, com uma amostra de 411 pacientes com DRC avançada (com TFG < 30 mL/min/1,73m<sup>2</sup>), a descontinuação desta medicação neste grupo de pacientes não foi associada a menor taxa de redução da TFG em comparação ao grupo que permaneceu em uso da medicação, sugerindo benefício em manter a medicação nos estágios mais avançados da DRC (BHANDARI *et al.*, 2022).

Ativação do SRAA promove e mantém diversas desordens clínicas incluindo insuficiência cardíaca congestiva, HAS e DRC. Níveis elevados de angiotensina II e aldosterona promovem um ambiente pró fibrótico, pró-inflamatório, com consequente

remodelamento miocárdico e disfunção cardiorenal. A associação do SRAA com o Klotho constitui importante determinante da integridade renal e cardíaca.

Em contraste ao efeito na secreção de FGF23, a aldosterona reduz os níveis renais do RNA mensageiro (RNAm) do gene do Klotho e da proteína Klotho. O vasoconstrictor angiotensina II possui efeito similar (YU *et al.*, 2005). Em estudos em camundongos foi demonstrado que a administração de bloqueadores do receptor tipo 1 de angiotensina II (BRA) e de inibidores da enzima conversora de angiotensina (iECA) elevam os níveis renais de mRNA do Klotho e da proteína Klotho, sugerindo que o SRAA possui papel negativo na regulação da expressão renal do Klotho (YU *et al.*, 2005, KURO-O *et al.*, 2019)

Aldosterona e Angiotensina 2 inibem a transcrição do gene do Klotho, um efeito que pode ser atenuado pelo bloqueio do receptor da angiotensina 2 (AT1R). Daí a importância da inibição do SRAA na manutenção dos níveis séricos de Klotho. Os receptores AT1 são expressos no pulmão, fígado, nos rins, no coração, nos vasos, no cérebro, nas adrenais e várias glândulas endócrinas. Ainda são necessários futuros estudos para pesquisar a associação da inibição do SRAA e manutenção da saúde cerebral, através do aumento da regulação da proteína Klotho (EPSTEIN *et al.*, 2022)

Quando se avalia a distribuição das amostras de pacientes entre os 03 grupos distintos, percebemos na Tabela 3, que os pacientes foram distribuídos de maneira uniforme em relação a idade, sexo, IMC, comorbidades, horas de sono, história familiar de demência, e hábitos de vida como o tabagismo, etilismo e uso de drogas ilícitas. Não houve diferença estatisticamente significativa entre nenhuma destas variáveis nos grupos. Isso pode demonstrar que as características epidemiológicas e clínicas dos participantes foram similares nos três grupos. Porém, vale salientar que como as amostras dos grupos eram pequenas, e por este motivo o teste não conseguiu capturar diferença entre os grupos.

**Tabela 3. Comparação entre parâmetros clínicos, comorbidades e aspectos de saúde mental entre os grupos estudados.**

	Doença renal Crônica			p
	Controle (n=12)	Leve (n=29)	Moderada/Severa(n=11)	
<b>Sexo</b>				0,539
Feminino	8 (66,7)	18 (62,1)	5 (45,5)	
Masculino	4 (33,3)	11 (37,9)	6 (54,5)	
<b>Idade, anos</b>	48,8 ± 18,2	53 ± 13,7	59,4 ± 16,4	0,281
<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	30,2 ± 5	28,5 ± 4,7	27,3 ± 4,8	0,362
<b>Comorbidades</b>				
<i>Diabetes mellitus</i>	1 (8,3)	10 (34,5)	5 (45,5)	0,126
Hipertensão arterial sistêmica	6 (50)	19 (65,5)	7 (63,6)	0,641
<i>Litíase Renal</i>	2 (16,7)	8 (27,6)	1 (9,1)	0,442
<i>Infecção urinaria</i>	2 (16,7)	3 (10,3)	1 (9,1)	0,813
<i>Obesidade</i>	1 (8,3)	3 (10,3)	0 (0)	0,546
<i>Rim policístico</i>	1 (8,3)	1 (3,4)	2 (18,2)	0,294
Nefrite lúpica	2 (16,7)	3 (10,3)	1 (9,1)	0,813
<i>Abuso de AINES</i>	0 (0)	1 (3,4)	0 (0)	0,667
<i>Infarto</i>	1 (8,3)	3 (10,3)	2 (18,2)	0,84
<i>Histórico de DRC</i>	3 (25)	6 (20,7)	4 (36,4)	0,593
<b>Aspectos de saúde mental e estilo de vida</b>				
<i>Horas de sono</i>				0,351
Não Informado	1 (8,3)	0 (0)	0 (0)	
8 a 10 horas/dia	4 (33,3)	10 (34,5)	5 (45,5)	
7 a 6 horas/dia	2 (16,7)	14 (48,3)	4 (36,4)	
5 a 4 horas/dia	4 (33,3)	4 (13,8)	1 (9,1)	
<4 horas/dia	1 (8,3)	1 (3,4)	1 (9,1)	
<i>Ansiedade</i>	1 (8,3)	4 (13,8)	3 (27,3)	0,426
<i>História Familiar de demência</i>	6 (50)	5 (17,2)	5 (45,5)	0,058
<i>Uso de álcool</i>	5 (41,7)	17 (58,6)	7 (63,6)	0,512
<i>Uso de drogas</i>	1 (8,3)	0 (0)	1 (9,1)	0,268
<i>Tabagismo</i>	6 (50)	4 (13,8)	3 (27,3)	0,050
<b>Uso de iECA/BRA</b>	3 (25)	21 (72,4)	3 (27,3)	0,004

Dados categóricos expressos como contagem absoluta e porcentagens entre parêntesis.

Dados quantitativos expressos como média ± desvio padrão. IMC: índice de massa corpórea, iECA: inibidor de enzima conversora de angiotensina, BRA: bloqueador do receptor de angiotensina.

## 5.2 Quantificação dos níveis séricos de Klotho em pacientes com DRC

Neste estudo, utilizando a técnica de ELISA, conseguimos constatar o que está sendo repetidamente demonstrado em pesquisas recentes que níveis séricos de Klotho foram significativamente menores em pacientes com DRC moderada/severa, KL= 0,38 ng/mL (0,17 - 3,18), e pacientes com DRC leve, KL= 0,2 ng/mL (0,17 - 1,46), em comparação com grupo

controle, KL=1,61 ng/mL (0,28 - 2,03) (p=0,015). Os níveis séricos de Klotho começam a reduzir a partir do estágio 2 de DRC e Klotho urinário até mesmo mais precocemente (NEYRA *et al.*, 2017). A Tabela 4 ilustra a distribuição dos valores de Klotho e outros biomarcadores séricos entre os diferentes grupos de DRC.

**Tabela 4. Comparação entre os biomarcadores séricos e os diferentes graus de doença renal crônica.**

	Doença renal Crônica			p
	Controle (n=12)	Leve (n=29)	Moderada/Severa (n=11)	
<b>Klotho (ng/mL)</b>	1,61 (0,28 - 2,03)	0,2 (0,17 - 1,46)	0,38 (0,17 - 3,18)	<b>0,015</b>
<b>FGF23 (ng/mL)</b>	0,2 (0 - 4)	0,7 (0 - 2,3)	4 (0,5 - 11,6)	0,052
<b>Angiopietina-1 (ng/mL)</b>	75,1 (56,6 - 122,4)	62,5 (41,9 - 90,4)	94 (53,2 - 129,9)	0,168
<b>Angiopietina 2 (ng/mL)</b>	1,57 (0,94 - 2,04)	1,56 (1,13 - 2,65)	4,21 (2,16 - 4,96)	<b>0,003</b>
<b>ANG2/ANG1</b>	0,02 (0,01 - 0,03)	0,03 (0,02 - 0,04)	0,04 (0,03 - 0,07)	0,065
<b>VCAM-1 (ng/mL)</b>	604 ± 180	726 ± 275	920 ± 162	<b>0,012</b>
<b>Ureia (mg/dL)</b>	31 (29 - 43)	43 (39 - 58)	77 (57 - 110)	<b>0,007</b>
<b>Creatinina serica (mg/dL)</b>	0,9 (0,6 - 1)	1,05 (0,7 - 1,35)	2,3 (1,8 - 3,8)	<b>&lt;0,001</b>
<b>Cálcio (mg/dL)</b>	9,32 ± 0,9	9,38 ± 2,18	9,62 ± 1,14	0,805
<b>Fósforo (mg/dL)</b>	4,73 ± 1,16	5,18 ± 2,01	5,33 ± 2,06	0,754

Dados categóricos expressos como contagem absoluta e porcentagens entre parêntesis. Dados quantitativos expressos como média ± desvio padrão ou como mediana e amplitude interquartil entre parênteses. ANG2: angipopietina 2, ANG1: angipopietina 1.

**Gráfico 5 - Comparação dos níveis de Klotho entre grupos conforme estágio de doença renal crônica.**

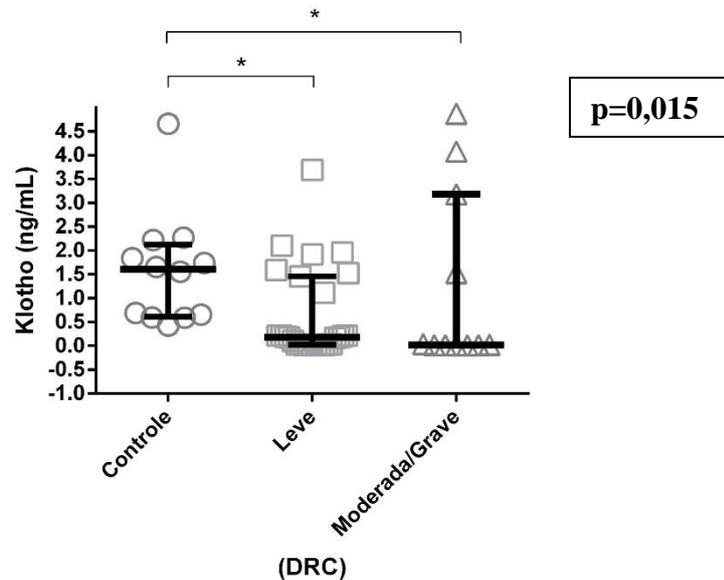


Gráfico de dispersão vertical com barras representando mediana e quartis, e pontos representando cada paciente avaliado.

A concentração sérica de Klotho é um marcador da concentração de Klotho renal, já que o rim é a principal fonte de Klotho. A disfunção renal induz a redução da expressão da Klotho renal, que conseqüentemente reduz os níveis séricos de Klotho. Os níveis séricos de Klotho no estágio V de DRC chegam a 20% dos níveis em pacientes com estágio I de DRC. (SAKAN *et al.*, 2014).

Deteção de RNAm do Klotho renal foi significativamente menor em pacientes com DRC que em controles saudáveis e se correlacionou com TFG estimada (KOH *et al.*, 2001). Em pacientes com DRC estágios 1–5, incluindo pacientes dialíticos, com biópsias renais disponíveis, deteção de RNAm do Klotho se correlacionou com a TFG estimada, após ajuste para idade e outros parâmetros (SAKAN *et al.*, 2014).

Estudos indicam que a deficiência de Klotho está fortemente relacionada com o desenvolvimento e progressão da DRC e complicações extrarrenais. Portanto, deficiência de Klotho solúvel parece ter um potencial diagnóstico, servindo como marcador precoce e sensível na DRC. Muitos pesquisadores têm investigado o possível uso de Klotho como um marcador de DRC (SHIMUMARA *et al.*, 2012, ZOU *et al.*, 2018).

Apesar de dados sugerirem o Klotho como um novo biomarcador promissor, a validação dos ensaios para dosagem em larga escala e multicêntrica ainda é necessária. Uma

dificuldade a ser superada antes da utilização em larga escala em humanos é a padronização da metodologia da mensuração do Klotho solúvel. Devido às divergências dos ensaios clínicos, que usam reagentes de diferentes marcas e a maioria sem validação forte (NEYRA *et al.*, 2020).

Além disso, alguns fatores podem influenciar nas medidas do Klotho sérico, como idade, sexo, inflamação, dieta rica em fósforo, FGF23, suplementação de vitamina D, e uso de algumas medicações, estes fatores têm que serem levados em consideração em futuros estudos prospectivos que testarão a viabilidade do Klotho como candidato a biomarcador (NEYRA *et al.*, 2020).

Um estudo avaliou dois métodos de mensuração da concentração de Klotho sérico em humanos, comparando o teste de imunoprecipitação-imunoblot (IP-IB) com o ELISA. As mensurações de Klotho pela técnica de IP-IB se correlacionam fortemente com a taxa de filtração glomerular estimada em comparação com uma menor correlação com a técnica do ELISA. Essa é uma notícia negativa para o avanço na área do Klotho pois a técnica IP-IB consome muito tempo e não é apropriada para estudos em grandes escalas (NEYRA *et al.*, 2019).

Resultados da mensuração de Klotho divergem quando comparado plasma fresco com amostras congeladas, sendo a técnica do ELISA menos estável que a técnica IP-IB, quando as amostras são submetidas a ciclos de congelação (BARKER *et al.*, 2015).

### **5.3 Quantificação dos níveis séricos de FGF23 nos pacientes com DRC**

A dosagem de FGF23 = 4,0 (ng/mL) (0,5 - 11,6), no grupo DRC moderada/severa, foi maior que o grupo DRC leve, FGF23 = 0,7 (ng/mL) (0 - 2,3) e no grupo controle, FGF23= 0,2 (ng/mL) (0 - 4) (p= 0,052). Podemos observar uma tendência a significância estatística (p= 0,052), contudo o pequeno número da amostra, não conseguiu evidenciar este achado. O gráfico 6 ilustra a distribuição dos valores de FGF23 nos grupos de pacientes estudados.

**Gráfico 6 - Comparação dos níveis de FGF23 entre grupos conforme estágio de doença renal crônica.**

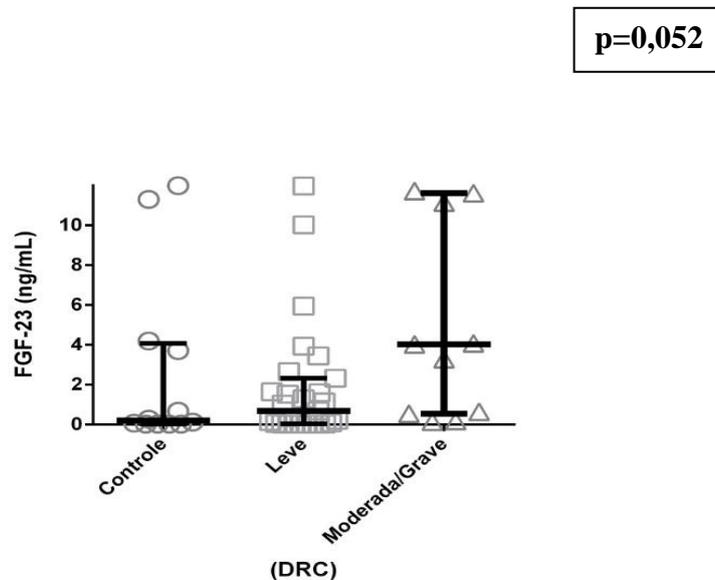


Gráfico de dispersão vertical com barras representando mediana quartis, e pontos representando cada paciente avaliado.

Quando se correlacionou a TFG estimada em valor absoluto, com níveis séricos de FGF23, utilizando a correlação de *Spearman*, no grupo DRC moderada/severa, ou seja, TFG estimada  $< 45 \text{ mL/min/1,73m}^2$ , houve significância estatística, o que sinaliza que com a redução dos valores de TFG há aumento dos valores de FGF23 ( $\rho = -0,636$ ,  $p = 0,035$ ). Este achado foi ilustrado na Tabela 5. Percebeu-se neste estudo, confirmando achados da literatura, que o maior aumento dos níveis de FGF23 é evidenciado neste grupo de pacientes, DRC em estágios mais avançados. (NEYRA *et al.*, 2020).

A secreção aumentada de FGF23 na circulação ocorre pela sobrecarga de fósforo em estágios iniciais da DRC. O aumento do FGF23 aumenta a fração de excreção de fósforo e reduz níveis de 1,25-Vitamina D3 via sinalização FGF23-Klotho. Na DRC avançada, níveis de Klotho reduzidos não são suficientes para a sinalização deste como cofator do FGF23, portanto o FGF23 não é mais capaz de manter níveis séricos de fósforo dentro da normalidade. Consequentemente, os níveis de fósforo se elevam e a secreção de FGF23 também. Com o avançar da progressão da DRC há aumento dos níveis séricos de FGF23 e redução dos níveis séricos de Klotho (SAKAN *et al.*, 2014)

Em um grupo de pacientes com DRC não dialítica, acompanhados por uma média de 36 meses, 40 de um total de 128 pacientes (31,2%) evoluíram com pior desfecho, iniciaram

terapia dialítica ou foram a óbito por causas cardiovasculares (31 e 9, respectivamente). Paciente com nível sérico de FGF23 maiores que os valores médios (218,8 RU/mL) tiveram menor sobrevida livre de evento comparado aos pacientes com níveis abaixo da média ( $p < 0,0003$ ). Ao contrário, aqueles com níveis séricos de Klotho acima da média (479,8 pg/mL) tiveram maior sobrevida livre de evento comparados com aqueles com níveis abaixo da média ( $p = 0,004$ ) (MANOU *et al.*, 2020). Portanto, o aumento do FGF23 e redução de níveis de Klotho estão associados a piores desfechos e mortalidade cardiovascular.

O eixo endócrino envolvendo a relação entre o FGF23 e o Klotho é capaz de mediar uma série de processos fisiológicos que colaboram para a manutenção da homeostase do cálcio e do fósforo no organismo, principalmente através da regulação da função renal e das glândulas paratireoides, regulando o metabolismo do fósforo. Quando ocorre esse desbalanço, ocorre hiperfosfatemia e calcificação vascular, dano vascular, o que pode explicar a lesão vascular nestes pacientes.

#### **5.4 Quantificação dos níveis séricos marcadores de lesão endotelial VCAM-1 e Angiopietina 2 em pacientes com DRC**

Neste estudo, conseguimos demonstrar que níveis séricos do biomarcador de lesão endotelial, VCAM-1, foi significativamente maior em pacientes com DRC moderada/severa quando comparado ao grupo controle, com evidência estatística, Grupo controle:  $604 \pm 180$  ng/mL, Grupo DRC leve:  $726 \pm 275$  ng/mL, Grupo DRC moderada/severa:  $920 \pm 162$  ng/mL ( $p=0,012$ ). Estes dados podem ser visualizados no gráfico 7.

VCAM-1 é uma proteína expressada na superfície da célula endotelial que interage com a superfície dos leucócitos, participando da adesão e migração de leucócitos para o interstício durante a inflamação. Sob estímulo inflamatório, como TNF- $\alpha$  e IL1 $\beta$ , haverá transcrição do gene VCAM-1 induzida pela via NF-kB. Com a redução da TFG, a inflamação nas células endoteliais glomerulares induz expressão de moléculas de adesão, como a VCAM-1, que agrava ainda mais a injúria renal. VCAM-1 é um preditor de doença cardiovascular, e preditor de mortalidade (TRONCOSO *et al.*, 2021).

**Gráfico 7 - Comparação dos níveis de VCAM-1 entre grupos conforme estágio de doença renal crônica.**

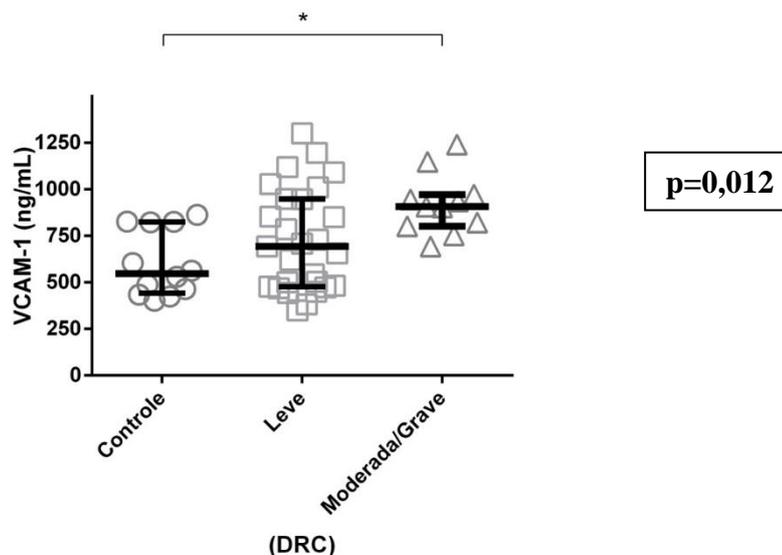


Gráfico de dispersão vertical com barras representando mediana e quartis, e pontos representando cada paciente avaliado.

A fim de validar nosso resultado, conseguimos também demonstrar que níveis séricos de outro biomarcador de lesão endotelial, Angiopietina 2, foram significativamente aumentados, de maneira inversamente proporcional, à diminuição da TFG. Grupo controle: 1,57 (0,94 - 2,04) ng/mL, Grupo DRC leve: 1,56 (1,13 - 2,65) ng/mL, Grupo DRC moderada/severa: 4,21 (2,16 - 4,96) ng/mL ( $p = 0,003$ ). Estes dados estão demonstrados na Tabela 4 e ilustrado no Gráfico 8.

Angiopietina 2 é um fator de crescimento endotelial, modula o desenvolvimento e remodelamento durante o processo de angiogênese e inflamação. Existem dois tipos de angiopietinas, angiopietina 1 (Ang 1) e angiopietina 2 (Ang 2), e ambas agem no mesmo receptor endotelial, Tie-2. Ang 1 se liga ao receptor Tie2 e estabiliza a estrutura endotelial vascular. Contudo, a Ang 2 possui propriedades opostas a Ang 1. Ang 2 interrompe o sinal Ang1-Tie-2, e contribui para mudanças estruturais e funcionais dos vasos através do efeito do VEGF 2 (*Vascular Endothelial Growth Factor 2*). Aumento da expressão de Ang 2 gerou apoptose endotelial, e promoveu expressão de moléculas de adesão como a ICAM-1 e VCAM-1 (TSAI *et al.*, 2016). A Ang 1 parece ter efeito protetor vascular, ao contrário da Ang 2. Em relação à Ang 1 não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

**Gráfico 8 - Comparação dos níveis de Angiopietina 2 entre grupos conforme estágio de doença renal crônica.**

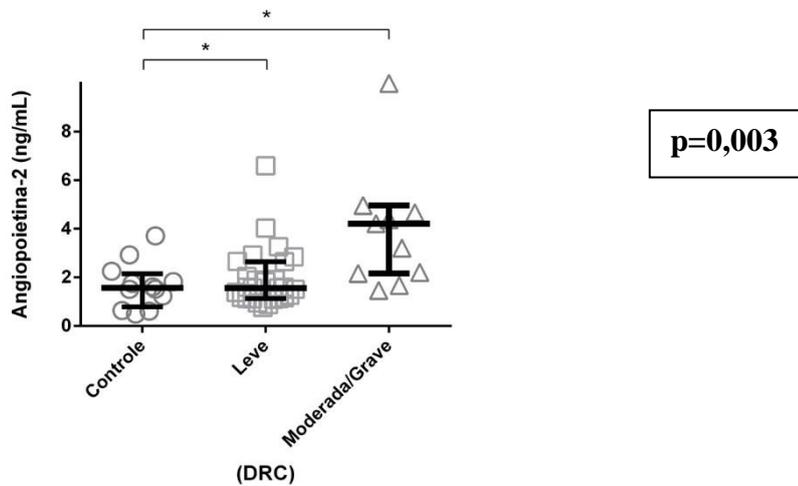


Gráfico de dispersão vertical com barras representando mediana e quartis, e pontos representando cada paciente avaliado.

Estudo anterior já evidenciou níveis elevados de Ang 2 e VCAM-1 em pacientes com DRC não dialítica (estágios 3-5). Nestes pacientes também foi evidenciado aumento dos níveis de SYNDECAN-1, marcador de lesão de glicocálix endotelial (PADBERG *et al.*, 2014).

Outro estudo demonstrou uma associação significativa entre três biomarcadores de lesão endotelial (ICAM-1, Ang 2, SYNDECAN-1) e função cognitiva em pacientes DRC dialíticos, demonstrando evidência que doença vascular pode ser um importante fator fisiopatológico do déficit cognitivo em pacientes com DRC. Estes marcadores de lesão endotelial também foram associados com mortalidade cardiovascular nesse grupo de pacientes (FREIRE *et al.*, 2020).

Biomarcadores relacionados a injúria endotelial estão aumentados em pacientes com DRC em hemodiálise e estão relacionados à aterosclerose, doença cardiovascular, mortalidade cardiovascular e mortalidade por outras causas (PAPAYIANNI *et al.*, 2002).

### 5.5 Correlação entre níveis séricos de Klotho e VCAM-1 em DRC moderada/severa

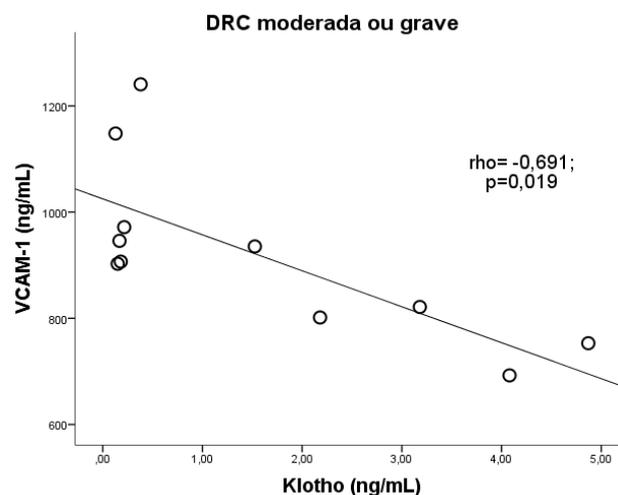
Na Tabela 5, abaixo representada, constata-se a relação inversa, estatisticamente significativa, de níveis de Klotho com níveis séricos de VCAM-1 ( $p= 0,019$ ) no grupo de pacientes com DRC moderada/severa. Um resultado importante deste estudo clínico foi atestar a relação inversa dos níveis de Klotho e VCAM-1, demonstrando que a redução de nível de Klotho está associada a aumento deste biomarcador de lesão endotelial, com o avançar da DRC. A Tabela 5 demonstra esses resultados através da correlação de *Spearman* e o Gráfico 9 evidencia a distribuição dos valores de Klotho e VCAM-1.

**Tabela 5. Correlação entre biomarcadores endoteliais com níveis de Klotho e FGF23 em pacientes com estágio moderado/severo de doença renal crônica.**

	Klotho (ng/mL)			FGF23(ng/mL)		
	n	rho	p	n	rho	p
<b>Exames Laboratoriais</b>						
Albuminúria (mg/g)	10	0,152	0,676	10	0,103	0,777
TFG estimada (mL/min/1,73m <sup>2</sup> )	11	-0,418	0,201	11	<b>-0,636*</b>	<b>0,035</b>
Angiopietina 2 (ng/mL)	11	0,091	0,79	11	0,445	0,170
VCAM-1 (ng/mL)	11	<b>-0,691*</b>	<b>0,019</b>	11	-0,064	0,853

\*  $p < 0,005$

**Gráfico 9 - Correlação entre níveis sistêmicos de Klotho com o biomarcador endotelial VCAM-1.**



Estes achados, bastante relevantes, corroboram com dados apontados anteriormente

em modelos experimentais, que evidenciaram que animais com deficiência de Klotho apresentam redução na biodisponibilidade de óxido nítrico, angiogênese defeituosa, inflamação e disfunção endotelial acelerada. Klotho suprime a expressão de VCAM-1 e ICAM-1 induzido por ativação do NF- $\kappa$ B (MAEKAWA *et al.*, 2009; ROUMELIOTIS *et al.*, 2020), e inibe apoptose endotelial aumentando o influxo de cálcio nestas células (ROUMELIOTIS *et al.*, 2020). Níveis diminuídos de Klotho se associam com níveis reduzidos de fluxo mediado por vasodilatação e maior espessamento camada íntima da arteríola em pacientes saudáveis (KELES *et al.*, 2015; ROUMELIOTIS *et al.*, 2020). Esse achado confirma a íntima relação do Klotho com a proteção vascular, demonstrando que com a redução dos níveis de Klotho, há perda na inibição da expressão de biomarcador de lesão endotelial (VCAM-1), com conseqüente aumento dos seus níveis.

O agravamento da DRC gera o acúmulo de toxinas nitrogenadas, principalmente o indoxil sulfato e o sulfato de p-Cresol, que estão associados a lesão endotelial (LIEW *et al.*, 2022). Estudo experimental, utilizando cultura de células demonstrou que a administração de Klotho antagoniza o desenvolvimento de injúria vascular endotelial induzido por indoxil sulfato, através da diminuição da expressão de ICAM-1 e VCAM-1 (CHEN *et al.*, 2021).

O nível de uréia foi significativamente maior em pacientes com DRC moderada/severa  $U_r = 77$  (57-110) mg/dl, quando comparado ao grupo controle  $U_r = 31$  (29 - 43) mg/dl ( $p=0,007$ ). A uréia aumenta com o agravamento da DRC e representa um parâmetro de acúmulo de toxinas nitrogenadas. Através destes achados, podemos demonstrar que no grupo DRC moderada/severa, as toxinas urêmicas (representadas pela uréia plasmática) estão em níveis mais aumentados e os níveis de Klotho mais reduzidos, aumentando os níveis de VCAM-1.

## **5.6 Correlação níveis séricos de Klotho e albuminúria em pacientes com DRC moderada/severa**

Neste estudo não foi possível demonstrar uma correlação entre os níveis séricos de Klotho e albuminúria. Baseado em estudos experimentais, era esperado que níveis mais elevados de albumina urinária fossem associados a menores níveis séricos de Klotho. Acreditamos que não conseguimos reproduzir este resultado pela amostra pequena de pacientes.

Estudo experimental em murinos demonstrou que a expressão de Klotho nos túbulos renais está diminuída em paciente com albuminúria, mesmo com função renal ainda

preservada, no estágio grau 1 da DRC, demonstrando que a albuminúria contribui para redução dos níveis séricos de Klotho. Isso ocorre, pois, a albumina é tóxica às células tubulares renais e pode resultar em morte da célula tubular ou pelo efeito indireto, causar um estresse subletal caracterizado por secreção de mediadores inflamatórios como o MCP 1 (FERNANDEZ-FERNANDEZ *et al.*, 2018).

A perda de Klotho em resposta a albuminúria associado ao impacto negativo da deficiência de Klotho na doença renal pode gerar um ciclo vicioso no qual a lesão renal resulta em baixos níveis de Klotho renal e diminuição da expressão de Klotho favorece a progressão da injúria renal (FERNANDEZ-FERNANDEZ *et al.*, 2018).

A demonstração recente que albuminúria diminui a expressão de Klotho diretamente através de mecanismos epigenéticos, sugere que a deficiência adquirida de Klotho pode ser a ligação entre a albuminúria e desfechos adversos (FERNANDEZ-FERNANDEZ *et al.*, 2020).

### **5.7 Correlação entre parâmetros de avaliação neuropsicológica e classificação da DRC**

Neste estudo foram aplicados uma bateria de oito testes neuropsicológicos que analisaram variados domínios da cognição, de maneira global, como atenção (atenção automática e seletiva), memória (verbal, auditiva, visuoespacial e de trabalho), funções executivas (controle inibitório, velocidade de processamento, flexibilidade cognitiva) e linguagem. A função executiva se refere a uma diversidade de tarefas cognitivas usadas no pensamento da ordem superior, como capacidade de planejamento, flexibilidade e resolução de problemas (MCCLINTOCK *et al.*, 2019).

Não foi possível demonstrar uma diferença estatisticamente significativa entre os valores numéricos da pontuação dos testes neuropsicológicos avaliados e a classificação da DRC. Seria esperada pior avaliação nos testes em pacientes com DRC moderada/severa em comparação com o grupo DRC leve e o grupo controle. A limitação desta avaliação pode ser justificada por nossa amostra ser constituída por apenas 52 pacientes e a maioria deles 29 pacientes com DRC leve. Sabe-se que a prevalência de distúrbio cognitivo aumenta com a piora da TFG, portanto em estágios mais avançados da DRC. A Tabela 6 evidencia os resultados dos parâmetros neuropsicológicos nos grupos avaliados nos diferentes grupos estudados.

**Tabela 6. Comparação entre parâmetros da avaliação neuropsicológica de acordo com grupos conforme estágio de doença renal crônica.**

TESTES NEUROPSICOLÓGICOS	Controle (n=12)	Doença renal Crônica		p
		Leve (n=29)	Moderada/Severa (n=11)	
<b>RAVLT</b>				
Reconhecimento (pontuação)	12 (10 - 14)	10 (7 - 14)	10 (2 - 14)	0,351
Índice de aprendizagem - (pontuação)	41 (38 - 42,5)	38 (33 - 43)	36 (31 - 45)	0,517
Índice de aprendizagem -(pontuação)	17,5 (15 - 20,5)	14 (8 - 22)	12 (7 - 17)	0,182
Índice de retenção - (pontuação)	1 (0,93 - 1,13)	1 (0,86 - 1)	1 (0,9 - 1)	0,485
Interferência proativa (pontuação)	0,8 (0,71 - 1)	1 (0,75 - 1,2)	0,75 (0,55 - 1,3)	0,543
Interferência retroativa (pontuação)	0,77 (0,7 - 0,92)	0,88 (0,67 - 1)	0,83 (0,7 - 0,91)	0,902
<b>FDT</b>				
Tempo - leitura (tempo - s)	32 (26 - 36)	31 (27 - 34)	30 (26 - 34)	0,788
Erros - leitura (erros)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0,714
Tempo - contagem (tempo - s)	32 (28 - 35)	33 (30 - 37)	32 (31 - 36)	0,744
Erros - contagem (erros)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0,131
Tempo - escolha (tempo - s)	56 (48 - 60,5)	56 (46 - 63)	49 (42 - 65)	0,698
Erros - escolha (erros)	0 (0 - 2,5)	0 (0 - 0)	1 (0 - 2)	0,059
Tempo - alternância (tempo - s)	82 (64,5 - 103,5)	85 (63 - 96)	73 (57 - 91)	0,724
Erros - alternância (erros)	3 (1 - 9)	3 (0 - 6)	1 (0 - 3)	0,246
Tempo - inibição (tempo - s)	22,5 (15,5 - 29,5)	22 (16 - 31)	17 (15 - 33)	0,815
Tempo - flexibilidade (tempo - s)	45,5 (32,5 - 68)	55 (34 - 64)	44 (34 - 60)	0,918
<b>Dígitos - ordem direita (pontuação)</b>	6,5 (5,5 - 7)	6 (5 - 7)	6 (5 - 8)	0,94
<b>Dígitos - ordem inversa (pontuação)</b>	3,5 (3 - 4)	4 (3 - 4)	3 (2 - 4)	0,644
<b>Cubos de corsi - ordem direita (pontuação)</b>	7,5 (6 - 9)	8 (7 - 9)	7 (6 - 9)	0,728
<b>Cubos de corsi - ordem inversa (pontuação)</b>	4 (3,5 - 6)	4 (4 - 6)	5 (4 - 6)	0,710
<b>Teste de STROOP</b>				
Cartão cor (tempo - s)	19,5 (18 - 26)	20 (18 - 28)	28 (21 - 63)	0,104
Cartão palavras (tempo - s)	23,5 (20 - 42,5)	27 (24 - 35)	25 (22 - 47)	0,822
Cartão interferência (tempo - s)	35,5 (28 - 42,5)	40 (32 - 53)	39 (34 - 66)	0,555
<b>Teste de Trilhas</b>				
Parte a (tempo - s)	41 (32,5 - 67,5)	39 (32 - 49)	40 (30 - 65)	0,738
Parte b (tempo - s)	138,5 (100 - 193,5)	130 (95 - 183)	163 (101 - 289)	0,622
<b>Fluência verbal Semântica (pontos)</b>	14,5 (11 - 18,5)	14 (11 - 19)	14 (8 - 21)	0,933
<b>Fluência verbal Fonêmica (pontos)</b>	20 (19 - 40,5)	27 (21 - 38)	18 (10 - 33)	0,144

Dados quantitativos expressos como média  $\pm$  desvio padrão ou como mediana e amplitude interquartil entre parênteses.

**Tabela 7. Correlação entre parâmetros da avaliação neuropsicológica com níveis de Klotho e FGF23 em pacientes com estágio moderado/severo de doença renal crônica.**

	Klotho (ng/mL)			FGF23(ng/mL)		
	n	rho	p	n	rho	p
<b>RAVLT</b>						
Reconhecimento (pontuação)	11	0,215	0,526	11	<b>-0,626*</b>	<b>0,04</b>
Índice de aprendizagem - (pontuação)	11	0,545	0,083	11	-0,464	0,151
Índice de aprendizagem - (pontuação)	11	0,501	0,116	11	0,314	0,346
Índice de retenção (pontuação)	11	-0,248	0,462	11	-0,381	0,247
Interferência proativa (pontuação)	11	0,078	0,82	11	0,421	0,197
Interferência retroativa (pontuação)	11	0,273	0,416	11	-0,087	0,800
<b>FDT</b>						
Tempo - leitura (tempo - s)	11	-0,656	0,028	11	0,182	0,592
Erros - leitura (erros)	11	-0,500	0,117	11	-0,3	0,37
Tempo - contagem (tempo - s)	11	<b>-0,753 **</b>	<b>0,007</b>	11	-0,014	0,968
Erros - contagem (erros)	11	-0,224	0,509	11	-0,149	0,662
Tempo - escolha (tempo - s)	11	<b>-0,700*</b>	<b>0,016</b>	11	-0,009	0,979
Erros - escolha (erros)	11	-0,285	0,396	11	-0,028	0,934
Tempo - alternância (tempo - s)	11	-0,656	0,945	11	0,109	0,749
Erros - alternância (erros)	11	-0,024	0,945	11	0,551	0,079
Tempo - inibição (tempo - s)	11	-0,583	0,06	11	0,014	0,968
Tempo - flexibilidade (tempo - s)	11	-0,564	0,071	11	0,145	0,67
<b>DÍGITOS</b>						
Ordem direita (pontuação)	11	0,418	0,201	11	-0,141	0,679
Ordem inversa (pontuação)	11	<b>0,655*</b>	<b>0,029</b>	11	0,373	0,259
<b>CUBOS DE CORSI</b>						
Ordem direita (pontuação)	11	<b>0,790 **</b>	<b>0,004</b>	11	0,019	0,956
Ordem inversa (pontuação)	11	<b>0,770 **</b>	<b>0,006</b>	11	-0,117	0,731
<b>TESTE STROOP</b>						
Cartão cor (tempo - s)	11	<b>-0,694*</b>	<b>0,018</b>	11	0,119	0,728
Cartão palavras (tempo - s)	11	<b>-0,725*</b>	<b>0,012</b>	11	0,239	0,48
Cartão interferência (tempo - s)	11	-0,506	0,113	11	0,424	0,194
<b>TRAIL MAKING TEST</b>						
Parte A (tempo - s)	11	<b>-0,629*</b>	<b>0,038</b>	11	0,323	0,332
Parte B (tempo - s)	11	<b>-0,782 **</b>	<b>0,004</b>	11	-0,036	0,915
<b>FLUÊNCIA VERBAL</b>						
Semântica - animais (tempo - s)	11	0,461	0,153	11	-0,132	0,698
Fonêmica - letras (tempo - s)	11	0,515	0,105	11	0,005	0,989

\* p <0,005, \*\* p <0,001

## 5.8 Correlação entre níveis séricos de Klotho e Teste Neuropsicológicos em pacientes com DRC moderada/severa

O principal resultado deste trabalho foi evidenciar pela primeira vez, em pacientes com DRC, fora do tratamento dialítico, a associação da redução de Klotho sérico a desfechos negativos em uma série de testes neuropsicológicos, descritos a seguir. Um único estudo, publicado em 2019, analisou 88 pacientes com DRC em hemodiálise, com e sem doença cerebrovascular, e evidenciou associação do nível sérico de Klotho com doença cerebrovascular através de testes neuropsicológicos (WEI *et al.*, 2019). A inovação do nosso estudo foi a associação do Klotho sérico com déficit cognitivo em pacientes com DRC não dialítica, e sem doença cerebrovascular conhecida.

### 5.8.1 Teste dos Cinco dígitos-FDT (*Five Digit Test*)

Em pacientes com DRC moderada/severa foi constatado na Tabela 7 ilustrada acima, utilizando a correlação de *Spearman*, que níveis de Klotho sérico se correlacionam inversamente a pontuação do tempo (em segundos) na avaliação da Contagem no Teste dos Cinco Dígitos ( $\rho = -0,753$ ,  $p = 0,007$ ) no FDT. Esta parte do teste está relacionada a domínios cognitivos como a “atenção automática” (CAMPOS *et al.*, 2016) e a “velocidade de processamento” (CAMPOS *et al.*, 2016). Isso significa que os pacientes demoraram mais tempo na resposta, maior tempo de execução. Quanto maior o tempo utilizado para conclusão da tarefa solicitada, pior o resultado.

Foi evidenciado também correlação inversamente proporcional à pontuação do tempo (em segundos) na parte da Escolha no FDT ( $\rho = -0,7$ ,  $p = 0,016$ ). Esta parte do exame destina-se à avaliação da atenção controlada e atenção executiva (CAMPOS *et al.*, 2016).

Estes resultados bastante relevantes mostram um pior desempenho destes pacientes com DRC moderada/severa nestas duas etapas do FDT: Contagem e Escolha, demonstrando alteração de três funções cognitivas: atenção, velocidade de processamento e funções executivas (controle inibitório e flexibilidade cognitiva).

### 5.8.2 Tarefa de Alcance de Dígitos Ordem Inversa

Em pacientes com DRC moderada/severa foi constatado, utilizando a correlação de *Spearman*, que níveis de Klotho sérico se correlacionam linearmente a pontuação da Tarefa de Alcance de Dígitos Ordem Inversa ( $\rho= 0,655$ ,  $p=0,007$ ). Neste teste, na avaliação da ordem inversa, o participante repetirá a sequência dos números em sentido contrário ao que o avaliador apresentou. Ou seja, quanto maior a pontuação indica melhor resposta ao teste, pois o paciente recobrou o maior número de dígitos. Estes dados indicam que quanto menor os níveis de Klotho, pior foram os resultados, menor pontuação neste teste.

A tarefa de alcance de dígitos tem o objetivo de investigar a memória de curto prazo relacionada à memória operacional/trabalho auditiva, avaliando a capacidade do indivíduo de repetição e propensão de recordação imediata (WECHSLER, 1896). Este achado, da redução dos níveis séricos de Klotho com resultado desfavorável neste teste, correlaciona diminuição do Klotho com um novo domínio cognitivo, memória auditiva.

### 5.8.3 Tarefa de Cubos de Corsi Ordens Direta e Inversa

Em pacientes com DRC moderada/severa foi constatado, utilizando a correlação de *Spearman*, que níveis de Klotho sérico se correlacionam positivamente, de forma linear, a pontuação nas duas categorias da Tarefa de Cubos de Corsi Ordem Direta ( $\rho= 0,79$ ,  $p=0,004$ ) e Ordem Inversa ( $\rho= 0,77$ ,  $p=0,006$ ).

A primeira etapa do teste acontece na Ordem Direta e após o examinador apresentar a sequência tocando nos blocos (cubos), o avaliando tocará eles seguindo a mesma ordem. Na etapa referente à Ordem Inversa, o indivíduo realiza a tarefa no “sentido contrário” apresentado pelo avaliador (KESSELS *et al.*, 2000).

Neste exame, pacientes que tiveram níveis menores de Klotho tiveram os piores resultados no teste. Este teste avalia a memória visuoespacial, avalia um domínio cognitivo não avaliado anteriormente, demonstrando que os níveis Klotho reduzidos na DRC moderada/severa foi associado a piores desfechos neste domínio cognitivo.

#### 5.8.4 Teste Stroop Victoria (Versão Adaptada)

Em pacientes com DRC moderada/severa foi constatado, utilizando a correlação de *Spearman*, que níveis de Klotho sérico se correlacionam inversamente a pontuação do tempo (em segundos) no teste *Stroop Victoria* na avaliação cartão 1- cor ( $\rho = -0,694$ ,  $p = 0,018$ ) e no cartão 2-palavras ( $\rho = -0,725$ ,  $p = 0,012$ ).

O instrumento é composto por três diferentes cartões (1 – cor, 2 – palavras e 3 – interferência), os quais são apresentados separadamente ao indivíduo. O avaliando é orientado a nomear as cores de cada cartão o mais rápido que puder e o tempo é registrado em segundos. O registro do tempo de execução da tarefa é feito separadamente (SILVA *et al.*, 2017, p. 163-166; CAMPANHOLO, 2018, p. 90-92).

Neste estudo, evidenciamos que pacientes com DRC moderada/severa executam esta tarefa gastando maior tempo em segundos(s), resposta mais tardia. O *Stroop* teste avalia atenção seletiva, velocidade de processamento e flexibilidade cognitiva (HOWIESON *et al.*, 2004, p. 365-367). Este teste reproduz novamente o que foi evidenciado no FDT, ambos testam domínios de atenção e flexibilidade cognitiva.

#### 5.8.5 Teste de Trilhas-Trail Making Test (TMT) - Partes A e B

Em pacientes com DRC moderada/severa foi constatado, utilizando a correlação de *Spearman*, que níveis de Klotho sérico se correlacionam inversamente a pontuação do teste medida em tempo (segundos) no *Trail Making Test* (TMT) - Partes A e B na avaliação cartão 1- cor ( $\rho = -0,694$ ,  $p = 0,018$ ). e no cartão 2-palavras ( $\rho = -0,725$ ,  $p = 0,012$ ).

O *Trail Making Test* (TMT) avalia atenção (seletiva e alternada), velocidade de processamento e flexibilidade cognitiva (TOUMBAUGH, 2004; SALVADOR *et al.*, 2017, p. 175; CAMPANHOLO *et al.*, 2018, p. 94).

Esses resultados sugerem que níveis de Klotho plasmático diminuídos foram associados ao pior resultado no resultado dos testes psicológicos em pacientes com DRC moderada/severa. Dentre um total de os oito testes neuropsicológicos avaliados nestes pacientes, conseguimos evidenciar que em mais de um teste avaliado o pior resultado nos testes foi associado a níveis reduzidos de Klotho sérico. Os testes foram: Teste dos Cinco Dígitos, Tarefa de Alcance de Dígitos Ordem, Teste de Trilhas, Stroop, e Cubos de Corsi. Cada teste propõe avaliar uma ou mais função cognitiva. A redução dos níveis séricos de Klotho foi associada a alteração em vários domínios da cognição como atenção automática,

memória auditiva e visuoespacial, flexibilidade cognitiva, velocidade de processamento e controle inibitório.

Na Tabela 8, ilustrada abaixo, classificamos todos os pacientes com base nos resultados dos testes neuropsicológicos utilizando padronização dos instrumentos através do Z score, percentil e desvio padrão. Os resultados brutos foram convertidos em dois níveis de desempenho diferentes, após padronização para idade e escolaridade, como DÉFICIT ou NÃO DÉFICIT em cada teste neuropsicológico avaliado.

Confirmamos através desta classificação em categorias, que pacientes com resultado deficitário em dois instrumentos avaliados (RAVLT e FDT), tinham níveis séricos de Klotho menores. E os níveis mais elevados de Klotho foram associados à normalidade no exame, ou seja, classificado como NÃO DÉFICIT. Estes achados foram estatisticamente significantes, nos seguintes exames: RAVLT (Índice de Aprendizagem) ( $p=0,027$ ), no FDT (Contagem) ( $p=0,001$ ), no FDT (Escolha) ( $p=0,013$ ), no FDT (Alternância) ( $p=0,004$ ), no FDT (Inibição) ( $p=0,005$ ). Demonstramos que redução do Klotho está associado a pior resultado nos seguintes domínios cognitivos testados: memória verbal, atenção, controle inibitório e flexibilidade cognitiva. Desta forma, pudemos mais uma vez confirmar que níveis séricos de Klotho reduzidos foram associados a piores resultados, mesmo quando incluímos todos os grupos de pacientes estudados. Importante salientar que estes resultados foram padronizados por idade, sexo e escolaridade, orientados pela padronização de cada teste.

**Tabela 8. Associação entre níveis de Klotho com a classificação dos aspectos neuropsicológicos nos grupos estudados.**

	Klotho (ng/mL)		
	n	mediana (AIQ)	p
<b>RAVLT- RECONHECIMENTO</b>			0,074
Déficit	18	0,18 (0,15 - 0,28)	
Não déficit	34	1,29 (0,19 - 1,88)	
<b>RAVLT- INDICE DE APRENDIZAGEM</b>			<b>0,027 *</b>
Déficit	29	0,19 (0,15 - 0,88)	
Não déficit	23	1,54 (0,2 - 2,22)	
<b>RAVLT- INDICE DE APRENDIZAGEM</b>			0,975
Déficit	18	0,21 (0,17 - 1,92)	
Não déficit	34	0,28 (0,18 - 1,66)	
<b>RAVLT -INDICE DE RETENÇÃO</b>			0,52
Déficit	12	0,2 (0,18 - 0,43)	
Não déficit	40	0,33 (0,17 - 1,79)	
<b>RAVLT-INTERFERÊNCIA PROATIVA</b>			0,619
Déficit	10	0,21 (0,17 - 1,53)	
Não déficit	42	0,3 (0,17 - 1,88)	
<b>RAVLT- INTERFERÊNCIA RETROATIVA</b>			0,842
Déficit	14	0,22 (0,15 - 2,1)	
Não déficit	38	0,21 (0,18 - 1,66)	
<b>FDT – LEITURA (TEMPO)</b>			0,445
Déficit	38	0,21 (0,17 - 1,56)	
Não déficit	14	0,66 (0,18 - 2,18)	
<b>FDT – LEITURA (ERROS)</b>			0,323
Déficit	3	0,13 (0,13 - 1,74)	
Não déficit	49	0,22 (0,18 - 1,84)	
<b>FDT – CONTAGEM (TEMPO)</b>			<b>0,001 **</b>
Déficit	32	0,19 (0,15 - 0,43)	
Não déficit	20	1,74 (0,2 - 2,27)	
<b>FDT – CONTAGEM (ERROS)</b>			0,217
Déficit	3	0,17 (0,1 - 0,38)	
Não déficit	49	0,22 (0,18 - 1,84)	
<b>FDT – ESCOLHA (TEMPO)</b>			<b>0,013 *</b>
Déficit	36	0,21 (0,15 - 1,53)	
Não déficit	16	1,59 (0,19 - 2,22)	

<b>FDT – ESCOLHA (ERROS)</b>			0,965
Déficit	14	0,22 (0,17 - 1,74)	
Não déficit	38	0,21 (0,18 - 1,59)	
<b>FDT – ALTERNÂNCIA (TEMPO)</b>			<b>0,004 **</b>
Déficit	38	0,2 (0,15 - 1,49)	
Não déficit	14	1,78 (0,21 - 3,18)	
<b>FDT – ALTERNÂNCIA (ERROS)</b>			0,509
Déficit	26	0,21 (0,19 - 1,83)	
Não déficit	26	0,3 (0,17 - 1,59)	
<b>FDT – INIBIÇÃO (TEMPO)</b>			<b>0,005 **</b>
Déficit	27	0,19 (0,13 - 1,46)	
Não déficit	25	1,09 (0,19 - 2,23)	
<b>FDT – FLEXIBILIDADE (TEMPO)</b>			0,095
Déficit	35	0,21 (0,15 - 1,53)	
Não déficit	17	1,53 (0,18 - 2,22)	
<b>Dígitos - Ordem direta</b>			0,493
Déficit	38	0,38 (0,18 - 1,84)	
Não déficit	14	0,21 (0,17 - 1,46)	
<b>Dígitos - Ordem inversa</b>			0,4
Déficit	36	0,4 (0,18 - 1,84)	
Não déficit	16	0,2 (0,16 - 1,61)	
<b>Cubos de CORSI - Ordem Direita</b>			0,241
Déficit	36	0,54 (0,18 - 1,92)	
Não déficit	16	0,2 (0,13 - 0,75)	
<b>Cubos de CORSI - Ordem inversa</b>			0,282
Déficit	17	0,66 (0,18 - 1,96)	
Não déficit	35	0,21 (0,17 - 1,53)	
<b>Teste Stroop - CARTÃO COR</b>			0,69
Déficit	14	0,21 (0,18 - 1,46)	
Não déficit	38	0,22 (0,17 - 1,84)	
<b>Teste Stroop - CARTÃO PALAVRAS</b>			0,337
Déficit	11	0,66 (0,18 - 1,96)	
Não déficit	41	0,21 (0,17 - 1,66)	
<b>Teste Stroop- CARTÃO INTERFERÊNCIA</b>			0,616
Déficit	20	0,36 (0,16 - 1,9)	
Não déficit	32	0,21 (0,18 - 1,53)	
<b>Trail Making Test - PARTE A</b>			0,816
Déficit	34	0,21 (0,17 - 1,83)	
Não déficit	18	0,75 (0,17 - 1,66)	
<b>Trail Making Test - PARTE B</b>			0,803

Déficit	12	0,43 (0,18 - 1,78)	
Não déficit	40	0,21 (0,17 - 1,74)	
<b>Fluência Verbal Semântica</b>			0,899
Déficit	22	0,25 (0,15 - 1,96)	
Não déficit	30	0,21 (0,18 - 1,61)	
<b>Fluência Verbal Fonêmica -</b>			0,959
Déficit	18	0,21 (0,18 - 1,84)	
Não déficit	34	0,22 (0,17 - 1,66)	

\* p <0,005, \*\* p <0,001

### 5.9 Correlação entre níveis séricos de FGF23 e RAVLT em pacientes com DRC moderada/severa

A dosagem sérica de FGF23 aumentada teve correlação inversa à pontuação do resultado do reconhecimento no teste RAVLT (Tabela 7). Ou seja, quanto maior os níveis de FGF23 menor a pontuação no teste. Este teste é um instrumento de avaliação de Memória, dispõe de uma lista de 15 palavras lidas, e posteriormente o paciente tem que recobrar as palavras que foram ditas. Portanto, pontuação menor, significa pior memória.

Neste estudo conseguimos evidenciar, uma correlação inversamente proporcional dos níveis de FGF 23 séricos e a TFG, que seria o esperado, pois os níveis de FGF23 aumentam com a progressão da DRC para estágios mais avançados. Este dado nos mostra o aumento do FG 23 com pior resultado neste domínio avaliado pelo RAVLT.

Ambos, a diminuição da proteína Klotho e o aumento do FGF23, mostrou correlação com pior resultado nos testes neuropsicológicos realizados. Sabe-se que desregulação no eixo Klotho-FGF23 está associado a piores desfechos no paciente com DRC. Neste estudo, a proteína Klotho foi um preditor de déficit cognitivo mais evidente que o FGF23 já que este resultado foi reproduzido em mais de um teste neurocognitivo, e em mais de um domínio avaliado. O declínio dos níveis séricos de Klotho em adultos com DRC leve (estágio 2) precede a elevação de FGF23, PTH, e fósforo, e por isso representa um possível biomarcador para DRC e mais precocemente prever suas morbidades, como por exemplo, o déficit cognitivo.

## **6 Correlação entre níveis séricos de VCAM-1 e Angiopietina 2 e Testes Neuropsicológicos em pacientes com DRC moderada/severa.**

Outro achado muito relevante deste estudo foi a que a elevação de níveis de VCAM-1 foi associada a pior resultados nos testes neurocognitivos e isso se reproduziu em mais de um exame neuropsicológico, mostrando associação significativa em mais de um domínio da cognição. A Tabela 9 evidencia essa correlação.

Um estudo anterior já demonstrava o aumento dos níveis de VCAM-1, e outros biomarcadores de lesão endotelial aumentados em pacientes com DRC não dialítica (estágios 3-5) (PADBERG *et al.*, 2014). Outro estudo evidenciou aumento de marcadores endoteliais em pacientes dialíticos e associação com déficit cognitivo estimado através do teste CAMCOG-*Cambridge Cognitive Examination*, versão adaptada para o português do CAMDEX -*Cambridge Cognitive Examination Test of the Elderly*. Neste estudo, os níveis de VCAM-1 não haviam demonstrado associação com déficit cognitivo, apenas a Angiopietina 2 e o Syndecan-1 (MEDEIROS *et al.*, 2020). Vale salientar que nosso estudo foi além, e avaliou pacientes não dialíticos utilizando uma bateria maior de testes neurocognitivos validados mundialmente e aplicados por uma profissional habilitada. O CAMCOG não parece ser um teste adequado para a população brasileira. Neste estudo, não conseguimos evidenciar associação de Angiopietina 2 e pior resultado nos testes neurocognitivos.

Houve uma associação dos níveis séricos de VCAM-1 em quase todos os testes neuropsicológicos avaliados, RAVLT, FDT, Cubos de Corsi, Teste de Stroop, Teste de Trilhas e Fluência Verbal Semântica, exceto no Teste dos Dígitos. Esse estudo evidencia de forma robusta a associação de aumento de VCAM-1, com pior resultado em vários domínios de cognição como atenção, memória, funções executivas e linguagem.

Os achados desse estudo fortalecem a hipótese da doença cerebrovascular como uma etiologia muito relevante no distúrbio cognitivo em pacientes com DRC moderada/severa (TFG < 45 mL/min/ 1,73m<sup>2</sup>) não dialíticos, pois conseguimos demonstrar que este marcador de lesão endotelial aumentado está associado a piores resultados nos testes cognitivos, dado que tinha apenas sido evidenciado previamente em pacientes em hemodiálise. Esse dado corre em paralelo com a redução dos níveis de Klotho sérico, que tem um papel importante na proteção contra danos vasculares, demonstrando que níveis diminuídos de Klotho foram associados a aumento dos níveis de VCAM-1 e ambos se correlacionaram a piores resultados na avaliação cognitiva.

**Tabela 9. Correlação entre parâmetros da avaliação neuropsicológica com níveis séricos de VCAM-1 e Angiopietina 2 em pacientes com estágio moderado/severo de doença renal crônica.**

	VCAM-1			Angiopietina 2		
	n	rho	p	n	rho	p
Albuminúria (mg/g)	10	-0,176	0,627	10	-0,2	0,58
TFG (mL/min/1,73 m2)	11	-0,155	0,65	11	-0,6	0,051
<b>RAVLT</b>						
Reconhecimento (pontuação)	11	-0,379	0,25	11	-0,47	0,144
Índice de aprendizagem - (pontuação)	11	<b>-,664*</b>	<b>0,026</b>	11	-0,255	0,45
Índice de aprendizagem - (pontuação)	11	-0,2	0,555	11	0,141	0,679
Índice de retenção - (pontuação)	11	0,038	0,911	11	0,133	0,696
Interferência proativa (pontuação)	11	-0,009	0,979	11	0,238	0,481
Interferência retroativa (pontuação)	11	-0,478	0,137	11	-0,228	0,501
<b>FDT</b>						
Tempo - leitura (tempo - s)	11	<b>,743**</b>	<b>0,009</b>	11	0,064	0,852
Erros - leitura (erros)	11	0,4	0,223	11	-0,1	0,77
Tempo - contagem (tempo - s)	11	<b>,730*</b>	<b>0,011</b>	11	-0,065	0,85
Erros - contagem (erros)	11	0,522	0,1	11	0,522	0,1
Tempo - escolha (tempo - s)	11	<b>,755**</b>	<b>0,007</b>	11	-0,082	0,811
Erros - escolha (erros)	11	0,142	0,676	11	0,199	0,557
Tempo - alternância (tempo - s)	11	<b>,756**</b>	<b>0,007</b>	11	0,096	0,78
Erros - alternância (erros)	11	0,283	0,4	11	0,344	0,301
Tempo - inibição (tempo - s)	11	<b>,720*</b>	<b>0,013</b>	11	0,1	0,769
Tempo - flexibilidade (tempo - s)	11	<b>,645*</b>	<b>0,032</b>	11	0,227	0,502
<b>DÍGITOS</b>						
Ordem direita (pontuação)	11	0,127	0,71	11	0,094	0,784
Ordem inversa (pontuação)	11	-0,119	0,726	11	0,511	0,108
<b>CUBOS DE CORSI</b>						
Cubos de corsi - ordem direita (pontuação)	11	<b>-,729*</b>	<b>0,011</b>	11	0,033	0,924
Cubos de corsi - ordem inversa (pontuação)	11	<b>-,639*</b>	<b>0,034</b>	11	-0,277	0,409
<b>TESTE STROOP</b>						
Cartão cor (tempo - s)	11	<b>,795**</b>	<b>0,003</b>	11	0,183	0,591
Cartão palavras (tempo - s)	11	<b>,789**</b>	<b>0,004</b>	11	0,193	0,57
Cartão interferência (tempo - s)	11	<b>,733*</b>	<b>0,01</b>	11	0,433	0,184
<b>TRAIL MAKING TEST</b>						
Parte A (tempo - s)	11	<b>,724*</b>	<b>0,012</b>	11	0,415	0,205
Parte B (tempo - s)	11	0,509	0,11	11	-0,091	0,79
<b>FLUÊNCIA VERBAL</b>						
Semântica - animais (tempo - s)	11	<b>-,667*</b>	<b>0,025</b>	11	-0,174	0,61
Fonêmica- letras (tempo - s)	11	-0,351	0,29	11	0,337	0,311

\* p <0,005, \*\* p <0,001.

## 7 CONCLUSÃO

Neste estudo realizado em pacientes com DRC não dialítica em acompanhamento ambulatorial, sem diagnóstico clínico de doença cerebrovascular, conseguimos demonstrar diminuição dos níveis séricos de Klotho e elevação dos marcadores de lesão endotelial VCAM-1 e Angiopietina 2 em pacientes com DRC quando comparado ao grupo controle. Foi evidenciado uma correlação inversa entre os níveis diminuídos de Klotho e aumento do marcador de lesão endotelial VCAM-1 nos pacientes DRC moderada/severa. Esta correlação não foi evidenciada entre os níveis séricos de Klotho e os outros marcadores de lesão endotelial, Angiopietina 2 e albuminúria.

Outro achado relevante deste estudo foi que níveis séricos reduzidos de Klotho estão associados a piores resultados em diferentes testes neurocognitivos em pacientes com DRC sem diagnóstico clínico prévio de doença cerebrovascular, sendo evidenciado pior resultado de domínios cognitivos distintos como memória, atenção e funções executivas.

Níveis séricos de VCAM-1 aumentados também estão associados a pior resultado nos testes neurocognitivos e essa correlação não foi encontrada com a Angiopietina 2. Este achado de diminuição dos níveis séricos de Klotho, aumento do VCAM-1 e déficit cognitivo em pacientes com DRC moderada/severa fortalece a hipótese de lesão endotelial e consequente doença vascular como um fator importante na fisiopatologia do déficit cognitivo em pacientes com DRC.

Esta pesquisa sugere o papel a proteína Klotho como um possível marcador precoce de déficit cognitivo em pacientes com DRC não dialítica sem diagnóstico clínico prévio de doença cerebrovascular, além de reforçar, seu papel na neuroproteção. Serão necessários novos estudos para confirmar estes dados, reproduzir estes resultados em um número maior de pacientes e ampliar os estudos clínicos para investigar a aplicabilidade clínica da proteína Klotho como alvo terapêutico no déficit cognitivo em pacientes com doença renal crônica.

## REFERÊNCIAS

ABRAMOVITZ, L.; RUBINEK, T.; LIGUMSKY, H.; *et al.* KL1 Internal Repeat Mediates Klotho Tumor Suppressor Activities and Inhibits bFGF and IGF-I Signaling in Pancreatic Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 13, p. 4254–4266, 2011.

AGGANIS, B.T.; WEINER, D.E.; GIANG, L.M.; *et al.* Depression and Cognitive Function in Maintenance Hemodialysis Patients. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 56, n. 4, p. 704–712, 2010.

AKOUDAD, S.; SEDAGHAT, S.; HOFMAN, A.; *et al.* Kidney Function and Cerebral Small Vessel Disease in the General Population. **International Journal of Stroke**, v. 10, n. 4, p. 603–608, 2015.

ALMEIDA, O.P. Miniexame do estado mental e o diagnóstico de demência no Brasil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 56, n. 3B, p. 605–612, 1998.

BARKER, S.L.; PASTOR, J.; CARRANZA, D.; *et al.* The demonstration of  $\alpha$ Klotho deficiency in human chronic kidney disease with a novel synthetic antibody. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 30, n. 2, p. 223–233, 2014.

BARZILAY, J.I.; FITZPATRICK, A.L.; LUCHSINGER, J.; *et al.* Albuminuria and Dementia in the Elderly: A Community Study. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 52, n. 2, p. 216–226, 2008.

BARZILAY, J.I. Albuminuria and Decline in Cognitive Function The ONTARGET/TRANSCEND Studies Albuminuria and Decline in Cognitive Function. **Archives of Internal Medicine**, v. 171, n. 2, p. 142, 2011.

BENZING, T.; SALANT, D. Insights into Glomerular Filtration and Albuminuria. **New England Journal of Medicine**, v. 384, n. 15, p. 1437–1446, 2021.

BERGER, I.; WU, S.; MASSON, P.; *et al.* Cognition in chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. **BMC Medicine**, v. 14, n. 1, 2016.

BIKBOV, B.; SOLER, M. J.; PEŠIĆ, V.; *et al.* Albuminuria as a risk factor for mild cognitive

impairment and dementia—what is the evidence? **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 37, n. Supplement\_2, p. 55–62, 2021.

BHANDARI S.; MEHTA, S.; KHWAJA, A.; CLELAND, J.G.F.; IVES, N.; BRETTELL, E.; CHADBURN, M.; COCKWELL, P.; STOP ACEi Trial Investigators. Renin-Angiotensin System Inhibition in Advanced Chronic Kidney Disease. **N Engl J Med**. 2022 Dec 1;387(22):2021-2032.

BRUCKI, S.M.D.; MALHEIROS, S.M.F.; OKAMOTO, I.H.; BERTOLUCCI, P.H. Dados normativos para o teste de fluência verbal categoria animais em nosso meio. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, 55, 56-61. 1997.

CARARO-LOPES, M.M.; MAZUCANTI, C.H.Y.; SCAVONE, C.; *et al.* The relevance of  $\alpha$ -KLOTHO to the central nervous system: Some key questions. **Ageing Research Reviews**, v. 36, p. 137–148, 2017.

CHANG, C.-Y.; LIN, C.-C.; TSAI, C.-F.; *et al.* Cognitive impairment and hippocampal atrophy in chronic kidney disease. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 136, n. 5, p. 477–485, 2017.

CHANG, Fan-Chi; LAI, Tai-Shuan; CHIANG, Chih-Kang; *et al.* Angiotensin-2 Is Associated with Albuminuria and Microinflammation in Chronic Kidney Disease. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. e54668, 2013.

CHEN, Cheng *et al.* The role of AMP-activated protein kinase  $\alpha$ 1-mediated endoplasmic reticulum stress in alleviating the toxic effect of uremic toxin indoxyl sulfate on vascular endothelial cells by Klotho. **Journal of Applied Toxicology**, v. 41, n. 9, p. 1446–1455, 17 jan. 2021.

CHENG, M.F.; CHEN, L.J.; NIU, H.S.; YANG, T.T.; LIN, K.C.; CHENG, J.T. Signals mediating Klotho-induced neuroprotection in hippocampal neuronal cells. **Acta Neurobiol Exp (Wars)**, 75(1), 60-71. 2015.

CITTERIO, L.; DELLI CARPINI, S.; LUPOLI, S.; *et al.* Klotho Gene in Human Salt-

Sensitive Hypertension. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 15, n. 3, p. 375–383, 2020.

DEGASPARI, S.; TZANNO-MARTINS, C.B.; FUJIHARA, C.K.; *et al.* Altered KLOTHO and NF- $\kappa$ B-TNF- $\alpha$  Signaling Are Correlated with Nephrectomy-Induced Cognitive Impairment in Rats. **PLOS ONE**, v. 10, n. 5, p. e0125271, 2015.

DOI, S.; ZOU, Y.; TOGAO, O.; *et al.* Klotho Inhibits Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) Signaling and Suppresses Renal Fibrosis and Cancer Metastasis in Mice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 10, p. 8655–8665, 2011.

DREW, David A.; KATZ, Ronit; KRITCHEVSKY, Stephen; *et al.* Association between Soluble Klotho and Change in Kidney Function: The Health Aging and Body Composition Study. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 28, n. 6, p. 1859–1866, 2017.

DREW, D.A.; WEINER, D.E.; SARNAK, M.J. Cognitive Impairment in CKD: Pathophysiology, Management, and Prevention. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 74, n. 6, p. 782–790, 2019.

DUBAL, D.B.; ZHU, L.; SANCHEZ, P.E.; *et al.* Life Extension Factor Klotho Prevents Mortality and Enhances Cognition in hAPP Transgenic Mice. **The Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 6, p. 2358–2371, 2015.

DUBAL, D.B.; YOKOYAMA, J.S.; ZHU, L.; *et al.* Life Extension Factor Klotho Enhances Cognition. **Cell Reports**, v. 7, n. 4, p. 1065–1076, 2014.

EKNOYAN, G.; LAMEIRE, N. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. **Kidney International Supplements**, v. 3, n. 1, p. 5–14, 2013.

ELIAS, M.F.; ELIAS, P.K.; SELIGER, S.L.; *et al.* Chronic kidney disease, creatinine and cognitive functioning. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 24, n. 8, p. 2446–2452, 2009.

EPSTEIN, M.; FREUNDLICH, M. The intersection of mineralocorticoid receptor activation and the FGF23–Klotho cascade: a duopoly that promotes renal and cardiovascular injury. **Nephrology Analysis Transplantation**, v. 37, n. 2, p. 211–221, 30 ago. 2021.

ETGEN, T.; SANDER, D.; BICKEL, H.; *et al.* Vitamin D Deficiency, Cognitive Impairment and Dementia: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Dementia and Geriatric Cognitive Disorders**, v. 33, n. 5, p. 297–305, 2012.

FERNANDEZ-FERNANDEZ, B.; IZQUIERDO, M.C.; VALIÑO-RIVAS, L.; *et al.* Albumin downregulates Klotho in tubular cells. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 33, n. 10, p. 1712–1722, 2018.

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, B.; VALIÑO-RIVAS, L.; SÁNCHEZ-NIÑO, Maria D.; *et al.* Albuminuria Downregulation of the Anti-Aging Factor Klotho: The Missing Link Potentially Explaining the Association of Pathological Albuminuria with Premature Death. **Advances in Therapy**, v. 37, n. S2, p. 62–72, 2020.

FORSTER, R.E.; JURUTKA, P. W.; HSIEH, J-C.; *et al.* Vitamin D receptor controls expression of the anti-aging klotho gene in mouse and human renal cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 414, n. 3, p. 557–562, 2011.

FUJIHARA, C.K.; VELHO, M.; MALHEIROS, D.M.C.; *et al.* An extremely high dose of losartan affords superior renoprotection in the remnant model. **Kidney International**, v. 67, n. 5, p. 1913–1924, 2005.

FUNG, T.; IYASWAMY, A.; SREENIVASMURTHY, S.; *et al.* Klotho an Autophagy Stimulator as a Potential Therapeutic Target for Alzheimer’s Disease: A Review. **Biomedicines**, v. 10, n. 3, p. 705, 2022.

GALITZER, H.; BEN-DOV, I.Z.; SILVER, J. *et al.* Parathyroid cell resistance to fibroblast growth factor 23 in secondary hyperparathyroidism of chronic kidney disease. **Kidney International**, v. 77, n. 3, p. 211–218, 2010.

GAO, D.; ZUO, Z.; TIAN, J.; *et al.* Activation of SIRT1 Attenuates Klotho Deficiency–Induced Arterial Stiffness and Hypertension by Enhancing AMP-Activated Protein Kinase Activity. **Hypertension**, v. 68, n. 5, p. 1191–1199, 2016.

GIUNTA, B.; FERNANDEZ, F.; NIKOLIC, W.V; *et al.* Inflammaging as a prodrome to Alzheimer's disease. **Journal of Neuroinflammation**, v. 5, n. 1, p. 51, 2008.

GO, A.S.; CHERTOW, G.M.; FAN, D.; *et al.* Chronic kidney disease and the Risks of Death, Cardiovascular Events, and Hospitalization. **New England Journal of Medicine**, v. 351, n. 13, p. 1296–1305, 2004.

GRANGE, C.; PAPADIMITRIOU, E.; DIMUCCIO, V.; *et al.* Urinary Extracellular Vesicles Carrying Klotho Improve the Recovery of Renal Function in an Acute Tubular Injury Model. **Molecular Therapy**, v. 28, n. 2, p. 490–502, 2020.

GUAN, X.; NIE, L.; HE, T.; *et al.* Klotho suppresses renal tubulo-interstitial fibrosis by controlling basic fibroblast growth factor-2 signalling. **The Journal of Pathology**, v. 234, n. 4, p. 560–572, 2014.

HAGE, V.; VILLAIN, C.; PELLETIER, S.; *et al.* Bicarbonate Supplement Restores Urinary Klotho Excretion in Chronic Kidney Disease: A Pilot Study. **Journal of Renal Nutrition**, v. 29, n. 4, p. 285–288, 2019.

HARUNA, Y.; KASHIHARA, N.; SATOH, M.; *et al.* Amelioration of progressive renal injury by genetic manipulation of *Klotho* gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 7, p. 2331–2336, 2007.

HOWIESON, D. B., LEZAK, M. D., & LORING, D. W. Orientation and attention. Neuropsychological assessment, 365-367. 2004.

HSIEH, C-C; KURO-O, M.; ROSENBLATT, K.P; *et al.* The ASK1-Signalosome regulates p38 MAPK activity in response to levels of endogenous oxidative stress in the Klotho mouse models of aging. **Aging**, v. 2, n. 9, p. 597–611, 2010.

HU, M.C.; SHI, M.; ZHANG, J.; *et al.* Klotho deficiency is an early biomarker of renal ischemia–reperfusion injury and its replacement is protective. **Kidney International**, v. 78, n. 12, p. 1240–1251, 2010.

HU, M.C.; SHI, M.; ZHANG, J.; *et al.* Klotho Deficiency Causes Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 22, n. 1, p.

124–136, 2011.

HU, M.C.; SHI, M.; CHO, H.J.; *et al.* Klotho and Phosphate Are Modulators of Pathologic Uremic Cardiac Remodeling. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 26, n. 6, p. 1290–1302, 2015.

HU, M.C.; SHI, M.; ZHANG, J.; *et al.* Renal Production, Uptake, and Handling of Circulating  $\alpha$ Klotho. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 27, n. 1, p. 79–90, 2016.

IMURA, A.; IWANO, A.; TOHYAMA, O.; *et al.* Secreted Klotho protein in sera and CSF: implication for post-translational cleavage in release of Klotho protein from cell membrane. **FEBS Letters**, v. 565, n. 1-3, p. 143–147, 2004.

JONES, D.J.W.; BUTLER, L.T.; HARRIS, J.P.; *et al.* Latent learning in End Stage Renal Disease (ESRD). **Physiology & Behavior**, v. 142, p. 42–47, 2015.

JONES, D.J.W.; HARRIS, J.P.; VAUX, E.; *et al.* The nature of impairments of memory in patients with end-stage renal disease (ESRD). **Physiology & Behavior**, v. 147, p. 324–333, 2015.

JOOSTEN, H.; IZAKS, G.J.; SLAETS, J.P.J.; *et al.* Association of Cognitive Function with Albuminuria and eGFR in the General Population. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 6, n. 6, p. 1400–1409, 2011.

KELES, N.; CALISKAN, M.; DOGAN, B.; *et al.* Low Serum Level of Klotho Is an Early Predictor of Atherosclerosis. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 237, n. 1, p. 17–23, 2015.

KIM, H.R.; NAM, B.Y.; KIM, D.W.; *et al.* Circulating  $\alpha$ -Klotho Levels in CKD and Relationship to Progression. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 61, n. 6, p. 899–909, 2013.

KOH, N.; FUJIMORI, T.; NISHIGUCHI, S.; *et al.* Severely Reduced Production of Klotho in Human Chronic Renal Failure Kidney. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 280, n. 4, p. 1015–1020, 2001.

KURO-O, M.; MATSUMURA, Y.; AIZAWA, H.; *et al.* Mutation of the mouse Klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. **Nature**, v. 390, n. 6655, p. 45–51, 1997.

KURO-O, M. The Klotho proteins in health and disease. **Nature Reviews Nephrology**, v. 15, n. 1, p. 27–44, 2018.

KURO-O, M. Klotho and endocrine fibroblast growth factors: markers of chronic kidney disease progression and cardiovascular complications? **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 34, n. 1, p. 15–21, 2018.

KURO-O, M. **The klotho proteins in health and disease**. Nature – Nephrology, Vol 15, January 2019, pp 27-41.

KURO-O, M. Aging and FGF23-klotho system. **Vitamins and Hormones**, p. 317–332, 2021.

KUROSU, H.; OGAWA, Y.; MIYOSHI, M.; *et al.* Regulation of Fibroblast Growth Factor-23 Signaling by Klotho. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 10, p. 6120–6123, 2006.

KUROSU, H.; YAMAMOTO, M.; CLARK, J.D.; *et al.* Suppression of Aging in Mice by the Hormone Klotho. **Science**, v. 309, n. 5742, p. 1829–1833, 2005.

LEHRICH, R.; MIDDLETON, J. Quality of life in ESRD Therapies. **Nephrology Self-Assessment Program**, v. 15, n. 5, p. 433–439, 2016.

LEVIN, A.; STEVENS, P.E. Summary of KDIGO 2012 CKD Guideline: behind the scenes, need for guidance, and a framework for moving forward. **Kidney International**, v. 85, n. 1, p. 49–61, 2014.

LIEW, H.; *et al.* Endothelial glycocalyx damage in kidney disease correlates with uraemic toxins and endothelial dysfunction. **BMC Nephrology**, v. 22, n. 1, 10 jan. 2021.

LIM, S.W.; SHIN, Y.J.; LUO, K.; *et al.* Effect of Klotho on autophagy clearance in tacrolimus-induced renal injury. **The FASEB Journal**, v. 33, n. 2, p. 2694–2706, 2018.

LIN, C-H.; LURIE, R.C.; LYONS, O.D. Sleep Apnea and Chronic Kidney Disease. **Chest**, v. 157, n. 3, p. 673–685, 2020.

LIN, Y.; SUN, Z. Antiaging Gene *Klotho* Attenuates Pancreatic  $\beta$ -Cell Apoptosis in Type 1 Diabetes. **Diabetes**, v. 64, n. 12, p. 4298–4311, 2015.

LIN, Y.; SUN, Z. In Vivo Pancreatic  $\beta$ -Cell-Specific Expression of Antiaging Gene *Klotho*: A Novel Approach for Preserving  $\beta$ -Cells in Type 2 Diabetes. **Diabetes**, v. 64, n. 4, p. 1444–1458, 2014.

LINDBERG, K.; AMIN, R.; MOE, O.W.; *et al.* The Kidney Is the Principal Organ Mediating *Klotho* Effects. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 25, n. 10, p. 2169–2175, 2014.

LU, X.; HU, M.C. *Klotho*/FGF23 Axis in Chronic Kidney Disease and Cardiovascular Disease. **Kidney Diseases**, v. 3, n. 1, p. 15–23, 2016.

LUX, S.; MIRZAZADE, S.; KUZMANOVIC, B.; *et al.* Differential activation of memory-relevant brain regions during a dialysis cycle. **Kidney International**, v. 78, n. 8, p. 794–802, 2010.

MAEKAWA, Y.; ISHIKAWA, K.; YASUDA, O.; *et al.* *Klotho* suppresses TNF- $\alpha$ -induced expression of adhesion molecules in the endothelium and attenuates NF- $\kappa$ B activation. **Endocrine**, v. 35, n. 3, p. 341–346, 2009.

MANOS, P.J.; WU, R. The ten point clock test: a quick screen and grading method for cognitive impairment in medical and surgical patients. **Int J Psychiatry Med**. 24(3):229-44. 1994.

MANOU, E.; THODIS, E.; ARSOS, G.; *et al.* Fibroblast Growth Factor 23 and  $\alpha$ -*Klotho* Protein Are Associated with Adverse Clinical Outcomes in Non-Dialysis CKD Patients. **Kidney and Blood Pressure Research**, v. 45, n. 6, p. 900–915, 2020.

MCCLINTOCK, S.M.; MINTO, L.; DENNEY, D.A.; BAILEY, K.C.; CULLUM, C.M.; DOTSON, V.M. Clinical Neuropsychological Evaluation in Older Adults with Major Depressive Disorder. **Curr Psychiatry Rep**. 2021 Jul 13;23(9):55.

MEDEIROS, C. M. M. F.; DIÓGENES DA SILVA, B. R.; COSTA, B. G.; *et al.* Cognitive impairment, endothelial biomarkers and mortality in maintenance haemodialysis patients: a

prospective cohort study. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 35, n. 10, p. 1779–1785, 2020.

MENCKE, R.; HILLEBRANDS, J-L. The role of the anti-ageing protein Klotho in vascular physiology and pathophysiology. **Ageing Research Reviews**, v. 35, p. 124–146, 2017.

MITOBE, M.; YOSHIDA, T.; SUGIURA, H.; *et al.* Oxidative Stress Decreases Klotho Expression in a Mouse Kidney Cell Line. **Nephron Experimental Nephrology**, v. 101, n. 2, p. e67–e74, 2005.

MORENO, J.A.; IZQUIERDO, M.C.; SANCHEZ-NIÑO, M.D.; *et al.* The Inflammatory Cytokines TWEAK and TNF $\alpha$  Reduce Renal Klotho Expression through NF $\kappa$ B. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 22, n. 7, p. 1315–1325, 2011.

MUÑOZ-CASTAÑEDA, J.R.; RODELO-HAAD, C.; PENDON-RUIZ DE MIER, M.V.; *et al.* Klotho/FGF23 and Wnt Signaling as Important Players in the Comorbidities Associated with Chronic Kidney Disease. **Toxins**, v. 12, n. 3, p. 185, 2020.

NAKAO, V.W.; MAZUCANTI, C.H.Y.; DE SÁ LIMA, L.; DE MELLO, P.S.; DE SOUZA PORT'S, N.M.; KINOSHITA, P.F.; LEITE, J.A.; KAWAMOTO, E.M.; SCAVONE, C. Neuroprotective action of  $\alpha$ -Klotho against LPS-activated glia conditioned medium in primary neuronal culture. **Sci Rep**. 2022 Nov 7;12(1):18884.

NEYRA, J.A.; HU, M.C. Potential application of klotho in human chronic kidney disease. **Bone**, v. 100, p. 41–49, 2017.

NEYRA, J.A.; MOE, O.W; PASTOR, J.; *et al.* Performance of soluble Klotho assays in clinical samples of kidney disease. **Clinical Kidney Journal**, v. 13, n. 2, p. 235–244, 2019.

NEYRA, J.A.; HU, M.C.; MOE, O.W. Klotho in Clinical Nephrology. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 16, n. 1, p. 162–176, 2020.

ORTEGA, L. Role of cytokines in the pathogenesis of acute and chronic kidney disease, glomerulonephritis, and end-stage kidney disease. **International Journal of Interferon, Cytokine and Mediator Research**, p. 49, 2010.

PADBERG, J-S.; WIESINGER, A.; DI MARCO, G.S.; *et al.* Damage of the endothelial glycocalyx in chronic kidney disease. **Atherosclerosis**, v. 234, n. 2, p. 335–343, 2014.

PANESSO, M.C.; SHI, M.; CHO, H.J.; *et al.* Klotho has dual protective effects on cisplatin-induced acute kidney injury. **Kidney International**, v. 85, n. 4, p. 855–870, 2014.

PAPAYIANNI, A.; ALEXOPOULOS, E.; GIAMALIS, P.; *et al.* Circulating levels of ICAM-1, VCAM-1, and MCP-1 are increased in haemodialysis patients: association with inflammation, dyslipidaemia, and vascular events. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 17, n. 3, p. 435–441, 2002.

PAVIK, I.; JAEGER, P.; EBNER, L.; *et al.* Secreted Klotho and FGF23 in chronic kidney disease Stage 1 to 5: a sequence suggested from a cross-sectional study. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 28, n. 2, p. 352–359, 2012.

PAVLATOU, M.G.; REMALEY, A.T.; GOLD, P.W. Klotho: a humeral mediator in CSF and plasma that influences longevity and susceptibility to multiple complex disorders, including depression. **Translational Psychiatry**, v. 6, n. 8, p. e876–e876, 2016.

RAVIKUMAR, P.; YE, J.; ZHANG, J.; *et al.*  $\alpha$ -Klotho protects against oxidative damage in pulmonary epithelia. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 307, n. 7, p. L566–L575, 2014.

RAVIKUMAR, P.; LI, L.; YE, J.; *et al.*  $\alpha$ Klotho deficiency in acute kidney injury contributes to lung damage. **Journal of Applied Physiology**, v. 120, n. 7, p. 723–732, 2016.

ROUCH, L.; CESTAC, P.; HANON, O.; *et al.* Antihypertensive Drugs, Prevention of Cognitive Decline and Dementia: A Systematic Review of Observational Studies, Randomized Controlled Trials, and Meta-Analyses, with Discussion of Potential Mechanisms. **CNS Drugs**, v. 29, n. 2, p. 113–130, 2015.

ROUMELIOTIS, S.; MALLAMACI, F.; ZOCCALI, C. Endothelial Dysfunction in Chronic Kidney Disease, from Biology to Clinical Outcomes: A 2020 Update. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 8, p. 2359, 2020.

SAKAGUCHI, Y.; HAMANO, T.; MATSUI, I.; *et al.* Low magnesium diet aggravates phosphate-induced kidney injury. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 34, n. 8, p. 1310–

1319, 2018.

NERBASS, F.B.; LIMA, H.N.; THOMÉ, F.S.; NETO, O.M.V.; LUGON, J.R.; SESSO, R. Brazilian Dialysis Survey 2021. **Braz. J. Nephrol.**, v. 00, n. 00, p. 00-00, Nov. 2022.

SAKAN, H.; NAKATANI, K.; ASAI, O.; *et al.* Reduced Renal  $\alpha$ -Klotho Expression in CKD Patients and Its Effect on Renal Phosphate Handling and Vitamin D Metabolism. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e86301, 2014.

SARNAK, M.J.; TIGHIOUART, H.; SCOTT, T.M.; LOU, K.V.; SORENSEN, E.P.; GIANG, L.M.; DREW, D.A.; SHAFFI, K.; STROM, J.A.; SINGH, A.K.; WEINER, D.E. Frequency of and risk factors for poor cognitive performance in hemodialysis patients. **Neurology**. 2013 Jan 29;80(5):471-80.

SANKOWSKI, B.; KSIĘŻARCZYK, K.; RAĆKOWSKA, E.; *et al.* Higher cerebrospinal fluid to plasma ratio of p-Cresol sulfate and indoxyl sulfate in patients with Parkinson's disease. **Clinica Chimica Acta**, v. 501, p. 165–173, 2020.

SATOH, M.; NAGASU, H.; MORITA, Y.; *et al.* Klotho protects against mouse renal fibrosis by inhibiting Wnt signaling. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 303, n. 12, p. F1641–F1651, 2012.

SEMBA, R.D.; MOGHEKAR, A.R.; HU, J.; *et al.* Klotho in the cerebrospinal fluid of adults with and without Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v. 558, p. 37–40, 2014.

SESSO, R.C.; LOPES, A.A.; THOMÉ, F.S.; *et al.* Brazilian Chronic Dialysis Survey 2016. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 39, n. 3, 2017.

SHARDELL, M.; SEMBA, R.D.; ROSANO, C.; *et al.* Plasma Klotho and Cognitive Decline in Older Adults: Findings from the InCHIANTI Study. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 71, n. 5, p. 677–682, 2015.

SHI, M.; FLORES, B.; GILLINGS, N.; *et al.*  $\alpha$ Klotho Mitigates Progression of AKI to CKD through Activation of Autophagy. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 27, n. 8, p. 2331–2345, 2015.

SILVA, P.; UNWIN, R.; HOORN, E.J.; *et al.* Acidosis, cognitive dysfunction, and motor

impairments in patients with kidney disease. **Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 37, p. ii4—ii12, 2021.

SILVA, A.C.S.; MIRANDA, A.S.; ROCHA, N.P.; *et al.* Neuropsychiatric Disorders in Chronic Kidney Disease. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, 2019.

SMITH, E.R.; HOLT, S.G.; HEWITSON, T.D.  $\alpha$ Klotho–FGF23 interactions and their role in kidney disease: a molecular insight. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 76, n. 23, p. 4705–4724, 2019.

STEVENS, P.E.; LEVIN, A. Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease: Synopsis of the kidney disease: Improving Global Outcomes 2012 Clinical Practice Guideline. **Annals of Internal Medicine**, v. 158, n. 11, p. 825, 2013.

SU, H.; LEI, C-T; ZHANG, C. Interleukin-6 Signaling Pathway and Its Role in Kidney Disease: An Update. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 21 abr. 2017.

SUGIURA, H.; YOSHIDA, T.; TSUCHIYA, K.; *et al.* Klotho reduces apoptosis in experimental ischaemic acute renal failure. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 20, n. 12, p. 2636–2645, 2005.

SUN, C-Y.; LI, J-R.; WANG, Y-Y; *et al.* p-Cresol Sulfate Caused Behavior Disorders and Neurodegeneration in Mice with Unilateral Nephrectomy Involving Oxidative Stress and Neuroinflammation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 18, p. 6687, 2020.

THURSTON, R.D.; LARMONIER, C.B.; MAJEWSKI, P.M.; *et al.* Tumor Necrosis Factor and Interferon- $\gamma$  Down-regulate Klotho in Mice with Colitis. **Gastroenterology**, v. 138, n. 4, p. 1384-1394.e2, 2010.

TSAI, Y-C. *et al.* Angiopietin-2, Renal Deterioration, Major Adverse Cardiovascular Events and All-Cause Mortality in Patients with Diabetic Nephropathy. v. 43, n. 2, p. 545–554, 6 abr. 2018.

TSUJI, R.; INOUE, H.; UEHARA, M.; *et al.* Dietary magnesium deficiency induces the expression of neuroinflammation-related genes in mouse brain. **Neuropsychopharmacology**

**Reports**, v. 41, n. 2, p. 230–236, 2021.

TSURUYA, K.; YOSHIDA, H.; KUROKI, Y.; *et al.* Brain Atrophy in Peritoneal Dialysis and CKD Stages 3-5: A Cross-sectional and Longitudinal Study. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 65, n. 2, p. 312–321, 2015.

TRONCOSO, M.F. *et al.* VCAM-1 as a predictor biomarker in cardiovascular disease. *Molecular Basis Disease*, v. 1867, n. 3, 14 maio 2021.

VIGGIANO, D.; WAGNER, C.A.; MARTINO, G.; *et al.* Mechanisms of cognitive dysfunction in CKD. **Nature Reviews Nephrology**, v. 16, n. 8, p. 452–469, 2020.

VINTERS, H.V.; MAGAKI, S.D.; WILLIAMS, C.K. Neuropathologic Findings in Chronic Kidney Disease (CKD). **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, v. 30, n. 9, p. 105657, 2021.

WANG, F.; ZHANG, L.X.; LIU, L.S.; *et al.* Level of Kidney Function Correlates with Cognitive Decline. **American Journal of Nephrology**, v. 32, n. 2, p. 117–121, 2010.

WEI, Y.; WEI, Y.K.; ZHU, J. Early markers of kidney dysfunction and cognitive impairment among older adults. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 375, p. 209–214, 2017.

WEI, H. *et al.* Serum Klotho: a potential predictor of cerebrovascular disease in hemodialysis patients. *BMC Nephrology*, v. 20, n. 1, 21 fev. 2019.

WILLIAMSON, J.D.; PAJEWSKI, N.M.; AUCHUS, A.P.; *et al.* Effect of Intensive vs Standard Blood Pressure Control on Probable Dementia. **JAMA**, v. 321, n. 6, p. 553, 2019.

XIE, J.; CHA, S-K.; AN, S-W.; *et al.* Cardioprotection by Klotho through downregulation of TRPC6 channels in the mouse heart. **Nature Communications**, v. 3, n. 1, 2012.

XIN, Y-J.; YUAN, B.; YU, B.; *et al.* Tet1-mediated DNA demethylation regulates neuronal cell death induced by oxidative stress. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, 2015.

YAFFE, K.; KURELLA-TAMURA, M.; ACKERSON, L.; *et al.* Higher Levels of Cystatin C Are Associated with Worse Cognitive Function in Older Adults with Chronic Kidney Disease: The Chronic Renal Insufficiency Cohort Cognitive Study. **Journal of the American**

**Geriatrics Society**, v. 62, n. 9, p. 1623–1629, 2014.

YAMASAKI, K.; HATA, J.; FURUTA, Y.; *et al.* CORRIGENDUM: Association of Albuminuria with White Matter Hyperintensities Volume on Brain Magnetic Resonance Imaging in Elderly Japanese — The Hisayama Study —. **Circulation Journal**, v. 84, n. 7, p. 1207, 2020.

YU, X., IBRAHIMI, A.O., GOETZ, R., *et al.* **Analysis of the biochemical mechanisms for the endocrine actions of fibroblast growth factor-23**. *Endocrinology* 2005; 146: 4647-4656.

ZELDICH, E.; CHEN, C-D.; AVILA, R.; *et al.* The Anti-Aging Protein Klotho Enhances Remyelination Following Cuprizone-Induced Demyelination. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 57, n. 2, p. 185–196, 2015.

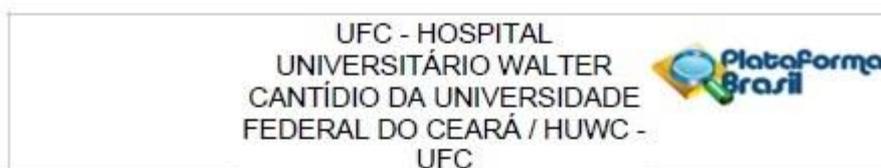
ZELDICH, E.; CHEN, C-D.; COLVIN, T.A.; *et al.* The Neuroprotective Effect of Klotho is Mediated via Regulation of Members of the Redox System. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 35, p. 24700–24715, 2014.

ZHOU, L.; LI, Y.; ZHOU, D.; *et al.* Loss of Klotho Contributes to Kidney Injury by Derepression of Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 24, n. 5, p. 771–785, 2013.

ZHOU, X.; CHEN, K.; LEI, H.; *et al.* Klotho Gene Deficiency Causes Salt-Sensitive Hypertension via Monocyte Chemotactic Protein-1/CC Chemokine Receptor 2–Mediated Inflammation. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 26, n. 1, p. 121–132, 2015.

ZOU, D.; WU, W.; HE, Y.; *et al.* The role of Klotho in chronic kidney disease. **BMC Nephrology**, v. 19, n. 1, 2018.

## ANEXO – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO NEUROCOGNITIVA E DA PROTEÍNA KLOTHO EM PACIENTES PORTADORES DE DOENÇA RENAL CRÔNICA

**Pesquisador:** Anaiara Lucena Queiroz

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 34337420.3.0000.5045

**Instituição Proponente:** Universidade Federal do Ceará/HOSPITAL UNIVERSITARIO WALTER

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

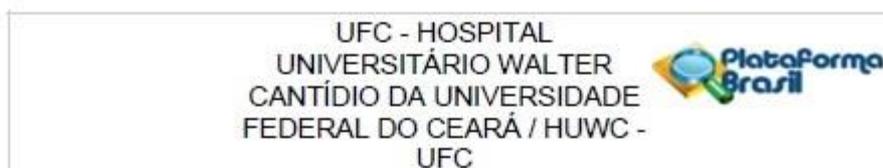
**Número do Parecer:** 4.201.482

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de um trabalho de doutorado em Farmacologia da doutoranda Anaiara Lucena Queiroz, orientado pela Profa. Danielle Macedo Gaspar. É um estudo observacional, transversal, não intervencionista, com os pacientes portadores de Doença Renal Crônica, acompanhados no ambulatório de Nefrologia do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC). A Doença Renal Crônica (DRC) caracteriza-se por um dano renal progressivo evidenciado através da redução da taxa de filtração glomerular. Doença renal crônica está associada a declínio cognitivo. Disfunção cognitiva é comum em pacientes com doença renal crônica (DRC), e na população geral a redução da função renal é um fator de risco para o declínio da função cognitiva. Várias evidências têm demonstrado uma alta prevalência de distúrbios neuropsiquiátricos, principalmente declínio cognitivo, depressão e ansiedade em pacientes com DRC. A fisiopatologia exata do déficit cognitivo na DRC não é ainda completamente compreendida e várias funções cerebrais estão comprometidas. A DRC é uma patologia caracterizada por um déficit de vitamina D, principalmente em sua forma ativada, o calcitriol. Estudos recentes mostram que a 1,25 dihidroxivitamina D age aumentando a expressão do RNAm de Klotho. Os rins são a maior fonte de Klotho solúvel no sangue e os níveis séricos da proteína Klotho são significativamente menores em pacientes com DRC que em controles, e diminuem progressivamente com o agravamento da

<b>Endereço:</b> Rua Coronel Nunes de Melo, 1142	<b>CEP:</b> 60.430-270
<b>Bairro:</b> Rodofo Teófilo	
<b>UF:</b> CE	<b>Município:</b> FORTALEZA
<b>Telefone:</b> (85)3366-8589	<b>Fax:</b> (85)99267-4630
<b>E-mail:</b> cephuwc@huwc.ufc.br	

## ANEXO – PARECER COMITÊ DE ÉTICA



Continuação do Parecer: 4.201.482

Outros	termo_compromisso1.pdf	09:31:45	Queiroz	Aceito
Outros	autorizacao_chefia.pdf	01/07/2020 09:30:57	Anaiara Lucena Queiroz	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Anaiara.pdf	01/07/2020 09:27:00	Anaiara Lucena Queiroz	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	01/07/2020 09:26:45	Anaiara Lucena Queiroz	Aceito
Orçamento	orcamento.pdf	01/07/2020 09:26:32	Anaiara Lucena Queiroz	Aceito
Cronograma	cronograma.pdf	01/07/2020 09:26:16	Anaiara Lucena Queiroz	Aceito
Declaração de concordância	declaracao_concordancia.pdf	01/07/2020 09:25:24	Anaiara Lucena Queiroz	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FORTALEZA, 09 de Agosto de 2020

\_\_\_\_\_  
 Assinado por:  
 Maria Helane Costa Gurgel  
 (Coordenador(a))

Endereço: Rua Coronel Nunes de Melo, 1142	CEP: 60.430-270
Bairro: Rodolfo Teófilo	
UF: CE	Município: FORTALEZA
Telefone: (85)3366-8589	Fax: (85)99267-4630 E-mail: cephuwc@huwc.ufc.br

## APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

### Termo de Consentimento livre e esclarecido

Você está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa intitulado” **Avaliação da função neurocognitiva e da proteína Klotho em pacientes portadores de doença renal crônica** “, que tem por objetivo investigar os distúrbios neurocognitivos em pacientes com doença renal crônica e a associação destes distúrbios com a proteína Klotho. Proteína que vem sendo muito importante em pesquisas recentes em pacientes portadores de doença renal crônica.

A participação do Sr.(a) na pesquisa consiste em autorizar o acesso ao Prontuário Clínico para a coleta de dados clínicos e laboratoriais. A participação é voluntária, sem custos, e também não remunerada. O Sr.(a) pode se recusar a participar ou retirar seu consentimento em qualquer momento da realização da pesquisa sem sofrer qualquer tipo de pressão ou punição.

Essa pesquisa não traz riscos biológicos aos pacientes envolvidos, já que se trata de um estudo de dados a partir de prontuários. Os riscos que devem ser considerados nesse projeto são o extravio de prontuários e a perda da confidencialidade dos dados. Para eliminar esses riscos, serão tomadas providências e precauções. O risco de extravio de prontuários será minimizado pela entrega dos prontuários exclusivamente à médica Dra. Anaiara Lucena Queiroz, que assinou o termo de compromisso com o SAME, setor responsável pela liberação dos prontuários.

A identidade dos participantes da pesquisa será preservada, já que serão utilizados somente os dados clínicos e laboratoriais do prontuário dos pacientes, sem a necessidade de divulgação do nome ou iniciais dos mesmos. Os dados só serão coletados e divulgados mediante a assinatura desse termo de consentimento livre e esclarecido, ao passo que será garantida a manutenção absoluta do sigilo profissional sobre a identidade do(a) participante durante e após o término da pesquisa. Assim, a identidade pessoal e/ou profissional do(a) participante não será divulgada em nenhuma publicação científica.

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. Os pesquisadores se comprometem a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa. Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas.

O funcionamento dos seus rins será avaliado através de exames de sangue e urina, para isso será necessária a coleta de pequena amostra de sangue e urina depois de jejum por um período de 12 horas. Suas amostras de sangue serão armazenadas em um freezer no Laboratório de Nefrologia e Doenças Tropicais da Universidade Federal do Ceará. Será entregue um recipiente adequado para você coletar a sua urina. Você terá um ( 1) tubo de sangue total coletado (20 mL) para avaliação em laboratório. O procedimento de coleta de sangue pode causar desconforto, dor e manchas roxas no local da punção, onde a agulha será inserida. Todos esses procedimentos serão feitos por profissionais experientes e treinados, envolvidos no projeto, utilizando materiais descartáveis e esterelizados para diminuir o risco do exame. Além disso, seu nome e dados pessoais registrados para controle não serão divulgados, sendo mantidos em sigilo.

Após a coleta do exame de sangue e urina, você passará por uma avaliação clínica, através de alguns testes e perguntas que serão realizadas pela equipe da pesquisa para avaliar sua função cognitiva, que consiste em avaliar sua memória, atenção, linguagem, percepção e a

## APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

capacidade de executar algumas tarefas. Esta avaliação deve demorar em média por um período de 60 minutos.

O benefício que poderá ser obtido através desta pesquisa é o melhor entendimento de anormalidades no funcionamento cerebral que é uma complicação em pacientes com doença renal crônica. Você estará contribuindo para a descoberta de soluções para os problemas cerebrais relacionados com a doença renal, tendo grande importância para um melhor prognóstico da doença. Além disso, caso seja detectado alguma alteração da sua função cognitiva, você será encaminhado para uma unidade especializada para acompanhamento adequado.

Os pacientes que concordarem em participar do projeto deverão assinar este termo de consentimento livre e esclarecido. Você assinará as duas vias do termo de consentimento livre esclarecido de igual teor e receberá por direito uma das vias para controle pessoal;

O principal investigador é o doutorando **Anaiara Lucena Queiroz** que pode ser encontrado no endereço Rua Pastor Samuel Munguba, 1290, bairro Rodolfo Teófilo, Fortaleza, Ceará; telefone(s) (85) 3366-8167. E-mail: [anaiaralucena@yahoo.com.br](mailto:anaiaralucena@yahoo.com.br). Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o **Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HUWC** – Rua Capitão Francisco Pedro 1290, Rodolfo Teófilo; fone: 3366-8589 – E-mail: [cephuwc@huwc.ufc.br](mailto:cephuwc@huwc.ufc.br). Caso você se sinta suficientemente informado a respeito das informações que leu ou que foram lidas para você sobre os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes e que sua participação é voluntária, que não há remuneração para participar do estudo e se você concordar em participar solicitamos que assine no espaço abaixo. O sr. (a) ficará com uma via deste termo, e outra via ficará com o investigador responsável pela pesquisa.

Você autoriza o armazenamento do sangue coletado para possíveis novas avaliações nesta pesquisa?  Sim  Não

Gostaria de receber o resultado desses exames? Registrar endereço e contato telefônico para que possamos contatá-lo  Sim  Não

Endereço:

Telefone 1:

Telefone 2:

Eu discuti com Dra. Anaiara Lucena Queiroz e/ou equipe delegada sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os objetivos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso aos profissionais de saúde do estudo para acompanhamento, quando necessário. Concordo, voluntariamente, em participar deste estudo. Tenho ciência de que poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço. Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

**APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

-----  
Assinatura do paciente/representante                      Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

-----  
Assinatura da testemunha                                      Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semianalfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

-----  
Assinatura do responsável pelo estudo                      Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

\* O campo “nome do participante” deverá ser preenchido somente pelo mesmo. O representante legal deverá assinar para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semianalfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual. Nos casos de analfabetismo ou semi-analfabetismo do participante também pode ser utilizada a impressão digital do mesmo (datiloscópica).

## APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO UTILIZADO NA ENTREVISTA



UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO CEARÁ

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

### ROTEIRO PARA ANAMNESE

DATA: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

#### DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

NOME: \_\_\_\_\_

NASCIMENTO: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ IDADE: \_\_\_\_

ENDEREÇO: \_\_\_\_\_

SEXO: MASCULINO (  ) FEMININO (  )

NATURALIDADE: \_\_\_\_\_ NACIONALIDADE: \_\_\_\_\_

ESCOLARIDADE: \_\_\_\_\_ PROFISSÃO: \_\_\_\_\_

CELULAR: \_\_\_\_\_ FIXO: \_\_\_\_\_

PESO: \_\_\_\_\_ ALTURA \_\_\_\_\_ IMC: \_\_\_\_\_

#### DIAGNÓSTICO DA DOENÇA RENAL CRÔNICA

1- CAUSA DA DRC - ESTÁGIO: \_\_\_\_\_

DM (  ), HAS (  ), LITÍASE RENAL (  ), INFECÇÃO URINÁRIA (  ),  
OBESIDADE (  )

2- TEVE COVID?

(  ) SIM (  ) NÃO DATA: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

FOI INTERNADO(A)? (  ) SIM (  ) NÃO

HOUVE NECESSIDADE DE OXIGENOTERAPIA? (  ) SIM (  ) NÃO

**APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO UTILIZADO NA ENTREVISTA****3- OUTRAS CONDIÇÕES MÉDICAS:**INFARTO DO MIOCÁRDIO?  

---

ALGUMA PATOLOGIA NEUROLÓGICA?  

---

**4- TEM HISTÓRICO FAMILIAR DE DOENÇA RENAL CRÔNICA?**  

---

**5- QUANTAS HORAS DE SONO?** \_\_\_\_\_**6- TEM QUEIXAS COGNITIVAS E/OU COMPORTAMENTAIS?**  

---

**7- HÁ ANTECEDENTES HEREDITÁRIOS / FAMILIARES DE DEMÊNCIAS  
E/OU DOENÇAS MENTAIS NA FAMÍLIA?** SIM     NÃO

- SE SIM, QUAL (IS)?  

---

**8- TEVE CÂNCER?**     SIM     NÃO  
PASSOU POR QUIMIOTERAPIA?     SIM     NÃO  
PASSOU POR RADIOTERAPIA?     SIM     NÃO**9- FAZ OU FEZ USO DE BEBIDA (S) ALCÓOLICA (S)?** SIM     NÃO

- SE SIM, QUAL (IS) E POR QUANTO TEMPO?  

---

**10- FAZ OU FEZ USO DE DROGA (S) ILÍCITA (S)?** SIM     NÃO

**APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO UTILIZADO NA ENTREVISTA**

SE SIM, QUAL (IS) E POR QUANTO TEMPO?

---

**11- É TABAGISTA?**

( ) SIM ( ) NÃO

- SE SIM, HÁ QUANTO TEMPO E QUANTOS CIGARROS POR DIA?
- 

- CASO NÃO FAÇA MAIS USO, HÁ QUANTO TEMPO PAROU?
- 

**12- MEDICAÇÕES EM USO:**

• PSICOTRÓPICO? ( ) SIM ( ) NÃO

• ANTIDEPRESSIVO? ( ) SIM ( ) NÃO

FORTALEZA, \_\_\_\_ DE \_\_\_\_\_ 20 \_\_\_\_.

---

ASSINATURA E CRM  
DO RESPONSÁVEL DA PESQUISA