

**UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PELOTAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E COMPORTAMENTO**

**LARISSA RIBAS RIBEIRO**

**IMPACTO DO POLIMORFISMO DO GENE DA ENZIMA CONVERSORA DA  
ANGIOTENSINA E DA VARIABILIDADE DA FREQUENCIA CARDIACA EM  
DESFECHOS CLÍNICOS DE PACIENTES COM DOENÇA RENAL CRÔNICA  
TERMINAL TRATADOS POR HEMODIÁLISE**

Pelotas

2022

**LARISSA RIBAS RIBEIRO**

**IMPACTO DO POLIMORFISMO DO GENE DA ENZIMA CONVERSORA DA  
ANGIOTENSINA E DA VARIABILIDADE DA FREQUENCIA CARDIACA EM  
DESFECHOS CLÍNICOS DE PACIENTES COM DOENÇA RENAL CRÔNICA  
TERMINAL TRATADOS POR HEMODIÁLISE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Comportamento da Universidade Católica de Pelotas como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Saúde e Comportamento.

Orientador: Maristela Bohlke

Coorientador: Rafael Bueno Orcy

Pelotas

2022

### Ficha Catalográfica

R484i Ribeiro, Larissa Ribas

**Impacto do polimorfismo do gene da enzima conversora da angiotensina e da variabilidade da frequência cardíaca em desfechos clínicos de pacientes com doença renal crônica terminal tratados por hemodiálise / Larissa Ribas Ribeiro. – Pelotas: UCPEL, 2022.**

78 f.

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Saúde e Comportamento, Universidade Católica de Pelotas. - Pelotas, BR-RS, 2022.

Orientadora: Maristela Bohlke.  
Co-orientador: Rafael Bueno Orcy.

1. Doença renal crônica. 2. Variabilidade da frequência cardíaca.
3. Polimorfismo do gene da enzima conversora da angiotensina. 4. Hemodiálise. I. Bohlke, Maristela. II. Título.

Bibliotecária responsável: Cristiane de Freitas Chim CRB 10/1233

**IMPACTO DO POLIMORFISMO DO GENE DA ENZIMA CONVERSORA DA  
ANGIOTENSINA E DA VARIABILIDADE DA FREQUENCIA CARDIACA EM  
DESFECHOS CLÍNICOS DE PACIENTES COM DOENÇA RENAL CRÔNICA  
TERMINAL TRATADOS POR HEMODIÁLISE**

Conceito final: \_\_\_\_\_ [L]  
[SEPP]

Aprovado em: \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA:**

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Adriano Martimbianco de Assis da Universidade Católica de Pelotas

\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Janaina Barcellos Ferreira da Universidade Federal de Ciências da Saúde de  
Porto Alegre

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Sandro Soares de Almeida do Hospital Albert Einstein

\_\_\_\_\_  
Orientador – Profa. Dra. Maristela Bohlke

## **Dedicatória**

Dedico esta conquista aos meus pais Neusa e João Lino em agradecimento por terem dedicado às suas vidas à minha, sempre me apoiando e incentivando a dar um passo à frente.

## **Agradecimentos**

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Maristela Bohlke e co-orientador Prof<sup>o</sup>. Rafael Bueno Orcy pela confiança, paciência e por todo o aprendizado ao longo desta caminhada, vocês foram fundamentais para o meu crescimento, sem vocês essa realização não seria possível.

Aos colaboradores deste estudo pela parceria, aprendizado e oportunidade de crescimento junto a vocês.

Aos pacientes e grandes amigos que colaboraram com o desenvolvimento deste estudo e que torceram por essa conquista.

A Deus por ter me abençoado e me dado saúde para enfrentar as adversidades e chegar até aqui sorrindo.

À vida, Muito Obrigada!

## RESUMO

**Introdução:** A doença renal crônica (DRC) caracteriza-se pela redução progressiva da taxa de filtração glomerular (TFG), eventualmente alcançando o estágio de doença renal crônica terminal (DRCT) com necessidade de terapia renal substitutiva (TRS). A diminuição da TFG está associada a um aumento progressivo e linear na mortalidade cardiovascular. A disfunção do sistema nervoso autônomo (SNA) com hiperatividade simpática tem sido bem documentada em pacientes portadores de DRC, especialmente na população com DRCT. A isquemia renal provoca tanto a ativação exagerada do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), através do aumento da liberação de renina, quanto do SNA simpático, por meio dos nervos simpáticos aferentes. O SRAA e o SNA simpático, ambos hiperativados, se retroalimentam mutuamente, o que contribui para a doença cardiovascular (DCV) na DRC. Apesar da clara participação destes sistemas na gênese da DCV da DRC, ensaios clínicos randomizados utilizando drogas que bloqueiam o SRAA ou SNA simpático não têm mostrado efeitos significativos na redução de eventos nessa população. Uma possível explicação para esses resultados negativos seria a heterogeneidade genética, como por exemplo, o polimorfismo no gene da enzima conversora da angiotensina (ECA). **Objetivos:** avaliar o impacto do polimorfismo do gene da ECA e da VFC na sobrevida de pacientes portadores de doença renal crônica tratados por HD em um Serviço de Diálise e Transplante Renal, situado no sul do Brasil. **Metodologia:** Estudo de coorte prospectiva. A amostra será composta por pacientes adultos portadores de DRC em tratamento por hemodiálise (HD) há mais de 90 dias. Foram obtidos dados sociodemográficos, história clínica pregressa e medicamentos em uso. A análise da VFC foi realizada através de aparelho de eletrocardiograma Micromed® com registro do desvio padrão de todos os intervalos normais (SDNN), raiz quadrada da média dos quadrados das diferenças entre intervalos consecutivos (RMSSD), banda de baixa frequência (LF) e de alta frequência (HF), em momento de normovolemia, após uma sessão de HD do meio da semana. O polimorfismo do gene da ECA foi avaliado por método de reação em cadeia da polimerase em amostra de DNA de sangue periférico. Os dados serão analisados através do pacote estatístico STATA 15.0.

**Palavras-chave:** doença renal crônica, variabilidade da frequência cardíaca, polimorfismo do gene da enzima conversora da angiotensina.

## ABSTRACT

**Introduction:** Chronic kidney disease (CKD) is characterized by progressive decrease in glomerular filtration rate (GFR), eventually reaching the end-stage renal disease (ESRD) requiring renal replacement therapy (RRT). The decrease in GFR is associated with a gradual and linear increase in cardiovascular mortality. Dysfunction of the autonomic nervous system (ANS) with sympathetic overactivity has been well documented in patients with CKD, especially in people with ESRD. The renal ischemia causes both the excessive activation of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) by increasing renin release, as sympathetic ANS, through the afferent sympathetic nerves. The overactivated RAAS and sympathetic SNA feedback each other, which contributes to cardiovascular disease (CVD) in CKD. Despite the clear involvement of these systems in the pathogenesis of CVD in CKD, randomized clinical trials using drugs that block the RAAS or sympathetic SNA have not shown significant effects in the frequency of cardiovascular events in this population. A possible explanation for these negative findings is the genetic heterogeneity, such as the polymorphism in the gene for angiotensin converting enzyme (ACE). **Objectives:** to evaluate the impact of THE gene polymorphism and HRV on the survival of patients with chronic kidney disease treated by HD in a Dialysis and Renal Transplantation Service, located in southern Brazil. **Methodology:** Prospective cohort study. The sample will consist of adult patients with CKD undergoing hemodialysis (HD) treatment for more than 90 days. Sociodemographic data, previous clinical history and medications in use were obtained. HRV analysis was performed using a Micromed electrocardiogram device® with a recording of the standard deviation of all normal intervals (SDNN), square root of the mean of the squares of the differences between consecutive intervals (RMSSD), low frequency band (LF) and high frequency (HF), at the time of normovolemia, after a midweek HD session. The polymorphism of the ECA gene was evaluated by polymerase chain reaction method in peripheral blood DNA sample. The data will be analyzed using stata 15.0 statistical package.

**Keywords:** chronic kidney disease, heart rate variability, angiotensin converting enzyme gene polymorphism.

**LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

<b>Figura 1</b> – Classificação da Doença Renal Crônica, KDIGO 2012.....	24
<b>Figura 2</b> – Imagem ilustrativa de uma sessão de hemodiálise.....	25
<b>Figura 3</b> – Representação do sistema renina-angiotensina-aldosterona.....	31

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**5-d** – Estágio 5 dialítico

**AngI** – Angiotensina I

**AngII** – Angiotensina II

**AVC** – Acidente Vascular Cerebral

**BRA** – Bloqueador do Receptor da Angiotensina

**BsCC** – Bloqueadores dos Canais de Cálcio

**D** – Genótipo D do gene da ECA

**DAC** – Doença Arterial Coronariana

**DCNT** – Doenças Crônicas Não Transmissíveis

**DD** – Alelo DD do gene da ECA

**DM** – Diabetes Mellitus

**DP** – Diálise Peritoneal

**DRC** – Doença Renal Crônica

**DRCT** – Doença Renal Crônica Terminal

**ECA** – Enzima Conversora da Angiotensina

**ECG** – Eletrocardiograma

**ECR** – Ensaio Clínico Randomizado

**FC** – Frequência Cardíaca

**HAS** – Hipertensão Arterial Sistêmica

**HD** – Hemodiálise

**HF** – Espectro de Alta Frequência

**HVE** – Hipertrofia Ventricular Esquerda

**I** – Genótipo I do gene da ECA

**IAM** – Infarto Agudo do Miocárdio

**IC** – Insuficiência Cardíaca

**ID** – Genótipo ID do gene da ECA

**IECA** – Inibidor da Enzima Conversora da Angiotensina

**II** – Alelo II do gene da ECA

**IM** – Infarto do Miocárdio

**LF** – Espectro de Baixa Frequência

**LF/HF** – Razão entre baixa e alta frequências

**NN** – Intervalos normais

**PCR** – Reação em Cadeia de Polimerase

**pmp** – Por milhão de população

**pNN50** – Porcentagem das diferenças sucessivas entre os intervalos R-R maiores que 50 ms

**PTH** – Paratormônio

**rMSSD** – Raiz quadrada da média das diferenças sucessivas ao quadro, entre R-R adjacentes

**SBN** – Sociedade Brasileira de Nefrologia

**SDANN** – Desvio Padrão da Média de todos Intervalos Normais

**SDNN** – Desvio Padrão de todos Intervalos Normais

**SNA** – Sistema Nervoso Autônomo

**SRAA** – Sistema Renina-angiotensina-aldosterona

**SUS** – Sistema Único de Saúde

**TCLE** – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**TFG** – Taxa de Filtração Glomerular

**TRS** – Terapia Renal Substitutiva

**VFC** – Variabilidade da Frequência Cardíaca

**VLf** – Espectro de Frequência Muito Baixa

## SUMÁRIO

1. IDENTIFICAÇÃO .....	16
1.1 Título .....	16
1.2 Designação da titulação pretendida pelo autor .....	16
1.3 Orientador .....	16
1.4 Instituição .....	16
1.5 Curso .....	16
1.6 Linha de pesquisa .....	16
1.7 Data .....	16
2. INTRODUÇÃO .....	17
3. OBJETIVOS .....	19
3.1 Artigo 1 .....	19
3.1.1 Objetivo Geral .....	19
3.1.2 Objetivos Específicos .....	19
3.2 Artigo 2 .....	19
3.2.1 Objetivo Geral .....	19
3.2.2 Objetivos Específicos .....	20
4. HIPÓTESES .....	21
4.1 Hipóteses do Artigo 1 .....	21
4.2 Hipóteses do Artigo 2 .....	21
5. REVISÃO DE LITERATURA .....	22
5.1 Estratégias de busca .....	22
5.2 Corpo da revisão .....	22
5.2.1 Doença Renal Crônica (DRC) .....	22
5.2.2 DRC, Doença Cardiovascular e Hiperatividade do Sistema Nervoso Simpático .....	25
5.2.3 Variabilidade da Frequência Cardíaca (VFC) .....	27
5.2.4 Sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) e polimorfismo 17q23 do gene da enzima conversora da angiotensina (ECA) .....	30
5.2.5 Interrelação Sistema Nervoso Autônomo (SNA) Simpático e SRAA .....	33
6. MÉTODO .....	36
6.1 Delineamento .....	36
6.2 Participantes .....	36
6.2.1 Critérios de inclusão .....	36
6.2.2 Critérios de exclusão .....	36
6.3 Procedimentos e instrumentos .....	37

Análise do Polimorfismo do Gene da ECA.....	38
Análise da Variabilidade da Frequência Cardíaca.....	39
6.4 Processamento e análise de dados .....	40
6.5 Aspectos éticos .....	40
6.5.1 Riscos .....	40
6.5.2 Benefícios .....	41
6.6 Cronograma .....	41
6.7 Orçamento .....	42
REFERÊNCIAS .....	43
ARTIGO 1 .....	47
ARTIGO 2 .....	48
ANEXO I – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	73
ANEXO II - QUESTIONÁRIO SOCIODEMOGRÁFICO E CLÍNICO .....	75
ANEXO III - CARTA DE AUTORIZAÇÃO PARA REALIZAÇÃO DO ESTUDO (SERVIÇO DE DIÁLISE E TRANSPLANTE RENAL) .....	76
ANEXO IV - CARTA DE AUTORIZAÇÃO PARA REALIZAÇÃO DO ESTUDO (HOSPITAL UNIVERSITÁRIO SÃO FRANCISCO DE PAULA) ....	77

## **APRESENTAÇÃO**

A tese compreende um dos requisitos para obtenção de título de doutor e estrutura-se com um projeto de pesquisa e a produção de dois artigos.

O projeto intitulado “Impacto do polimorfismo do gene da enzima conversora da angiotensina e da variabilidade da frequência cardíaca em desfechos clínicos de pacientes com doença renal crônica terminal tratados por hemodiálise”, surgiu com a finalidade de buscar interpretar questões clínicas identificadas durante a dissertação de mestrado no ano de 2017.

Em virtude da pandemia por Coronavírus afetando a população no início de 2020, tivemos parte da coleta de dados prejudicada, todavia nesta data buscamos apresentar os produtos do nosso estudo esperando contribuir com aumento de produção na área em questão.

## **1.IDENTIFICAÇÃO**

**1.1 Título:** Impacto do polimorfismo do gene da enzima conversora da angiotensina e da variabilidade da frequência cardíaca em desfechos clínicos de pacientes com doença renal crônica terminal tratados por hemodiálise

**1.2 Designação da titulação pretendida pelo autor:** Doutoranda Larissa Ribas Ribeiro

**1.3 Orientador:** Maristela Bohlke

**1.4 Instituição:** Universidade Católica de Pelotas (UCPel)

**1.5 Curso:** Doutorado em Saúde e Comportamento

**1.6 Linha de pesquisa:** Pesquisa Clínica

**1.7 Data:** 27/04/2022

## 2. INTRODUÇÃO

O aumento da prevalência e incidência da doença renal crônica (DRC), incluindo o número de casos que necessitam de terapia renal substitutiva (TRS), é fenômeno mundialmente reconhecido e discutido em muitos estudos. Estima-se que mais de 2 milhões de pessoas em todo o mundo recebam atualmente tratamento dialítico ou transplante renal para se manterem vivas (1). No Brasil, em torno de 140.000 pessoas estavam em tratamento por diálise no ano de 2019, o que representa uma prevalência de 665 pessoas por milhão de população (pmp), com incidência neste mesmo ano de 45.852 pacientes (2).

O declínio da função renal está associado a um aumento progressivo e linear na mortalidade por doenças cardiovasculares. Nos pacientes portadores de doença renal crônica terminal (DRCT) os eventos cardiovasculares são responsáveis por mais de 40% dos óbitos (3). O impacto do tratamento dialítico nestes eventos, especialmente nas arritmias, tem sido bastante discutido, demonstrando a susceptibilidade cardíaca durante a hemodiálise (HD), associada ao impacto de alterações eletrolíticas ou mesmo da remoção de fluídos que ocorrem durante a terapia (4).

Estudos têm demonstrado a influência do sistema nervoso autônomo (SNA) com aumento da atividade do simpático e redução do parassimpático nos casos de morte súbita (5). A fisiopatologia da doença cardiovascular (DCV) nos portadores de DRC não está completamente esclarecida. No entanto, a hiperatividade do SNA simpático e do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) está bem documentada e tem sido considerada como importante mediadora da DCV nessa população (4,5).

A medida indireta da atividade do SNA através de uma ferramenta não invasiva denominada variabilidade da frequência cardíaca (VFC) tem sido utilizada em

diferentes estudos por apresentar uma boa correlação com os métodos padrão ouro, menor custo financeiro e menor risco ao paciente (6,7).

Existe uma extensa interrelação entre o SNA e o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), tanto em indivíduos saudáveis, como em diferentes patologias. Em estados mórbidos, a hiperativação destes sistemas pode levar a uma alça de retroalimentação positiva, com consequências deletérias e com implicações prognósticas negativas (8).

Na DRC, a alta concentração e atividade da enzima conversora da angiotensina (ECA) representam um dos fatores de risco cardiovascular, e pode ocorrer como consequência da inserção ou deleção (I/D) no gene da ECA (9).

Vários estudos têm sido conduzidos para estabelecer a relação entre o polimorfismo da enzima conversora da angiotensina (ECA) com as doenças cardiovasculares, demonstrando que pacientes que apresentam alta concentração e atividade da ECA, expressas pelo genótipo D/D, apresentam rápida progressão da doença renal crônica, aumento do risco de infarto agudo do miocárdio, arritmias ventriculares malignas, cardiomiopatias e morte cardíaca súbita (9,10).

Estudo prévio realizado com a amostra em questão, identificou que os pacientes portadores do genótipo I/I do gene da ECA apresentaram maior resposta simpática à sessão de hemodiálise, em consequência supressão do tônus parassimpático, quando comparados com os pacientes portadores do genótipo D/D (11).

O estudo tem como objetivo avaliar o impacto do polimorfismo do gene da ECA e da VFC na sobrevida de pacientes portadores de doença renal crônica tratados por HD em um Serviço de Diálise e Transplante Renal, situado no sul do Brasil.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Artigo 1**

##### ***3.1.1 Objetivo Geral***

Avaliar a associação do polimorfismo do gene da enzima conversora da angiotensina (ECA) em desfechos clínicos de pacientes portadores de doença renal crônica tratados por hemodiálise.

##### ***3.1.2 Objetivos Específicos***

***3.1.2.1*** Identificar a frequência de genótipos do polimorfismo do gene da ECA na população estudada;

***3.1.2.2*** Avaliar a diferença entre as taxas de hospitalização dos pacientes estudados conforme os polimorfismos inserção/deleção da ECA;

***3.1.2.3*** Avaliar as curvas de sobrevida na população estudada conforme os polimorfismos inserção/deleção da ECA;

***3.1.2.4*** Identificar a associação entre os polimorfismos inserção/deleção da ECA com variáveis clínicas (pressão arterial, glicemia, PTH, hematócrito) e comorbidades (diabetes e hipertensão) na população estudada.

#### **3.2 Artigo 2**

##### ***3.2.1 Objetivo Geral***

Avaliar o impacto da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) e de sua resposta a hemodiálise em desfechos clínicos de pacientes portadores de doença renal crônica tratados por hemodiálise.

### ***3.2.2 Objetivos Específicos***

**3.2.2.1** Descrever a variabilidade da frequência cardíaca e sua resposta a HD na população estudada;

**3.2.2.2** Avaliar a associação entre VFC e sua resposta a HD com a taxa de hospitalização;

**3.2.2.3** Avaliar a associação entre VFC e sua resposta a HD com a sobrevida da população estudada;

**3.2.2.4** Determinar fatores demográficos (sexo, idade) e clínicos (diabetes, hipertensão, obesidade, tempo de HD, PTH, hematócrito, pressão arterial) associados à VFC e sua resposta a HD.

## **4. HIPÓTESES**

### **4.1 Hipóteses do Artigo 1**

**4.1.1** A proporção genotípica da ECA na população estudada é de 3ID, 2DD, 1II;

**4.1.2** Pacientes portadores do alelo D apresentam maiores taxas de hospitalizações clínicas em relação aos pacientes portadores do genótipo II;

**4.1.3** Pacientes portadores do alelo D apresentam menor sobrevida a longo prazo;

**4.1.4** Pacientes portadores de doenças crônicas prévias e outras comorbidades apresentam maior ativação do alelo D.

### **4.2 Hipóteses do Artigo 2**

**4.2.1** Pacientes portadores de DRC tratados por HD apresentam menor VFC do que a descrita para a população geral; a VFC vai aumentar durante a HD, especialmente seu componente simpático;

**4.2.2** Pacientes que apresentam menor variabilidade da frequência cardíaca e menor resposta simpática a HD apresentam maiores taxas de hospitalização;

**4.2.3** Pacientes que apresentam menor variabilidade da frequência cardíaca e menor resposta simpática a HD, apresentam menor sobrevida a longo prazo;

**4.2.4** Pacientes portadores de doenças crônicas prévias e outras comorbidades apresentam menor VFC.

## 5. REVISÃO DE LITERATURA

### 5.1 Estratégias de busca

Quadro 1: Descritores e combinações da revisão de literatura

→ <i>polimorfismo da enzima conversora da angiotensina</i> (pubmed) = 4.268
→ ( <i>polimorfismo da enzima conversora da angiotensina</i> ) E ( <i>insuficiência renal crônica</i> ) (pubmed) = 183
→ (( <i>polimorfismo da enzima conversora da angiotensina</i> ) E ( <i>insuficiência renal crônica</i> )) E ( <i>hemodiálise</i> ) (pubmed) = 53
→ ((( <i>polimorfismo da enzima conversora da angiotensina</i> ) E ( <i>insuficiência renal crônica</i> )) E ( <i>hemodiálise</i> )) NÃO ( <i>diálise peritoneal</i> ) (pubmed) = 47
→ (((( <i>polimorfismo da enzima conversora da angiotensina</i> ) E ( <i>insuficiência renal crônica</i> )) E ( <i>hemodiálise</i> )) NÃO ( <i>diálise peritoneal</i> )) NÃO ( <i>transplante renal</i> ) (pubmed) = 39
→ <i>variabilidade da frequência cardíaca</i> (pubmed) = 39.510
→ ( <i>variabilidade da frequência cardíaca</i> ) E ( <i>insuficiência renal crônica</i> ) (pubmed) = 658
→ (( <i>variabilidade da frequência cardíaca</i> ) E ( <i>insuficiência renal crônica</i> )) E ( <i>hemodiálise</i> ) (pubmed) = 273
→ ((( <i>variabilidade da frequência cardíaca</i> ) E ( <i>insuficiência renal crônica</i> )) E ( <i>hemodiálise</i> )) NÃO ( <i>diálise peritoneal</i> ) (pubmed) = 241
→ (((( <i>variabilidade da frequência cardíaca</i> ) E ( <i>insuficiência renal crônica</i> )) E ( <i>hemodiálise</i> )) NÃO ( <i>diálise peritoneal</i> )) NÃO ( <i>transplante renal</i> ) (pubmed) = 184
→ ((( <i>polimorfismo da enzima conversora da angiotensina</i> ) E ( <i>variabilidade da frequência cardíaca</i> )) E ( <i>insuficiência renal crônica</i> )) E ( <i>hemodiálise</i> )) NÃO ( <i>diálise peritoneal</i> )) NÃO ( <i>transplante de rim</i> ) (pubmed) = 0

### 5.2 Corpo da revisão

#### 5.2.1 Doença Renal Crônica (DRC)

A DRC representa importante problema de saúde pública em todo o mundo devido ao número elevado de casos diagnosticados a cada ano, ao impacto prognóstico negativo e ao elevado custo de seu tratamento. A doença se caracteriza pela perda da função renal de forma progressiva, impedindo a eliminação de resíduos metabólicos e água através dos rins. Seu desenvolvimento ocorre de forma silenciosa, podendo ser diagnosticada quando o paciente já se encontra em uma fase avançada da doença, apresentando manifestações clínicas como retenção de líquidos, sonolência, inapetência, dispneia, fadiga, confusão mental, náuseas e vômitos (9).

A prevalência estimada de portadores de DRC em seus diferentes estágios pode variar de 8 a 16% da população geral, de acordo com o Global Kidney Disease 3, alguns dos quais poderão necessitar de terapia renal substitutiva (TRS) no decorrer dos anos (1). A Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN), através do Censo Brasileiro de Diálise, estimou que havia 139.691 pacientes em tratamento por diálise no Brasil no ano de 2019, o que representa prevalência de 665 pacientes por milhão de população (pmp), com incidência neste mesmo ano de 45.852 pacientes (2).

Dentre os fatores de risco para DRC, outras doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) como hipertensão arterial sistêmica (HAS) e diabetes mellitus (DM) são responsáveis por 34% e 31%, respectivamente, dos pacientes em terapia dialítica no Brasil, seguidas por glomerulonefrite crônica (9%), rins policísticos (4%), outros (11%) e indefinidos (11%). A taxa de mortalidade bruta anual, estimada para os pacientes em diálise no ano de 2019 foi de 18,2% (2).

Para fins de diagnóstico e tratamento, a DRC é classificada em estágios, podendo variar do estágio 1 ao 5 conforme avaliação da taxa de filtração glomerular (TFG) e de alterações em exames de urina e de imagem dos rins. A TFG em jovens adultos é aproximadamente 125 ( $\pm$ 20) ml/min/1,73 m<sup>2</sup>. Com o avanço da idade, a TFG

diminui cerca de 10 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> por década e este declínio é superior nos hipertensos, por isso um valor de 60-90 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> pode ser normal em um indivíduo idoso. Valores inferiores a 60 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> são considerados patológicos, caracterizando a falha da função renal e, conseqüentemente, a presença da DRC, independentemente da presença de eventuais alterações estruturais. A doença renal crônica terminal (DRCT) é evidenciada quando a TFG estiver abaixo de 15ml/min/1,73 m<sup>2</sup>, passando o paciente a necessitar de alguma modalidade de TRS (12) (Figura 1).

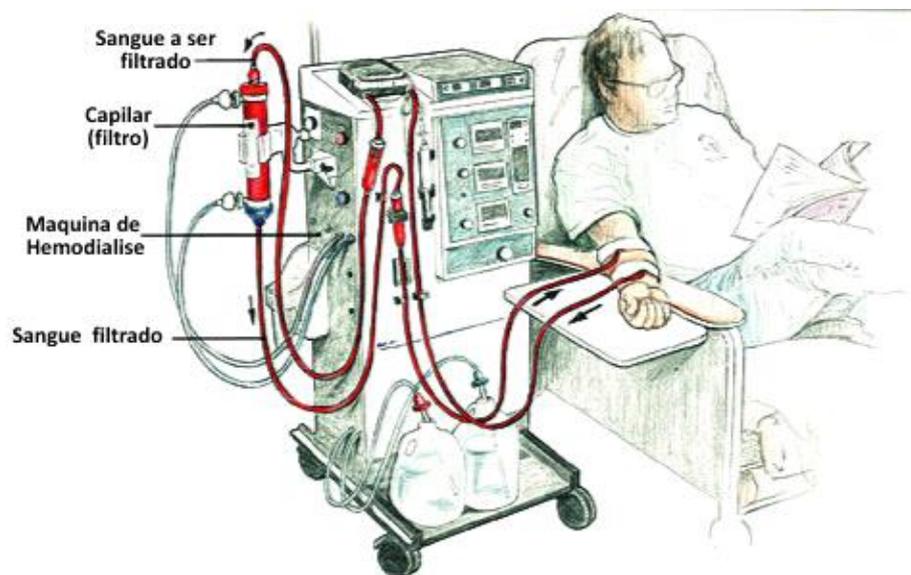
Prognosis of CKD by GFR and Albuminuria Categories: KDIGO 2012				Persistent albuminuria categories Description and range		
				A1	A2	A3
				Normal to mildly increased	Moderately increased	Severely increased
				<30 mg/g <3 mg/mmol	30-300 mg/g 3-30 mg/mmol	>300 mg/g >30 mg/mmol
GFR categories (ml/min/1.73m <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			

**Figura 1. Classificação da Doença Renal Crônica, KDIGO 2012.**

A TRS é ofertada aos pacientes com DRCT no estágio 5 dialítico (5-d), contemplando em suas formas a hemodiálise (HD), diálise peritoneal (DP) e o transplante renal, este podendo ocorrer com doador vivo ou falecido (2). A HD é a modalidade de terapia dialítica de maior prevalência entre os pacientes portadores de doença renal crônica e a de maior custo para as organizações de saúde, devido a sua alta complexidade. No Brasil, o Sistema Único de Saúde (SUS), segundo o Censo Brasileiro

de Diálise de 2019, é responsável pelo custeio de aproximadamente 80% das diálises realizadas no país, acarretando alto custo financeiro (2).

O tratamento por HD consiste na filtração do sangue através de um capilar acoplado a uma máquina, ocorrendo por meio deste sistema a difusão das substâncias indesejáveis no sangue para o líquido dialisador, eliminando toxinas e o excesso de líquido do organismo. Este procedimento é realizado geralmente três vezes por semana, com duração média de 4 horas por sessão (13) (Figura 2).



**Figura 2. Imagem ilustrativa de uma sessão de hemodiálise.**

### ***5.2.2 DRC, Doença Cardiovascular e Hiperatividade do Sistema Nervoso Simpático***

A redução da TFG está associada a um aumento progressivo e linear na mortalidade cardiovascular. No paciente portador de DRCT, os eventos cardiovasculares são responsáveis por mais de 40% dos óbitos (3). A morte súbita cardíaca é responsável por 30% das ocorrências de morte por causa cardiovascular em pacientes tratados por TRS. O impacto do tratamento dialítico nos eventos cardiovasculares, especialmente nas arritmias, tem sido bastante discutido,

demonstrando a susceptibilidade cardíaca durante a HD, associada ao impacto de alterações eletrolíticas ou mesmo da remoção de fluídos que ocorrem durante a terapia (4). Embora a maioria dos casos de morte súbita por arritmia esteja associada à doença arterial coronariana (DAC), alterações da função autonômica com aumento da atividade do SNA simpático e redução do parassimpático também estão associadas à ocorrência de morte súbita (14).

A fisiopatologia da doença cardiovascular (DCV) nos pacientes portadores de doença renal crônica ainda permanece indeterminada, podendo haver influências de fatores de risco tradicionais, como a HAS, DM e hiperlipidemias, e influência de outros fatores de risco específicos da DRC, tais como a anemia, inflamação, calcificação vascular, estresse oxidativo, hipertrofia ventricular esquerda (HVE) além de disfunção do sistema nervoso autônomo (SNA) (5).

A disfunção do SNA com hiperatividade simpática tem sido bem documentada em pacientes portadores de DRC, especialmente na DRCT. Converse e cols, pela primeira vez, demonstraram que em pacientes com DRC ocorre a ativação do simpático, sendo os rins os responsáveis por essa ativação (6). Os rins, quando submetidos à isquemia, levam a uma ativação excessiva do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) e um aumento da ativação de nervos simpáticos aferentes. A estimulação da inervação eferente resulta em vasoconstrição, diminuição do fluxo sanguíneo renal e glomerular e diminuição da taxa de filtração pelos rins; além disso, ocorre aumento da reabsorção de sódio e aumento da produção de angiotensina II (Ang II) (5,6).

Por sua vez, o SRAA contribui na ativação do SNA simpático por vários mecanismos, como estimulação de gânglios simpáticos, aumento da liberação de noradrenalina em terminações simpáticas pré-sinápticas e redução da recaptação de noradrenalina em fibras pós-sinápticas (15).

Klein e cols, sugerem que a hiperatividade do simpático é uma característica da DRC independentemente do número de néfrons. A ativação do simpático não é apenas evidenciada no estágio final da DRC, tanto que Grassi e cols, demonstraram que a atividade nervosa simpática nos músculos já se encontra aumentada em pacientes hipertensos com função renal apenas moderadamente comprometida, quando comparados com hipertensos com função renal normal (16,17).

A hiperatividade simpática na DRC tem sido responsabilizada em parte pelo acréscimo de mortalidade cardiovascular detectada nessa população, na medida que provoca hipertensão arterial e lesões em órgãos-alvo que ocorrem por efeito direto do simpático, independente dos níveis pressóricos, além de aumento do risco de arritmias (5,6,16).

A medida do extravasamento (*spill-over*) da noradrenalina por técnicas radioisotópicas e a medida dos disparos em nervos periféricos por microneuromiografia são considerados métodos padrão-ouro para medida de atividade do SNA simpático. No entanto, constituem-se em métodos invasivos e de alto custo. A medida da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) tem se mostrado um método indireto para avaliar SNA, com boa correlação com métodos invasivos (7,18).

### ***5.2.3 Variabilidade da Frequência Cardíaca (VFC)***

A VFC surge como uma ferramenta importante na avaliação da saúde cardiovascular, bem como da atividade do SNA, representando método quantitativo para a análise dos mecanismos de modulação autonômica cardíaca e controle neuronal de adaptação do débito cardíaco às diferentes necessidades do organismo (7,8).

Muitos estudos têm sido conduzidos confirmando a validade da análise da VFC de forma não invasiva, por meio de monitoramento quantitativo do sistema

cardiovascular, possibilitando a diferenciação entre os estados fisiológicos e patológicos e auxiliando de forma positiva na identificação das condições de doença (19-22).

A VFC se caracteriza como as mudanças no intervalo ou distância entre batimentos cardíacos. O intervalo entre batimentos é o tempo entre uma onda R (ou batimento cardíaco) e a próxima, em milissegundos, sendo que a mesma é altamente variável dentro de determinado período de tempo (7).

A análise da VFC é possível por meio de três diferentes componentes, domínio tempo, domínio frequência e de forma não linear. A análise no domínio tempo mede os intervalos R-R normais. Vários parâmetros são calculados a partir desses intervalos, incluindo desvio padrão de todos os intervalos R-R normais durante um período de 24 horas (SDNN), desvio padrão de uma média de 5 minutos de intervalos R-R normais (SDANN), média de 5 minutos de SDNN (ASDNN), raiz quadrada do valor médio das diferenças de sucessivos intervalos R-R (rMSSD) e o número de vezes por hora em que dois intervalos R-R consecutivos diferem por mais de 50 ms durante 24 horas (pNN50) (7).

A análise no domínio da frequência separa os sinais de frequência cardíaca em componentes de frequência e usa análise espectral. Os componentes utilizados são frequência muito baixa (VLF),  $< 0,04$  Hz, influenciada pela termorregulação do tônus vasomotor; baixa frequência (LF), entre 0,04 e 0,15 Hz, afetada pelo reflexo barorreceptor e dependente dos tônus simpático e parassimpático; e alta frequência (HF), entre 0,15 e 0,40 Hz, influenciada pela frequência respiratória e dependente do tônus parassimpático. A razão LF/HF é um índice do balanço simpátovagal e autonômico e representa um dos componentes da análise da VFC mais representativos da hiperatividade simpática (7).

A análise geométrica pode ser utilizada para lidar com problemas como complexos ectópicos, batimentos perdidos ou “ruído” na análise de registros do ECG. Esse método cria histogramas de intervalos ordenados em fragmentos de 7,8 ms e a seguir calcula o índice triangular (TI) (7).

Nas últimas décadas houve um maior reconhecimento da relação do SNA com a morte cardiovascular, incluindo a morte súbita. Estudos sugerem que a diminuição da VFC contribua como valor preditivo para mortalidade entre adultos saudáveis. Além disso, essa diminuição de variabilidade está bem estabelecida como sendo risco para arritmias e mortalidade em pacientes após infarto agudo do miocárdio (IAM) (20,23,24).

A VFC reflete a modulação da atividade simpática e parassimpática do SNA a fim de controlar a frequência cardíaca e quantificar a atividade autonômica. Em geral, mulheres, pessoas mais jovens e mais saudáveis apresentam maior VFC, sendo que esta diminui com o avanço da idade em ambos os sexos. A redução da VFC tem sido reportada em várias doenças, cardíacas ou não. Entre os tabagistas também ocorre diminuição da VFC, sendo que este mecanismo pode ser responsável pelos efeitos prejudiciais do fumo sobre o coração (25).

Em pacientes hipertensos e com HVE também há diminuição da VFC, assim como na DM, aumentando as chances de eventos cardiovasculares e morte cardíaca súbita. A redução da VFC tem sido associada com pior prognóstico, tanto em pacientes com doença cardiovascular, quanto na população geral (7,25).

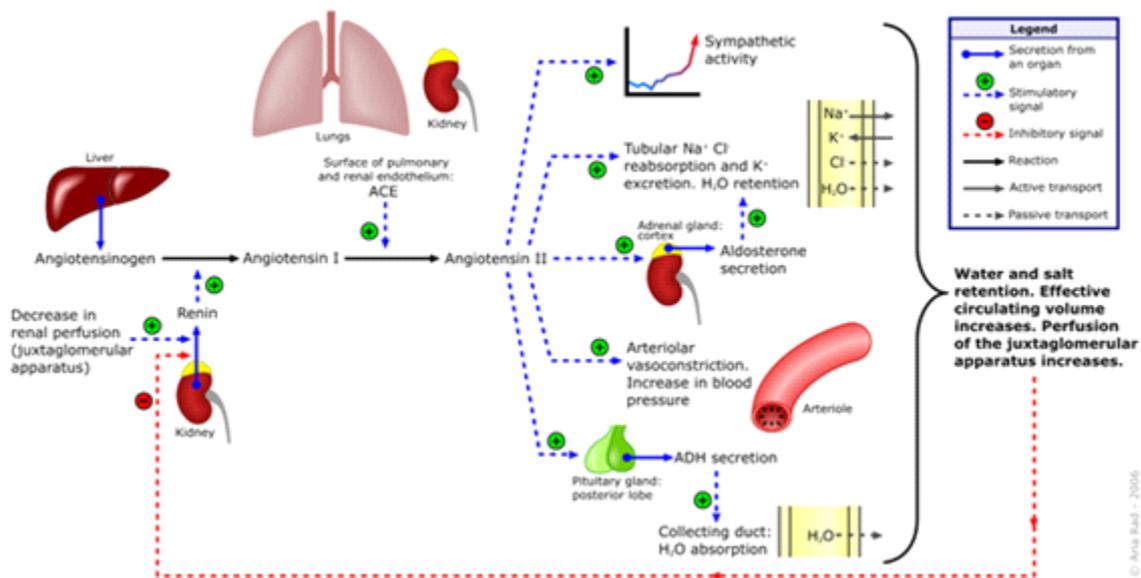
Na DRC também está bem documentada a redução da VFC por comprometimento da atividade simpática e parassimpática, e esta alteração autonômica está associada ao acréscimo nas taxas de mortalidade cardiovascular. O comprometimento autonômico é mais significativo em pacientes diabéticos portadores

de DRC, pela superposição das neuropatias urêmica e diabética, o que parece explicar, pelo menos em parte, a mortalidade adicional de diabéticos tratados por diálise (20,24,26).

A VFC também se modifica durante a sessão de HD, e de forma diferente entre diabéticos e não diabéticos. Embora o estudo dos efeitos agudos de uma sessão de HD sobre a VFC revele resultados conflitantes, o tratamento em longo prazo tanto por HD como por DP melhora a função autonômica de pacientes portadores de DRC, e essa melhora é proporcional a dose de diálise oferecida (19,22,24,26,27).

#### ***5.2.4 Sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) e polimorfismo 17q23 do gene da enzima conversora da angiotensina (ECA)***

O SRAA se apresenta como um importante mecanismo fisiológico de regulação e controle da pressão arterial (PA). Diante da redução da PA, os rins liberam uma enzima proteica chamada renina (produzida por células renais justaglomerulares), a qual age enzimaticamente sobre outra proteína plasmática, o angiotensinogênio, provocando sua conversão em angiotensina I (Ang I) (28) (Figura 3).



**Figura 3. Representação do sistema renina-angiotensina-aldosterona.**

A Ang I possui algumas propriedades vasoconstritoras, mas não suficientes para causar alterações significativas na função circulatória. No entanto, através de uma enzima conversora presente especialmente no endotélio dos vasos pulmonares, ocorre a transformação em angiotensina II (Ang II), capaz de agir como potente vasoconstritor e na diminuição da excreção de sódio e de água pelos rins, além de induzir a liberação de aldosterona pela camada cortical das glândulas supra-renais, hormônio responsável pela regulação do balanço eletrolítico (28).

A ECA é encontrada de duas formas nos seres humanos, uma delas denominada como ECA somática, presente no sistema circulatório e nos tecidos, e outra ECA testicular encontrada no espermatozóide. A ECA testicular também conhecida como germinal apresenta um domínio catalítico, enquanto a somática é uma proteína que contém dois domínios catalíticos. Ambos os domínios da ECA somática são responsáveis pela conversão da AngI em AngII, para atuar como potente vasoconstritor hormonal, bem como na inativação ou redução da produção de vasodilatadores como a bradicinina (29).

Na DRC a elevação da PA e a inapropriada ativação do SRAA contribuem para alta incidência de doenças cardiovasculares nesta população. Portanto, com a finalidade de manter a PA em níveis satisfatórios, busca-se utilizar medicamentos que promovam bloqueio do SRAA, como os inibidores da enzima conversora da angiotensina (IECA), os bloqueadores do receptor da angiotensina (BRA), e os inibidores da renina, como o alisquireno, que atuam reduzindo a quantidade de AngII produzida pelo organismo ou bloqueando sua atividade, visando amenizar a atividade simpática e reservando como anti-hipertensivos de segunda escolha os diuréticos e os bloqueadores de canais de cálcio (BsCC) (30).

A atividade do SRAA apresenta extensa variabilidade interindividual, em grande parte determinada por diferenças genéticas em cada um de seus elementos. O polimorfismo 17q23 no gene da ECA, por exemplo, resulta de um elemento de inserção (alelo "I") ou deleção (alelo "D") no interior do gene 16 da ECA, e tem sido estudado principalmente por reação em cadeia de polimerase (PCR). Tem sido demonstrado que o polimorfismo I/D da ECA está associado com a atividade da ECA na corrente sanguínea, com indivíduos DD apresentando maior atividade enzimática (10).

Shanmuganathan e cols encontraram associação entre polimorfismo no gene da ECA com a DRC e hipertensão em uma amostra de indianos, evidenciando uma prevalência aumentada do genótipo ID em pacientes com hipertensão e em casos de pacientes hipertensos com DRC. Esse estudo demonstrou ainda que pacientes com alelo D do gene da ECA apresentam um risco elevado para o desenvolvimento da DRC (31). Outros autores trazem resultados semelhantes, demonstrando que polimorfismo no gene da ECA contribui para incidência e progressão da DRC de diferentes etiologias (32-35).

Kiss e cols avaliaram a associação entre sobrevida a longo prazo e polimorfismos no gene da ECA em pacientes com DRC submetidos à HD. Trata-se de

um estudo observacional com um total de 716 pacientes que foram acompanhados ao longo de 10 anos, e que mostra que a terapia com IECA está associada ao aumento da sobrevida dos pacientes com DRCT em hemodiálise. No entanto, não foi observada a relação entre polimorfismos no gene da ECA com a sobrevida dos pacientes em terapia por HD (36).

Luft e cols sugerem que o alelo D do gene da ECA seja responsável pela maior concentração da ECA e, sobretudo, pelo aumento do tamanho do coração. Este mesmo estudo identificou maior VFC em portadores do alelo DD em comparação a pessoas com alelo I, supondo-se que os portadores de genótipos DD apresentariam menor risco de morte súbita após infarto agudo do miocárdio (IAM) (10).

Busjahn e cols buscaram associar polimorfismos no gene da ECA e do angiotensinogênio com a VFC em gêmeos e encontraram uma maior variabilidade naqueles com genótipo DD, no entanto, esse estudo envolve indivíduos saudáveis (37).

### ***5.2.5 Interrelação Sistema Nervoso Autônomo (SNA) Simpático e SRAA***

Existe uma extensa interrelação entre o SNA e o SRAA tanto em indivíduos saudáveis como em diferentes patologias. Em estados mórbidos, a hiperativação destes sistemas pode levar a uma alça de retroalimentação positiva, com consequências deletérias e com implicações prognósticas negativas. Na DRC, a isquemia renal conduz à liberação exagerada de renina com ativação do SRAA e ao aumento da atividade em nervos simpáticos aferentes. O SRAA, por sua vez, tende a estimular ainda mais o SNA simpático por mecanismos centrais e periféricos, enquanto o SNA simpático também amplifica a atividade do SRAA pela estimulação adicional da liberação de renina a partir das células justaglomerulares (9).

Vários estudos têm demonstrado que os medicamentos que bloqueiam o SRAA como os IECA e os BRAs reduzem a atividade simpática em doenças que cursam com hiperatividade deste ramo do SNA, como HAS acelerada, insuficiência cardíaca (IC) e inclusive na DRC. Kario et al demonstraram que pacientes portadores de DRC com frequência cardíaca (FC) matinal mais elevada, considerada um indicador indireto de maior ativação simpática, experimentaram benefícios maiores em termos de redução da FC e da PA com o uso de olmesartan, um bloqueador do receptor da angiotensina. Esses autores concluem que pacientes portadores de condições mórbidas com hiperatividade simpática alcançam benefícios adicionais com o bloqueio do SRAA, devido à interrupção, mesmo que parcial, do eixo de retroalimentação positiva que se estabelece patologicamente nestas condições (38).

Peters e cols estudaram o efeito do bloqueador do receptor da angiotensina (BRA) irbesartan sobre a VFC de pacientes portadores de DRC tratados por HD no estudo “SAFIR” e confirmaram o aumento da atividade do SNA simpático, com VFC atenuada e elevados níveis de catecolaminas no plasma. De forma geral, não houve diferença significativa entre o irbesartan e o placebo sobre os parâmetros da VFC (39).

Kusuyama e cols compararam o efeito de azilsartan com outros BRAs sobre a função cardíaca e para determinar o seu efeito sobre o SNA simpático em pacientes tratados por HD e descrevem que o azilsartan provocou diminuição significativa nos níveis de noradrenalina no soro e um efeito hipotensor mais importante quando comparado com outros BRAs. No entanto, não foi detectado impacto significativo do azilsartan na frequência cardíaca média ou na VFC. A partir deste estudo foi possível concluir que o azilsartan possui um maior potencial em suprimir o sistema nervoso simpático em comparação a outros BRAs, como indicado pela redução dos níveis de noradrenalina (40).

Segundo Flevari e cols o bloqueio do receptor da aldosterona com espironolactona também se mostrou eficaz no aumento da VFC em pacientes portadores de DRC tratados por HD, os autores concluem que a terapia com baixas doses de espironolactona nestes pacientes está associada a respostas cardiovasculares favoráveis (41).

Apesar de todas essas evidências que apontam para um efeito recíproco entre a atividade do SRAA e do SNA simpático na DRC, e de evidências que sinalizam a influência destes sistemas em desfechos cardiovasculares adversos, os dois maiores ensaios clínicos randomizados (ECR) a estudar o assunto não encontraram redução de eventos cardiovasculares com o uso de BRA em pacientes tratados por hemodiálise (42, 43). No entanto, estudos menores mostram resultados contraditórios com o bloqueio do SRAA em pacientes tratados por diálise, principalmente em relação a pacientes que apresentam como comorbidades IC e HVE (39-41).

Tosic e cols analisaram os polimorfismos no gene da ECA em um grupo de 196 pacientes em tratamento por hemodiálise e diante dos resultados, perceberam que os pacientes com alelo D apresentaram maior incidência de HVE e doença vascular periférica com significativa associação com aumento da incidência de acidente vascular cerebral (AVC) e hiperlipoproteinemia (44).

Estes resultados contraditórios podem ser explicados pela heterogeneidade dos pacientes estudados, inclusive em relação a sua constituição genética. Frente a isso, é surpreendente que não se tenha encontrado na literatura disponível nenhum estudo que avalie a interrelação entre polimorfismo 17q23 do gene da ECA e atividade do SNA simpático em pacientes portadores de DRC.

## **6. MÉTODO**

### **6.1 Delineamento**

Trata-se de um estudo de coorte prospectivo, com início em junho de 2017 e seguimento ao longo de 4 anos. Este estudo originou-se a partir da dissertação de mestrado, buscando identificar o significado clínico dos achados encontrados.

### **6.2 Participantes**

A amostra do estudo foi composta por pacientes portadores de DRC tratados por hemodiálise em um Serviço de Diálise e Transplante Renal, anexo a um Hospital Universitário no Sul do Brasil, foi avaliada toda a população em diálise que preencheu os critérios de elegibilidade.

#### ***6.2.1 Critérios de inclusão***

- Idade igual ou superior a 18 anos;
- Estar em programa de hemodiálise há mais de 90 dias;
- Aceitar participar do estudo mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

#### ***6.2.2 Critérios de exclusão***

- Portadores de arritmia;
- Pacientes em uso de marcapasso;
- Pacientes com amputação de membros;

Para análise do número de internações que ocorreram no período foram aplicados alguns critérios de exclusão, como internações devido traumas ou cirurgias ortopédicas, cirurgia estética, gestação e/ou parto e internações sociais.

### **6.3 Procedimentos e instrumentos**

Após o consentimento do paciente em participar do estudo, mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (APÊNDICE I), foi aplicado um questionário (APÊNDICE II) a fim de obter dados sociodemográficos, história clínica prévia e medicações em uso. Esse instrumento serviu de base para uma dupla checagem dos dados disponíveis no prontuário médico.

As variáveis sexo, cor da pele, data de nascimento, data do início da diálise, hipertensão, diabetes e diagnóstico de base foram obtidas através do prontuário eletrônico dos pacientes na admissão ao estudo.

As variáveis peso seco, altura, ultrafiltração, pressão arterial sistólica inicial, pressão arterial diastólica inicial, pressão arterial sistólica final e pressão arterial diastólica final foram obtidas do prontuário eletrônico, porém na sessão de diálise destinada a avaliação laboratorial mensal.

A coleta de sangue destinada à genotipagem do gene da ECA foi realizada concomitante com a coleta dos exames mensais (cálcio, creatinina, fósforo, hematócrito, hemoglobina, potássio, sódio, TPG, ureia pré diálise, ureia pós diálise, paratormônio (PTH) e albumina) que aconteceu na segunda sessão de diálise semanal, respeitando o menor intervalo interdialítico, sendo as amostras coletadas antes do início da sessão de hemodiálise.

As variáveis de desfecho, número de internações, número de cateteres, número de fístulas arteriovenosa (FAV) confeccionadas, óbito, causa do óbito, foram acompanhadas ao longo dos últimos 4 anos.

### ***Análise do Polimorfismo do Gene da ECA***

**1 - Extração do DNA genômico (gDNA):** Para a extração do DNA genômico do sangue, leucócitos foram hemolisados usando uma solução hipotônica de cloreto de sódio, gelada a 4°C, por um minuto. Em seguida, uma solução hipertônica foi adicionada para repor a tonicidade da solução evitando a ruptura das células brancas. Após centrifugação a 15.000 por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado eliminando as proteínas solúveis em excesso na amostra. Em seguida o gDNA foi extraído suspendendo os pellets em 100 µL de EAR Buffer e 5µL de Proteinase K (20mg/mL Invitrogen®) e incubando a 55°C durante 4h. Após resfriamento das amostras até temperatura ambiente, foram adicionados 750µL de TE Buffer. Após centrifugação, foi utilizado 1µL do sobrenadante contendo o DNA extraído para a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

**2 - Amplificação do DNA e genotipagem:** Para amplificação do DNA genômico foram utilizados os iniciadores oligonucleotídeos específicos sendo estes: Sense - 5'-CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT-3' e Anti-sense 5'-GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTA GA-3'. Usando estes iniciadores para a PCR, podemos detectar dos alelos deleção (D = 190 pares de bases) e inserção (I com 490 pares de bases). O protocolo de temperatura foi programado no termociclador iniciando a 95°C por 5 minutos e, em seguida, submetidas a 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 45 segundos, anelamento a 63°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 30 segundos seguidos de uma extensão final de 72°C por 30 segundos.

Para confirmação do tamanho do fragmento amplificado, 10µl do produto da PCR foram aplicados em gel de agarose a 1% e submetidos à eletroforese horizontal em tampão de corrida TBE. Como marcador de peso molecular, foram utilizados 100pb DNA Ladder® (Biolabs). A visualização do DNA foi realizada com Syber Safe (invitrogen) em um transiluminador com luz ultravioleta, o qual está integrado a um fotodocumentador.

### ***Análise da Variabilidade da Frequência Cardíaca***

A análise da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) foi realizada de forma não invasiva através de um aparelho de eletrocardiograma (ECG) Wincardio® da empresa Micromed. A medida foi realizada em três momentos distintos, antes da sessão de HD, durante a sessão de HD (após completar 50% do tempo previsto) e após 30 minutos do término da sessão. Os pacientes foram mantidos na posição de decúbito dorsal durante todo o tempo da análise, com os membros afastados do corpo e livres de pertences metálicos, a fim de que interferências fossem minimizadas.

O ECG Wincardio® vem equipado com doze derivações simultâneas, tem pré-amplificadores isolados do computador e possui ganhos selecionáveis entre 5mm/mV, 10mm/mV e 20mm/mV. Os sinais são exibidos em 25mm/s ou 50 mm/s. O sistema possui ainda um sofisticado sistema de filtros digitais, utilizados na eliminação de tremores musculares, variações da linha de base e influências da rede de alimentação de 50 ou 60 Hz, trazendo o mínimo de distorção dos sinais e garantindo um traçado limpo e fiel, mesmo com presença de ruído. A série temporal armazenada em forma de arquivo de texto foi utilizada para análise da VFC. No domínio do tempo foi avaliada a variância do intervalo de pulso, a raiz quadrada da média dos quadrados das diferenças entre intervalos consecutivos (RMSSD) e o percentual de intervalos maiores que 50 milissegundos (pNN50). Utilizando-se o programa Cardioseries®, o tacograma foi

interpolado a uma frequência de 4Hz e dividido em períodos de 256 pontos com sobreposição de 50%. Estes sinais foram submetidos à análise espectral através da transformada rápida de Fourier (FFT), onde obtivemos a potência total do espectro. A banda de muito baixa frequência (VLF) foi considerada entre 0,00 e 0,04 Hz, a banda de baixa frequência (LF), representativa da modulação simpática cardíaca, foi considerada entre 0,04 e 0,15Hz. Já a banda de alta frequência (HF), considerada modulação parassimpática cardíaca, foi de 0,15 a 0,4Hz.

#### **6.4 Processamento e análise de dados**

Foi realizada a codificação dos instrumentos em dupla entrada de dados no programa EpiInfo 6.0 a fim de obter consistência dos dados coletados. Para análise estatística será utilizado o pacote STATA 15.0. Para análise de sobrevivência será realizado a regressão de cox.

#### **6.5 Aspectos éticos**

Para proceder a pesquisa, foi solicitado aos responsáveis pela instituição (HUSFP) e pelo Setor de Diálise e Transplante Renal, a concordância com a realização do estudo, mediante uma carta (APÊNDICES III e IV). Após o consentimento dos responsáveis, este projeto foi encaminhado ao Comitê de Ética da Universidade Católica de Pelotas, via Plataforma Brasil para que fosse analisado, sendo aprovado sob nº de parecer 1.940.521.

##### **6.5.1 Riscos**

A participação do paciente neste estudo não implicou em riscos adicionais a sua saúde, visto que os procedimentos que foram realizados seguiram os seguintes critérios: a análise da VFC ocorreu de forma não invasiva através de ECG e a coleta de sangue para análise do polimorfismo da ECA seguiu a rotina de coleta mensal da unidade de diálise, utilizando a punção da fístula arteriovenosa ou do cateter para HD, evitando assim que o paciente fosse exposto a um procedimento invasivo exclusivamente para fins de pesquisa.

### **6.5.2 Benefícios**

Tendo em vista o elevado risco cardiovascular a que estão expostos os pacientes portadores de DRC, e considerando que apesar da participação significativa da hiperatividade simpática e do SRAA nestes desfechos, ensaios clínicos randomizados abordando o bloqueio destes sistemas nesta população tem alcançado resultados heterogêneos, a caracterização de subgrupos que possam se beneficiar de medicamentos específicos torna-se um objetivo com significativo potencial de impacto clínico para esta população.

### **6.6 Cronograma**

<b>AÇÕES</b>	<b>CRONOGRAMA</b>				
	<b>2018</b>	<b>2019</b>	<b>2020</b>	<b>2021</b>	<b>2022</b>
<b>1. Revisão de literatura</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>

2. Treinamento dos instrumentos	X				
3. Coleta de dados	X	X	X	X	
4. Qualificação do projeto				X	
5. Análise parcial dos resultados				X	X
6. Revisão, análise e escrita para os artigos				X	X
7. Ajustes no volume final				X	X
8. Defesa					X
9. Ajustes pós defesa					X
10. Entrega do volume final após a defesa					X

### 6.7 Orçamento

MATERIAL	QUANTIDADE	VALOR TOTAL
ECG Wincardio® (Micromed)	1	R\$ 6.150,00
Eletrodos para ECG	900	R\$ 500,00
Tubos de EDTA	150	R\$ 150,00
Tubo Falcon	750	R\$ 350,00
Tubo Eppendorf	1000	R\$ 20,00
Seringa 5ml	150	R\$ 37,50
Agulha 40x12	150	R\$ 20,00
Luvas de procedimento	1500	R\$ 190,00
Caneta Esferográfica	10	R\$ 20,00
Folhas A4	1500	R\$ 50,00
<b>TOTAL*</b>		<b>7.487,50</b>

\* Alguns instrumentos que serão utilizados durante a pesquisa fazem parte do Grupo de Pesquisa Clínica da UCPel, não acarretando aumento de custo para realização deste estudo.

## REFERÊNCIAS

1. Jha DM et al. Doença renal crônica: dimensão e perspectivas globais. Volume 382, issue 9888, p260-272, july 20, 2013.
2. Miranda de Menezes Neves PD, de Castro Cintra Sesso R, Saldanha Thomé F, Ronaldo Lugon J, Mazza Nascimento M. Inquérito brasileiro de diálise 2019. *Braz. J. Nephrol.* (J. Bras. Nefrol.) 2021;43(2):217-227.
3. de Oliveira CA, de Brito Junior HL, Bastos MG, de Oliveira FG, Casali TG, Bignoto TC, et al. Depressão da modulação autonômica cardíaca em pacientes com doença renal crônica diagnosticada pela análise espectral da variabilidade da frequência. *J Bras Nefrol.* 2014;36(2):155-62.
4. Converse RL, Jr., Jacobsen TN, Toto RD, Jost CM, Cosentino F, Fouad-Tarazi F, et al. Hiperatividade simpática em pacientes com insuficiência renal crônica. *The New England journal of medicine.* 1992;327(27):1912-8.
5. Vink EE, de Jager RL, Blankestijn PJ. Hiperatividade simpática em doença renal crônica: fisiopatologia e (novas) opções de tratamento. *Current hypertension reports.* 2013;15(2):95-101.
6. He, Zonglu. Os mecanismos de controle da dinâmica da frequência cardíaca em um novo modelo de série temporal não linear. *Scientific Reports.* 2020. 10:4814.
7. Pinter et al. Disautonomia cardíaca na depressão – frequência cardíaca biofeedback de variabilidade como um potencial complemento terapia. *Neuropsychiatric Disease and Treatment* 2019;15 1287–1310.
8. Sato R, Mizuno M, Miura T, Kato Y, Watanabe S, Fuwa D, et al. Bloqueadores de receptores de angiotensina regulam a sincronização de ritmos circadianos na frequência cardíaca e pressão arterial. *Journal of hypertension.* 2013;31(6):1233-8.
9. Luft FC. Genes ruins, pessoas boas, associação, ligação, longevidade e prevenção de doenças cardiovasculares. *Clinical and experimental pharmacology & physiology.* 1999;26(7):576-9.
10. Khan et al. O polimorfismo da enzima conversora da angiotensina, Gene I/D, está associado à suscetibilidade sistêmica de Lúpus Eritematoso: Uma Meta-Análise Atualizada e Análise Sequencial de Ensaio. *Front. Physiol.*, 17 December 2018.
11. Ribas Ribeiro L, Flores de Oliveira J, Bueno Orcy R, Castilho Barros C, Dame Hense J, Santos F, Irigoyen MC, Gonzalez MC, Oses JP, Bohlke M. Explorando a complexidade: a interação entre a inserção/deleção do polimorfismo da enzima conversora da angiotensina e a resposta simpática à hemodiálise. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2018;315:H1002–H1011.

12. 2012 K. Orientação clínica para avaliação e manejo de doença renal crônica. *Kidney Int Suppl.* 2013;3:1-150.
13. Cherchiglia ML, Machado EL, Szuster DAC, Andrade EIG, Acúrcio FdA, Caiaffa WT, et al. Perfil epidemiológico dos pacientes em terapia renal substitutiva no Brasil, 2000-2004. *Revista de Saúde Pública.* 2010;44(4):639-49.
14. Ligtenberg G, Blankestijn PJ, Oey PL, Klein IH, Dijkhorst-Oei LT, Boomsma F, et al. Redução da hiperatividade simpática por enalapril em pacientes com insuficiência renal crônica. *The New England journal of medicine.* 1999;340(17):1321-8.
15. Blankestijn PJ, London G, Fliser D, Jager KJ, Lindholm B, Goldsmith D, et al. Principais caminhos do elo reno-cardiovascular: os sistemas simpáticos e renina-angiotensina. *Kidney international supplements.* 2011;1(1):13-6.
16. Klein IH, Ligtenberg G, Neumann J, Oey PL, Koomans HA, Blankestijn PJ. A atividade nervosa simpática é inapropriadamente aumentada em doenças renais crônicas. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN.* 2003;14(12):3239-44.
17. Grassi G, Quarti-Trevano F, Seravalle G, Arenare F, Volpe M, Furiani S, et al. Ativação simpática precoce nos estágios clínicos iniciais da insuficiência renal crônica. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979).* 2011;57(4):846-51.
18. Armaganijan L, Staico R, Moreira D, Amodeo C, Borelli F, Sousa M, et al. Efeitos da Denervação Simpática Renal no Diâmetro da Artéria Renal Avaliados Pela Angiografia Quantitativa. *Revista brasileira de cardiologia invasiva.* 2014;22(2):155-60.
19. Chan CT, Chertow GM, Daugirdas JT, Greene TH, Kotanko P, Larive B, et al. Efeitos da hemodiálise diária na variabilidade da frequência cardíaca: resultados do Estudo Diário da Rede de Hemodiálise Frequente (FHN). *Nefrologia, diálise, transplante: publicação oficial da Associação Europeia de Diálise e Transplante - European Renal Association.* 2014;29(1):168-78.
20. Chandra P, Sands RL, Gillespie BW, Levin NW, Kotanko P, Kiser M, et al. Preditores da variabilidade da frequência cardíaca e seu significado prognóstico na doença renal crônica. *Nefrologia, diálise, transplante: publicação oficial da Associação Europeia de Diálise e Transplante - European Renal Association.* 2012;27(2):700-9.
21. Chandra P, Sands RL, Gillespie BW, Levin NW, Kotanko P, Kiser M, et al. Relação entre variabilidade da frequência cardíaca e velocidade da onda de pulso e sua associação com os desfechos do paciente em doença renal crônica. *Clinical nephrology.* 2014;81(1):9-19.
22. Suzuki M, Hiroshi T, Aoyama T, Tanaka M, Ishii H, Kisohara M, et al. Medidas não lineares de variabilidade da frequência cardíaca e risco de mortalidade em pacientes com hemodiálise. *Revista clínica da Sociedade Americana de Nefrologia: CJASN.* 2012;7(9):1454-60.
23. Barletta GM, Flynn J, Mitsnefes M, Samuels J, Friedman LA, Ng D, et al. Frequência cardíaca e variabilidade da pressão arterial em crianças com doença renal

crônica: um relatório do estudo CKiD. *Nefrologia pediátrica* (Berlin, Germany). 2014;29(6):1059-65.

24. Ferrario M, Raimann JG, Larive B, Pierratos A, Thijssen S, Rajagopalan S, et al. Índices de Variabilidade da Frequência Cardíaca Não Linear em Pacientes com Hemodiálise Crônica. *Blood purification*. 2015;40(1):99-108.

25. Taralov ZZ, Terziyski KV, Kostianev SS. Variabilidade da Frequência Cardíaca como Método de Avaliação do Sistema Nervoso Autônomo e adaptações a diferentes condições fisiológicas e patológicas. *Folia medica*. 2015;57(3-4):173-80.

26. Franca da Silva AK, Penachini da Costa de Rezende Barbosa M, Marques Vanderlei F, Destro Christofaro DG, Marques Vanderlei LC. Aplicação da Variabilidade da Frequência Cardíaca no Diagnóstico e Prognóstico de Indivíduos com Diabetes Mellitus: Revisão Sistemática. *Análise eletrocardiográfica não invasiva: the official journal of the International Society for Holter and Noninvasive Electrocardiology, Inc.* 2016;21(3):223-35.

27. Ferrario M, Moissl U, Garzotto F, Cruz DN, Clementi A, Brendolan A, et al. Efeitos da sobrecarga de fluidos na variabilidade da frequência cardíaca em pacientes com doença renal crônica na hemodiálise. *BMC nephrology*. 2014;15:26.

28. Hall ACGJE. *Tratado de Fisiologia Médica* 2006.

29. Castellon R, Hamdi HK. Desmistificando o polimorfismo da ECA: da genética à biologia. *Current pharmaceutical design*. 2007;13(12):1191-8.

30. Fukuda M, Ogiyama Y, Sato R, Miura T, Fukuta H, Mizuno M, et al. O bloqueador de canais de cálcio tipo L/T não reduz a variabilidade da frequência cardíaca em pacientes com doença renal crônica em tratamento anterior com ARB. *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system: JRAAS*. 2016;17(2):1470320316643905.

31. Shanmuganathan R, Kumaresan R, Giri P. Prevalência do polimorfismo do gene da enzima conversora da angiotensina (inserção/deleção) na população sul-indiana com hipertensão e doença renal crônica. *Journal of postgraduate medicine*. 2015;61(4):230-4.

32. Tripathi G, Sharma RK, Baburaj VP, Sankhwar SN, Jafar T, Agrawal S. Fatores de risco genéticos para insuficiência renal entre pacientes do norte da Índia com DRCT. *Clinical biochemistry*. 2008;41(7-8):525-31.

33. Mallamaci F, Zuccala A, Zoccali C, Testa A, Gaggi R, Spoto B, et al. O polimorfismo de deleção da enzima conversora da angiotensina está associado à nefroangiosclerose. *American journal of hypertension*. 2000;13(4 Pt 1):433-7.

34. Samuelsson O, Attman PO, Larsson R, Mulec H, Rymo L, Weiss L, et al. Polimorfismo da enzima conversora da angiotensina I em não diabéticos com doença renal. *Nefrologia, diálise, transplante: publicação oficial da Associação Europeia de Diálise e Transplante - European Renal Association*. 2000;15(4):481-6.

35. Akman B, Tarhan C, Arat Z, Sezer S, Ozdemir FN. Polimorfismos do sistema renina-angiotensina: fator de risco para progressão da doença renal em estágio terminal em pacientes com refluxo vesico-ureteral. *Renal failure*. 2009;31(3):196-200.
36. Kiss I, Ambrus C, Kulcsar I, Szegedi J, Kerkovits L, Tisler A, et al. Interação entre a inserção/deleção genética da enzima conversora da angiotensina e a inibição da enzima conversora da angiotensina na sobrevida de pacientes em hemodiálise. *Medicine*. 2014;93(28):e315.
37. Busjahn A, Voss A, Knoblauch H, Knoblauch M, Jeschke E, Wessel N, et al. Enzima conversora da angiotensina e polimorfismos genéticos, angiotensinogênios e variabilidade da frequência cardíaca em gêmeos. *The American journal of cardiology*. 1998;81(6):755-60.
38. Kario K, Saito I, Kushiro T, Teramukai S, Mori Y, Hiramatsu K, et al. Efeito aumentado da redução da pressão arterial do olmesartan em pacientes hipertensos com hiperatividade simpática associada à doença renal crônica: HONEST Estudo da revista clínica de hipertensão (Greenwich, Conn). 2013;15(8):555-61.
39. Peters CD, Kjaergaard KD, Jensen JD, Christensen KL, Strandhave C, Tietze IN, et al. Efeitos não significativos do bloqueio do receptor de angiotensina II em pontos finais cardiovasculares intermediários em pacientes com hemodiálise. *Kidney international*. 2014;86(3):625-37.
40. Kusuyama T, Ogata H, Takeshita H, Kohno H, Shimodozono S, Iida H, et al. Efeitos do azilsartan em comparação com outros bloqueadores dos receptores de angiotensina na hipertrofia ventricular esquerda e no sistema nervoso simpático em pacientes com hemodiálise. Aférese terapêutica e diálise: revista oficial revisada por pares da Sociedade Internacional para a Apherese, da Sociedade Japonesa para Apherese, da Sociedade Japonesa de Terapia de Diálise. 2014;18(5):398-403.
41. Flevari P, Kalogeropoulou S, Drakou A, Leftheriotis D, Panou F, Lekakis J, et al. A espirolactona melhora a função autonômica endotelial e cardíaca em pacientes com hemodiálise sem falha cardíaca. *Journal of hypertension*. 2013;31(6):1239-44.
42. Kessler M, Zannad F, Lehert P, Grunfeld JP, Thuilliez C, Leizorovicz A, et al. Preditores de eventos cardiovasculares em pacientes com doença renal em estágio terminal: uma análise do Fosinopril no estudo de diálise. *Nefrologia, diálise, transplante: publicação oficial da Associação Europeia de Diálise e Transplante - European Renal Association*. 2007;22(12):3573-9.
43. Iseki K, Arima H, Kohagura K, Komiya I, Ueda S, Tokuyama K, et al. Efeitos do bloqueio do receptor da angiotensina (ARB) sobre mortalidade e desfechos cardiovasculares em pacientes com hemodiálise a longo prazo: um ensaio controlado e randomizado. *Nefrologia, diálise, transplante: publicação oficial da Associação Europeia de Diálise e Transplante - European Renal Association*. 2013;28(6):1579-89.
44. Tomic JS, Duric Z, Popovic J, Buzadzic I, Dimkovic S, Dimkovic N. Polimorfismo da enzima conversora da angiotensina em pacientes com hemodiálise - associação com morbidade cardiovascular. *Medicinski pregled*. 2014;67(9-10):297-304.

## **ARTIGO 1**

## **ARTIGO 2**

### **Autonomic Response to a Hemodialysis Session and Survival in Kidney Failure Patients – A Prospective Cohort Study**

Larissa Ribas Ribeiro<sup>1,2</sup>

Rafael Bueno Orcy<sup>3,4</sup>

Daniel Alberto de Sousa Rocha Nogueira<sup>3</sup>

Maristela Böhlke<sup>1,2</sup>

1. Postgraduate Program in Health and Behavior, Catholic University of Pelotas, Pelotas, Brazil.
2. Dialysis and Transplantation Unit, University Hospital São Francisco de Paula, Catholic University of Pelotas, Pelotas, Brazil.
3. Postgraduate Program in Physiology, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil.
4. Postgraduate Program in Physical Education, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil.

## **Abstract**

**Background** Lower heart rate variability (HRV) has been associated with a higher rate of cardiovascular events and decreased survival among kidney failure patients. This study aimed to evaluate the association of the dynamic HRV response to a hemodialysis session with survival in a cohort of kidney failure patients. **Methods** A cohort of adult kidney failure patients treated at a hemodialysis unit was evaluated at baseline by HRV recorded before, intradialytic (HD 2nd hour) and after HD. The change in the frequency domains low-frequency (LF) absolute (LFabs), percentage LF (LF%), normalized LF (LFnu), high-frequency (HF) absolute (HFabs), percentage HF (HF%) normalized HF (HFnu) and LF/HF ratio during HD (from before to second hour, from second hour to post-HD and from before to post-HD) were analyzed as potential predictors of survival after up to 48 months, through adjusted Cox Proportional Hazards Model.

**Results** A total of 146 participants was included in the analysis, with median age of 57.8 (46.8-70.0) years, 60% male and 37% diabetic. There were 60 deaths during the follow-up. Patients who presented higher proportional increase in the LF band (greater increase in LF% and LFnu) during HD (2<sup>nd</sup> hour HD – before HD) had a higher survival time, both in crude and adjusted analysis. LFabs and HFabs were not predictor of survival. **Conclusion** Progressive preponderance of sympathetic activation (LFnu and LF%) during the first 2 hours of HD is associated with longer survival in kidney failure patients.

**ClinicalTrials.gov identifier NCT05273424**

## **Introduction**

Kidney failure is a worldwide public health problem. It is estimated in United States that one in seven individuals suffers from chronic kidney disease (CKD), which corresponds to 15% of all American adults or 37 million people.<sup>1</sup> Most patients with kidney failure are treated by hemodialysis (HD).<sup>2</sup> Despite being a life-sustaining therapy, hemodialysis patients present high mortality rates, with 40% of deaths from cardiovascular disease.<sup>3,4</sup> Hemodialysis patients suffer from both traditional and non-traditional cardiovascular risk factors, such as mineral and bone disorder,<sup>5</sup> impairment of the autonomic nervous system and volume overload. In addition, the hemodynamic stress imposed by HD contributes to the overall cardiovascular risk of kidney failure patients.<sup>6</sup>

Heart rate variability (HRV), defined as the time difference between successive heartbeats, is an important marker of autonomic nervous system (ANS) modulation on the cardiovascular system, reflecting the ability of the heart to respond to environmental stimuli. Decreased HRV is associated with adverse events and lower survival among kidney failure patients.<sup>7</sup> This association was investigated by a recent meta-analysis, including seven Asian, European, and American cohort studies, published between 2003 and 2018.<sup>8</sup> Five studies found an association between lower HRV and all-cause mortality,<sup>9-13</sup> and four found an association between decreased HRV and cardiovascular mortality.<sup>10,13-15</sup>

The hemodialysis procedure induces abrupt electrolytic and volume changes. Adequate sympathetic system activation is essential for responding to this hemodynamic challenge and maintaining blood pressure. Decreased plasma volume induces a lower frequency of signal from artery baroreceptors to the brainstem, leading to greater sympathetic discharge and parasympathetic suppression, with hemodynamic

stabilization.<sup>16,17</sup> However, impairment in baroreceptors sensitivity and autonomous nervous system in HD patients may compromise the physiological response to hypovolemia.<sup>18,19</sup> The analysis of HRV during HD sessions can be used as a proxy for a test of autonomous response known as inclination or tilt test. The tilt test has been used in clinical practice to detect impairment in the dynamic response of autonomous system present in several diseases.<sup>20,21</sup>

The aim of the present study is to evaluate the association between the autonomic response to the hemodialysis, by means of the change in frequency domains of HRV during the procedure, and the survival of kidney failure patients.

## **Methods**

This is a prospective cohort study enrolling all adult (18 years and older) kidney failure patients on maintenance hemodialysis thrice weekly for longer than three months at a Brazilian University Hospital. Patients diagnosed with arrhythmias, or pacemaker use were excluded. Enrolment took place from November 2017 to November 2021.

Patients who fulfilled the inclusion criteria and agreed to participate signed an informed consent form. The study protocol fully complied to the International Ethical Guidelines for Health-related Research Involving Humans, being approved by the Ethics Committee of the University where it was conducted under number 1,940,521. The cohort study is also registered in the ClinicalTrials.gov database under number NCT05273424.

The primary outcome was survival time after the HRV measurement. Follow-up lasted up to four years. The independent variables were changes in the HRV domains in low-frequency (LF) and high-frequency (HF) in absolute values (mV), percentage (%), normalized (nu) and LF/HF ratio during the HD procedure. Changes during HD were calculated as a post-HD measure – before HD and intradialytic (HD 2nd hour) – before HD. HRV was measured once for each patient at the time of study enrollment. Sociodemographic (sex, age, skin color) and clinical variables (age at HD treatment initiation, primary kidney disease, comorbidities, medications in use and body mass index) were recorded from the electronic medical record. Laboratory variables (calcium, creatinine, phosphate, hematocrit, potassium, sodium, urea, parathormone and albumin) were obtained before a midweek HD session in the same month in which HRV was measured.

## **Procedures**

**Hemodialysis** The HRV was recorded in a mid-week four-hour dialysis session. Dialysis blood flow rate was maintained at 350 to 400 mL/min, with dialysate flow at 500 mL/min. Fresenius 4008-S machines (Fresenius, Bad Homburg, Germany) and low-flux polysulfone dialyzers were used for the treatment.

**HRV Analysis** The measurement of HRV was performed in a midweek HD session at three different times: before the HD session, during the HD session (2<sup>nd</sup> hour), and after the HD session (up to 30 minutes). The patient remained in the supine position, with the lower and upper limbs away from the body, not using metallic devices. The analysis of the HRV was performed using the Wincardio® electrocardiogram (ECG) device (Micromed, São Paulo, Brazil). Each measurement was performed for 20 minutes. Patients who presented hemodynamic instability during or after the HD session had the analysis interrupted and repeated in another HD session. The ECG device records the intervals between heartbeats in text format, which is later analyzed in the Cardioseries® software, resulting in measures in the time and frequency domains. Measures in the frequency domain are related to the activity of the autonomic nervous system. The high-frequency domain mainly represents the parasympathetic nervous system, and the low-frequency domain represents both sympathetic and parasympathetic activity.<sup>20</sup> The tachogram obtained was interpolated at a frequency of 4Hz and divided into periods of 256 points with 50% overlap. These signals were submitted to spectral analysis by Fast Fourier Transformation (FFT) to obtain the total spectral power. Frequencies between 0.04 to 0.15Hz and 0.15 to 0.4Hz were considered as LF and HF, respectively.

**Statistical Analysis** The distribution of variables was tested by Shapiro-Wilk. Parametric variables were described as mean and standard deviation and skewed variables were described as median and interquartile range. Crude and adjusted survival analysis was performed using Cox Proportional Hazards Model. The regression model

was built by the backward elimination model. Patients who changed dialysis method, were transferred to another dialysis center, or received a kidney transplant were censored. The analysis was performed using the STATA 15.1 statistical package.

## **Results**

The cohort included a total of 146 kidney failure patients. The median age of the sample was 57.8 (46.8-70.0) years, 60.2% were male, 78% with white skin color and 37% diabetic. (Table 1) During the four years follow-up there were 60 deaths, with a 1-year mortality rate of 7% since the HD inception. (Figure 1)

During the hemodialysis there was a significant increase in the LF band and a marginal increase in the HF band of the HRV. Before HD, there was a similar distribution between the LF and HF bands, demonstrated by LFnu and HFnu each accounting for 50% of the total activity. This distribution changed in the 2nd hour of HD to a significant predominance of low-frequency bands, which remained until 30 minutes after the HD procedure. (Table 2) The increase in the LF band to maximum values occurred in the second hour of HD, decreasing after the HD session, despite remaining above the values obtained before HD. The increase in the HF band was continuous, attaining maximum values after the HD session. (Tables 2 and 3)

Patients who presented higher proportional increase in the LF band (greater increase in LF% and LFnu) during HD (post-HD – before HD) had a higher survival time, while the higher proportional increase in the HF band (higher HF% and HFnu) during HD was associated with lower survival. The absolute increase in the LF or HF bands (LFabs and HFabs) had no effect on survival. Similar results were found in the crude and adjusted analysis (Table 4).

Regarding the first two hours of HD (2nd hour HD – before HD), the relationship between the change in the proportion between the LF and HF bands with survival was the same as described for the total period, both in the crude and adjusted analysis. However, the change that occurred from mid-HD to after HD (after HD – 2nd hour HD) was not significant in adjusted analysis. (Table 5).

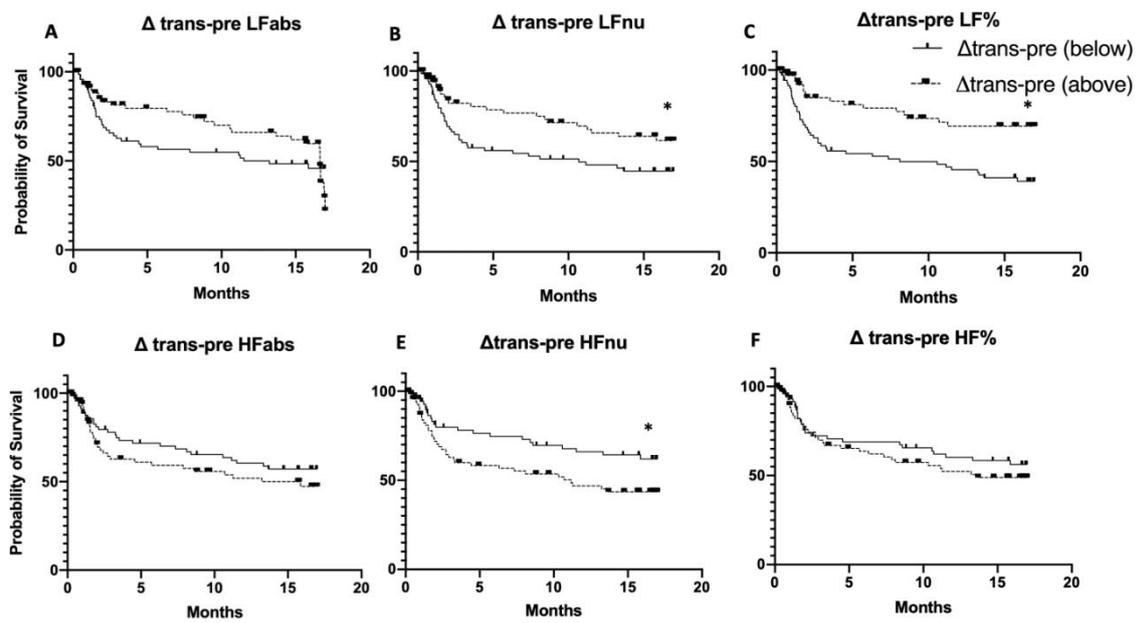


Figure 1 - Kaplan-Meier survival curves. Comparison of  $\Delta$ s (Deltas) trans-pre (Measurement trans-dialysis minus pre-dialysis) below *versus* above median or average. \* = p value < 0,05.

**Table 1.** Sample characteristics

Characteristics	n = 146
Men, n (%)	88 (60.2)
Age (year)	57.8 (46.8-70.7)
Age at the beginning of HD (year)	52.0 (41.3-65.5)
HD vintage (months)	9.5 (1.47-16.6)
Caucasian, n (%)	114 (78.0)
Diabetes, n (%)	54 (37.0)
Hypertension, n (%)	103 (70.5)
Body mass index (Kg/m <sup>2</sup> )	24.5 (21.4-27.0)
Beta-blockers, n (%)	56 (38.3)
Angiotensin-converter enzyme inhibitors, n (%)	10 (6.8)
Calcium channel blockers, n (%)	41 (28.1)
Angiotensin receptor blockers, n (%)	9 (6.1)
Calcium (mg/dL)	8.9 ± 0.8
Creatinine (mg/dL)	8.7 ± 2.8
Phosphorus (mg/dL)	4.8 ± 1.4
Haematocrit (%)	33.1 ± 5.7
Potassium (mEq/L)	5.3 (4.8-5.8)
Sodium (mEq/L)	138.3 ± 3.5
Urea (mg/dL)	117.5 ± 31.9
Parathyroid hormone (pg/mL)	314.5 (154-701)
Albumin (g/dL)	4.1 (3.9-4.4)

Results are expressed in median/ interquartile range (IQR), mean/ standard deviation (SD), or number (N) (%).

Table 2- Heart rate variability domains.

	pre-HD (n=142)	trans-HD (n=142)	post-HD (n=142)	p
LFabs	66.2 (23.5-197.3)	119.5 (23.5-304.6) <sup>a</sup>	99.3 (34.6-296.9) <sup>a</sup>	<0.0001 <sup>#</sup>
HFabs	44.6 (13.4-122.7)	53.9 (14.7-217.3)	64.8 (19.0-158.0)	0.09 <sup>#</sup>
LF%	31.6 ± 11.3	31.8 ± 12.8	33.3 ± 12.3	0.14 <sup>##</sup>
HF%	29.0 (17.0-50.2)	24.0 (14.0-47.0) <sup>a</sup>	25.5 (15.0-47.0)	0.006 <sup>#</sup>
LFnu	50.5 (34.7-69.0)	57.5 (34.7-74.0)	57.5 (35.0-73.0)	0.08 <sup>#</sup>
HFnu	49.5 (31.0-65.2)	42.5 (26.0-65.2)	42.5 (27.0-65.0)	0.09 <sup>#</sup>
LF/HF	1.6 (0.7-3.7)	1.9 (0.7-4.3)	1.9 (0.7-4.3)	0.15 <sup>#</sup>

a= diferença comparado ao pré; #= Friedman test; ##= Anova RM one-Way

Table 3- Values of differences (delta) of heart rate variability.

	delta (post-pre) (n=142)	delta (trans-pre) (n=142)	delta (post-trans) (n=142)	p
LFabs	15.5 (-28.9-148.3)	26.0 (-6.4-118.4) <sup>a</sup>	1.7 (-62.0-56.2) <sup>a</sup>	0.0005 <sup>#</sup>
HFabs	3.0 (-22.2-60.5)	4.2 (-21.7-83.7)	1.1 (-34.8-40.7)	0.17 <sup>#</sup>
LF%	1.5 (-6.0-9.2)	0 (-6.0-6.0)	3.0 (-4.0-8.0) <sup>b</sup>	0.0498 <sup>#</sup>
HF%	-3.0 (-13.0-8.0)	-3.0 (-14.2-6.0)	2.0 (-6.0-7.2) <sup>b</sup>	0.0009 <sup>#</sup>
LFnu	3.0 (-8.0-14.0)	3.0 (-6.5-13)	0 (-8.0-6.2) <sup>b</sup>	0.02 <sup>#</sup>
HFnu	-3.0 (-14.0-8.0)	-2.5 (-13.0-6.5)	0 (-7.0-8.0) <sup>b</sup>	0.03 <sup>#</sup>
LF/HF	0.2 (-0.6-1.4)	0.2 (-0.5-1.9)	0 (-0.9-0.8)	0.21 <sup>#</sup>

a= diferença comparado ao delta pós-pré

b= diferença comparado ao delta trans-pré

#= Friedman test;

Table 4. Delta (post-pre) - Cox regression analysis.

	delta (post-pre)			delta (post-pre) – adjusted†		
	HR	CI	p	HR	CI	p
LFabs	1.000	(0.99-1.00)	0.766	1.000	(0.99-1.00)	0.536
HFabs	1.000	(0.99-1.00)	0.245	1.000	(0.99-1.00)	0.177
LF%	0.977	(0.95-0.99)	0.035*	0.976	(0.95-0.99)	0.038*
HF%	1.014	(1.00-1.02)	0.016*	1.013	(1.00-1.02)	0.030*
LFnu	0.985	(0.97-0.99)	0.020*	0.985	(0.97-0.99)	0.027*
HFnu	1.015	(1.00-1.02)	0.021*	1.014	(1.00-1.02)	0.028*
LF/HF	0.923	(0.84-1.00)	0.078	0.933	(0.84-1.02)	0.157

† Cox Regression adjusted to age and diabetes. \* Significant difference. HR= hazard ratio. CI= Confidence Interval.

Table 5. Delta (trans-pre) - Cox regression analysis.

	delta (trans-pre)			delta (trans-pre) – adjusted†		
	HR	CI	p	HR	CI	p
LFabs	0.999	(0.99-1.00)	0.102	0.999	(0.99-1.00)	0.621
HFabs	0.999	(0.99-1.00)	0.688	0.999	(0.99-1.00)	0.984
LF%	0.974	(0.95-0.99)	0.037*	0.974	(0.95-0.99)	0.044*
HF%	1.015	(1.00-1.02)	0.010*	1.014	(1.00-1.02)	0.019*
LFnu	0.982	(0.97-0.99)	0.005*	0.983	(0.97-0.99)	0.010*
HFnu	1.018	(1.00-1.03)	0.004*	1.017	(1.00-1.03)	0.009*
LF/HF	0.916	(0.84-0.99)	0.040	0.926	(0.84-1.01)	0.088

† Cox Regression adjusted to age and diabetes. \* Significant difference. HR= hazard ratio. CI= Confidence Interval.

Table 6. Delta (trans-pre) - Cox regression analysis.

	delta (post-trans)			delta (post-trans) – adjusted†		
	HR	CI	p	HR	CI	p
LFabs	1.000	(0.99-1.00)	0.102	1.000	(0.99-1.00)	0.331
HFabs	1.000	(0.99-1.00)	0.688	1.000	(0.99-1.00)	0.203
LF%	0.997	(0.97-1.02)	0.037*	0.997	(0.97-1.02)	0.875
HF%	0.999	(0.98-1.01)	0.010*	0.998	(0.98-1.01)	0.893
LFnu	1.004	(0.98-1.02)	0.005*	1.003	(0.98-1.01)	0.649
HFnu	0.995	(0.98-1.01)	0.004*	0.996	(0.98-1.01)	0.635
LF/HF	1.023	(0.93-1.12)	0.040	1.031	(0.93-1.14)	0.539

† Cox Regression adjusted to age and diabetes. HR= hazard ratio. CI= Confidence Interval.

## Discussion

The main finding of the present cohort study is that the response of the heart to the autonomic modulation during the hemodialysis procedure, assessed by HRV, is a significant predictor of survival among kidney failure patients, even after adjusting for main risk factors.

Decreased HRV in rest has already been associated with poorer survival among HD patients, in addition to patients with heart diseases (HF<sup>5</sup>, myocardial infarction<sup>22</sup>), stroke<sup>23</sup>, trauma<sup>24</sup>, cancer<sup>25,26</sup>, and even the general population<sup>27</sup>. This overall decrease in HRV has been attributed, among other factors, to the intense and/or prolonged sympathetic stimulation<sup>28</sup>. A physiological mild sympathetic stimulation, as occurs during decreasing plasma volume/blood pressure during hemodialysis, may have the opposite effect of increasing heart rate and the low-frequency component of HRV<sup>29</sup>.

However, kidney failure patients usually present alterations in autonomic control of the CV system, due to impaired baroreceptors and volume reflex function and to pathological changes in the cardiovascular system itself<sup>30</sup>. Previous studies have already shown that patients with diabetes<sup>31</sup>, peripheral artery disease<sup>32</sup> or previous stroke<sup>33</sup> are unable to increase the low-frequency band of the HRV during HD. Other known cardiovascular risk factors, such as hypercholesterolemia, anemia and overhydration, have also been associated with blunted LF increase during HD<sup>34-36</sup>. Our group have previously demonstrated that genetic factors are also associated with the autonomic response to hemodialysis, showing that patients with the polymorphism DD of ACE gene present blunted sympathetic response to volume removal during HD<sup>19</sup>. The failure to increase LF component during HD has been associated with hypotension, one of the main HD complications and an independent risk factor for mortality<sup>37,38</sup>.

In conclusion, the association between poor sympathetic response to the volume challenge during HD and lower survival may be explained by the comorbidities and risk factors that compromise this compensatory mechanism or may contribute by itself increasing the intradialytic hypotensive complications. Previous authors have already described in different populations this association between flattened slope of the LF component during HD and higher mortality<sup>39,40</sup>.

In addition, we found that the greatest sympathetic response occurs around the second hour of the procedure, probable because during the first hours of dialysis most of the fluid removed comes from the plasma volume. The autonomic response is a key adaptative factor in such circumstance. After that point, refilling from interstitial and intra-cellular liquid usually begin.

The studied sample presented decreased HRV compared to general population, both before and after the hemodialysis procedure. However, there was a significant increase in all parameters during dialysis. The diffusive component of the hemodialysis session seems to temporarily clear plasma from uremic toxins which attenuate  $\beta$ -adreno and muscarinic receptor activity and remove accumulated volume, which increase HRV, mainly in the sympathetic domain<sup>41,42</sup>. More frequent hemodialysis sessions<sup>43</sup> or kidney transplantation<sup>44</sup> are associated with even greater increases in heart rate variability. Despite some previous studies have described that the hemodialysis procedure may improve the autonomic profile, including baroreflex sensitivity, there is inconsistency in this finding<sup>45,46</sup>. This discrepancy may be due to difference in the studied patients, such as HD vintage (longer uremic state is associated with irreversible neuropathy) and volume overload before HD (increasing central blood volume and consequently decreasing volume reflex performance)<sup>47</sup>.

The main limitations in this analysis are the technical difficulties with heart rate variability measurements, which reduced the number of samples available for analysis. HRV analysis per se present large variability in results, which may arise from the methods of correcting errors and from underlying physiological basis<sup>47</sup>. In addition, HRV reflects the fidelity with which heart sinoatrial receptors respond to sympathetic and vagal discharge, and not necessarily reflect the real sympathetic nerve firing.

The strong point is the long follow-up of the participants and the multiple time points sampled, enabling the analysis of the effects of dialysis stages on heart rate variability.

The present study corroborates preliminary literature data that the autonomic response to the hemodialysis procedure is an important and independent predictor of survival among dialysis patients. Based on this finding, HRV should be more frequently measured in this population, to estimate prognosis and maybe conceive measures capable of change this dysfunctional response. In addition, lower HRV might imply the need for more effective renal replacement therapy, considering that kidney transplantation and hemodialysis improve heart rate variability.

## REFERENCIAS

1. <https://www.cdc.gov/kidneydisease/publications-resources/CKD-national-facts.html>
2. Centers for Disease Control and Prevention. (2019). U.S. Census populations with bridged race categories. Retrieved August 4, 2020 from [https://www.cdc.gov/nchs/nvss/bridged\\_race.htm](https://www.cdc.gov/nchs/nvss/bridged_race.htm)
3. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu CY. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med.* 2004 Sep 23;351(13):1296-305.
4. Levey AS, Eckardt KU, Tsukamoto Y, Levin A, Coresh J, Rossert J, De Zeeuw D, Hostetter TH, Lameire N, Eknoyan G. Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int.* 2005 Jun;67(6):2089-100.
5. Wu L, Jiang Z, Li C, Shu M. Prediction of heart rate variability on cardiac sudden death in heart failure patients: a systematic review. *Int J Cardiol.* 2014 Jul 1;174(3):857-60
6. Ahmadmehrabi S, Tang WHW. Hemodialysis-induced cardiovascular disease. *Semin Dial.* 2018 May;31(3):258-267. Epub 2018 Apr 6. PMID: 29624739; PMCID: PMC6023623.
7. Rajendra Acharya U, Paul Joseph K, Kannathal N, Lim CM, Suri JS. Heart rate variability: a review. *Med Biol Eng Comput.* 2006 Dec;44(12):1031-51. Epub 2006 Nov 17. PMID: 17111118.
8. Yang L, Zhao Y, Qiao B, Wang Y, Zhang L, Cui T, Fu P. Heart Rate Variability and Prognosis in Hemodialysis Patients: A Meta-Analysis. *Blood Purif.* 2021;50(3):298-308. Epub 2020 Dec 8. PMID: 33291108.

9. Suzuki M, Hiroshi T, Aoyama T, Tanaka M, Ishii H, Kisohara M, Iizuka N, Murohara T, Hayano J. Nonlinear measures of heart rate variability and mortality risk in hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2012 Sep;7(9):1454-60. Epub 2012 Jun 21. PMID: 22723446; PMCID: PMC3430947.
10. Oikawa K, Ishihara R, Maeda T, Yamaguchi K, Koike A, Kawaguchi H, Tabata Y, Murotani N, Itoh H. Prognostic value of heart rate variability in patients with renal failure on hemodialysis. *Int J Cardiol*. 2009 Jan 24;131(3):370-7. Epub 2008 Jan 15. PMID: 18199499.
11. Badarau S, Siriopol D, Drugus D, Dumea R, Hogas S, Blaj M, Voroneanu L, Gramaticu A, Petris A, Burlacu A, Covic A. Electrocardiogram abnormalities and heart rate variability in predicting mortality and cardiovascular events among hemodialyzed patients. *Int Urol Nephrol*. 2015 Oct;47(10):1703-8. Epub 2015 Sep 2. PMID: 26329736.
12. Kuo G, Chen SW, Huang JY, Wu CY, Fu CM, Chang CH, Liu SH, Chan YH, Wu IW, Yang HY. Short-term heart rate variability as a predictor of long-term survival in patients with chronic hemodialysis: A prospective cohort study. *J Formos Med Assoc*. 2018 Dec;117(12):1058-1064. Epub 2018 Oct 5. PMID: 30293929.
13. Chen SC, Huang JC, Tsai YC, Hsiu-Chin Mai RN, Jui-Hsin Chen RN, Kuo PL, Chang JM, Hwang SJ, Chen HC. Heart Rate Variability Change Before and After Hemodialysis is Associated with Overall and Cardiovascular Mortality in Hemodialysis. *Sci Rep*. 2016 Feb 8;6:20597. PMID: 26854202; PMCID: PMC4745005.
14. Fukuta H, Hayano J, Ishihara S, Sakata S, Mukai S, Ohte N, Ojika K, Yagi K, Matsumoto H, Sohmiya S, Kimura G. Prognostic value of heart rate variability in

- patients with end-stage renal disease on chronic haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant*. 2003 Feb;18(2):318-25. PMID: 12543887.
15. Cashion AK, Holmes SL, Arheart KL, Acchiardo SR, Hathaway DK. Heart rate variability and mortality in patients with end stage renal disease. *Nephrol Nurs J*. 2005 Mar-Apr;32(2):173-84. PMID: 15889802.
  16. Spyer KM, Lambert JH, Thomas T. Central nervous system control of cardiovascular function: neural mechanisms and novel modulators. *ClinExp Pharmacol Physiol* 24: 743–747, 1997.
  17. Vink EE, de Jager RL, Blankestijn PJ. Sympathetic hyperactivity in chronic kidney disease: pathophysiology and (new) treatment options. *Curr Hypertens Rep* 15: 95–101, 2013.
  18. La Rovere MT, Bigger JT Jr, Marcus FI, Mortara A, Schwartz PJ; ATRAMI (Autonomic Tone and Reflexes After Myocardial Infarction) Investigators. Baroreflex sensitivity and heart-rate variability in prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction. *Lancet* 351: 478–484, 1998.
  19. Ribas Ribeiro L, Flores de Oliveira J, Bueno Orcy R, Castilho Barros C, Damé Hense J, Santos F, Irigoyen MC, Gonzalez MC, Osés JP, Böhlke M. Exploring the complexity: the interplay between the angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and the sympathetic response to hemodialysis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2018 Oct 1;315(4):H1002-H1011. Epub 2018 Jun 27. PMID: 29949384.
  20. Cheshire WP Jr, Goldstein DS. Autonomic uprising: the tilt table test in autonomic medicine. *Clin Auton Res*. 2019 Apr;29(2):215-230. Epub 2019 Mar 5. PMID: 30838497; PMCID: PMC8897774.

21. Young HA, Benton D. Heart-rate variability: a biomarker to study the influence of nutrition on physiological and psychological health? *Behav Pharmacol.* 2018 Apr;29(2 and 3-Spec Issue):140-151.PMID: 29543648; PMCID: PMC5882295.
22. Kleiger RE, Miller JP, Bigger JT Jr, Moss AJ. Decreased heart rate variability and its association with increased mortality after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 1987 Feb 1;59(4):256–62.
23. Yperzeele L, van Hooff RJ, Nagels G, De Smedt A, De Keyser J, Brouns R. Heart rate variability and baroreceptor sensitivity in acute stroke: a systematic review. *Int J Stroke.* 2015 Aug;10(6):796–800.
24. Liu NT, Holcomb JB, Wade CE, Salinas J. Improving the prediction of mortality and the need for life-saving interventions in trauma patients using standard vital signs with heart-rate variability and complexity. *Shock.* 2015 Jun;43(6):549–55.28
25. Kim K, Chae J, Lee S. The role of heart rate variability in advanced non-small-cell lung cancer patients. *J Palliat Care.* 2015;31(2):103–8.29
26. Zhou X, Ma Z, Zhang L, Zhou S, Wang J, Wang B, et al. Heart rate variability in the prediction of survival in patients with cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Psychosom Res.* 2016 Oct; 89:20–5.30 Sen J, McGill D.
27. Fractal analysis of heart rate variability as a predictor of mortality: a systematic review and meta-analysis. *Chaos.* 2018 Jul;28(7):072101
28. Kim YH, Ahmed MW, Kadish AH, Goldberger JJ: Characterization of factors that determine the effect of sympathetic stimulation on heart rate variability. *Pacing Clin Electrophysiol*20(8 Pt 1):1936–1946, 1997
29. Saul JP, Rea RF, Eckberg DL, Berger RD, Cohen JC: Heart rate and muscle sympathetic nerve variability during reflex changes of autonomic activity. *Am J Physiol*258 (Heart Circ Physiol 27):H713–H721, 1990

30. Rubinger D, Backenroth R, Sapoznikov D. Sympathetic Nervous System Function and Dysfunction in Chronic Hemodialysis Patients. *Semin Dial.* 2013;26(3):333-343.
31. Zitt E, Neyer U, Meusburger E, Tiefenthaler M, Kotanko P, Mayer G, et al. (2008). Effect of dialysate temperature and diabetes on autonomic cardiovascular regulation during hemodialysis. *Kidney Blood Press. Res.*31,217–225. doi: 10.1159/000141926
32. Chen S-C, Huang J-C, Kuo I-C, et al. Heart Rate Variability Predicts Major Adverse Cardiovascular Events and Hospitalization in Maintenance Hemodialysis Patients. *Kidney Blood Press Res.* 2017;42:76-88.
33. Huang J-C, Chen C-F, Chang C-C, et al. Effects of stroke on changes in heart rate variability during hemodialysis.
34. Ferrario M, Moissl U, Garzotto F, Cruz DN, Tetta C, Signorini MG, et al. (2015). The forgotten role of central volume in low frequency oscillations of heart rate variability. *PLoS One*10:e0120167.
35. Niu SW, Huang JC, Chen SC, Lin HYH, Kuo IC, Wu PY, Chiu YW et al. Association between Age and Changes in Heart Rate Variability after Hemodialysis in Patients with Diabetes. *Diabetes Front Aging Neurosci.* 2018;10:43.
36. Ferrario M, Moissl U, Garzotto F, et al. Effects of Fluid Overload on Heart Rate Variability in Chronic Kidney Disease Patients on Hemodialysis.; 2014.
37. Javed F, Savkin AV, Chan GSH, Mackie JD, Lovell NH: Recent advances in the monitoring and control of haemodynamic variables during haemodialysis: a review. *Physiol Meas*33(1):R1–R31,201275.
38. Henderson LW: Symptomatic intradialytic hypotension and mortality: an opinionated review. *Semin Dial,* 25(3):320–325, 2012

39. Chen SC, Huang JC, Tsai YC et al., Heart rate variability change before and after hemodialysis is associated with overall and cardiovascular mortality in hemodialysis, *Scientific Reports*, vol. 6, 2016
40. Chang Y-M, Huang Y-T, Chen I-L, et al. Heart rate variability as an independent predictor for 8-year mortality among chronic hemodialysis patients. 2010;(100).
41. Runbinger D, Revis N, Pollak A, Luria MH, Saponznikov. Predictors of haemodynamic instability and heart rate variability during hemodialysis. *Nephrol Dial Transplant*. 2004; 19: 2053-60.
42. Barnas MG, Boer WH, Koomans HA. Hemodynamic patterns and spectral analysis of heart rate variability during dialysis hypotension. *J Am Soc Nephrol*. 1999; 10 (12): 2577-2584.
43. Chan CT, Chertow GM, Daugirdas JT, Greene TH, Kotanko P, Larive B, Pierratos A, Stokes JB; Frequent Hemodialysis Network Daily Trial Group. Effects of daily hemodialysis on heart rate variability: results from the Frequent Hemodialysis Network (FHN) Daily Trial. *Nephrol Dial Transplant* 2014; 29:168-78
44. Rubinger D, Pollak A, Popovtzer MM, Luria MMH. Heart rate variability during chronic hemodialysis and after renal transplantation: studies in patients without and with systemic amyloidosis. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10:1972-81
45. Rosansky SJ, Rhinehart R, Whittman D, Menachery SJ (1995) Comparison of autonomic function using Valsalva ratio and 30:15 postural ratio prior to and after haemodialysis treatment. *Clin Auton Res* 5(3):151–15432.
46. Zucchelli P, Santoro A, Sturani A, Degli Esposti E, Chiarini C, Zuccalà A (1984) Effects of haemodialysis and hemofiltration on autonomic control of circulation. *Trans Am Soc Art Intern Organs* 30(1):163–167

47. Stewart J, Stewart P, Walker T, et al. Application of the Lomb-Scargle Periodogram to Investigate Heart Rate Variability during Haemodialysis. *J Health Eng* 2020: 8862074.

## **ANEXOS**

## ***ANEXO I – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO***

### **UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PELOTAS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E COMPORTAMENTO**

#### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

##### **Informações sobre o estudo ao participante**

Antes de participar deste estudo, gostaríamos que você tomasse conhecimento do que ele envolve. Damos abaixo alguns esclarecimentos sobre dúvidas que você possa ter.

**Qual é o objetivo da pesquisa?** Este estudo busca compreender as possíveis causas relacionadas ao aumento da mortalidade cardiovascular dos pacientes renais crônicos em tratamento por hemodiálise e contribuir com o melhor tratamento a estes pacientes.

**Como o estudo será realizado?** Será aplicado um questionário para colher algumas informações sobre você, incluindo as medicações que você utiliza e doenças que possui, após você será pesado e será realizado um eletrocardiograma (exame do coração), um exame de bioimpedância, no qual uma pequena corrente elétrica atravessa seu corpo, e uma amostra de sangue será colhida através da agulha da fístula ou do cateter.

**Existem riscos em participar?** Este estudo implica em riscos mínimos para você, pois o único procedimento que poderia doer (coleta de sangue) será feito como de costume antes da sessão de hemodiálise, os demais procedimentos são indolores e não oferecem riscos a sua saúde.

##### **Itens importantes:**

Você tem a liberdade de desistir do estudo a qualquer momento, sem fornecer qualquer motivo ou explicação. Sua atitude em desistir do estudo, de maneira alguma irá influenciar na qualidade de seu atendimento no nosso serviço.

**O que eu ganho com este estudo?** A partir dos resultados desta pesquisa, você poderá se beneficiar com tratamento adequado às suas condições de saúde.

**Quais são os meus direitos?** Os resultados deste estudo poderão ser publicados em jornais científicos ou submetidos à autoridade de saúde competente, mas você não será identificado e o sigilo será mantido. Sua participação neste estudo é totalmente voluntária.

##### **DECLARAÇÃO:**

Eu,.....declaro que:

1. Concordo total e voluntariamente em fazer parte deste estudo.
2. Recebi uma explicação completa do objetivo do estudo, dos procedimentos envolvidos e o que se espera de mim.

Assinatura do Paciente: \_\_\_\_\_

Data: \_\_ \_\_ / \_\_ \_\_ / \_\_ \_\_

Assinatura do Pesquisador: \_\_\_\_\_

Para maiores informações entre em contato com Larissa Ribas através do número (53) 8109-3055

## ***ANEXO II - QUESTIONÁRIO SOCIODEMOGRÁFICO E CLÍNICO***

### **QUESTIONÁRIO SOCIODEMOGRÁFICO E CLÍNICO**

**Número do Questionário:** | \_ \_ \_ |

**Data da avaliação:** | \_ \_ / \_ \_ / \_ \_ \_ \_ |

**Data de nascimento:** | \_ \_ / \_ \_ / \_ \_ \_ \_ |

**Sexo:** ( ) 0 – masculino ( ) 1 – feminino

**Estado civil:** ( ) 0 – solteiro ( ) 1 – casado ( ) 2 – divorciado ( ) 3 – viúvo ( ) 4 – vive com companheiro

**Cidade onde reside:** ( ) 0 – Pelotas ( ) 1 – outra

**Profissão:** \_\_\_\_\_

**Recebe algum benefício, qual/quais?** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
**Tipo de moradia:** ( ) 0 – própria ( ) 1 – alugada ( ) 2 – mora com familiares

**Há quanto tempo faz hemodiálise** \_ \_ anos e \_ \_ meses

**Outras doenças:** Hipertensão/ Diabetes/ Doença cardiovascular/ Doença Renal Policística \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
**Faz uso de medicações, quais?**

\_\_\_\_\_

**ANEXO III - CARTA DE AUTORIZAÇÃO PARA REALIZAÇÃO DO ESTUDO  
(SERVIÇO DE DIÁLISE E TRANSPLANTE RENAL)**



Programa de Pós-Graduação em  
Saúde e Comportamento

Mestrado e Doutorado  
Universidade Católica de Pelotas

**Pelotas, 3 de outubro de 2016.**

**“Ao Serviço de Diálise e Transplante Renal”**

Venho por meio deste solicitar autorização para pesquisa intitulada “IMPACTO DO POLIMORFISMO DO GENE DA ENZIMA CONVERSORA DA ANGIOTENSINA NA VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA EM PACIENTES PORTADORES DE DOENÇA RENAL CRÔNICA EM TRATAMENTO POR HEMODIÁLISE” sob orientação da Prof<sup>ª</sup>. Dra. Maristela Bohlke, a ser realizada neste serviço.

---

Larissa Ribas Ribeiro

---

Maristela Bohlke

**ANEXO IV - CARTA DE AUTORIZAÇÃO PARA REALIZAÇÃO DO ESTUDO  
(HOSPITAL UNIVERSITÁRIO SÃO FRANCISCO DE PAULA)**



Programa de Pós-Graduação em  
Saúde e Comportamento  
Mestrado e Doutorado  
Universidade Católica de Pelotas



**Pelotas, 3 de outubro de 2016.**

**“Ao Hospital Universitário São Francisco de Paula (HUSFP)”**

Venho por meio deste solicitar autorização para pesquisa intitulada “IMPACTO DO POLIMORFISMO DO GENE DA ENZIMA CONVERSORA DA ANGIOTENSINA NA VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA EM PACIENTES PORTADORES DE DOENÇA RENAL CRÔNICA EM TRATAMENTO POR HEMODIÁLISE” sob orientação da Prof<sup>ª</sup>. Dra. Maristela Bohlke, a ser realizada no Serviço de Diálise e Transplante Renal desta instituição.

---

Larissa Ribas Ribeiro

---

Maristela Bohlke