

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

**PRISCILLA CARDIM FERNANDES**

AVALIAÇÃO DA ACIDIFICAÇÃO URINÁRIA EM PORTADORES DE AMILOIDOSE  
HEREDITÁRIA POR MUTAÇÃO DA TRANSTIRRETINA (ATTRv)

RIO DE JANEIRO

2023

PRISCILLA CARDIM FERNANDES

**AVALIAÇÃO DA ACIDIFICAÇÃO URINÁRIA EM PORTADORES DE AMILOIDOSE  
HEREDITÁRIA POR MUTAÇÃO DA TRANSTIRRETINA (ATTRv)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica, pela Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Medicina.

Orientadores:

Prof. Dr. Carlos Perez Gomes

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marcia Waddington Cruz

RIO DE JANEIRO

2023



## FICHA CATALOGRÁFICA

### CIP - Catalogação na Publicação

F363a FERNANDES, PRISCILLA  
AVALIAÇÃO DA ACIDIFICAÇÃO URINÁRIA EM PORTADORES  
DE AMILOIDOSE HEREDITÁRIA POR MUTAÇÃO DA  
TRANSTIRRETINA (ATTRv) / PRISCILLA FERNANDES. --  
Rio de Janeiro, 2023.  
113 f.

Orientadora: Marcia Waddington-Cruz.  
Coorientadora: Carlos Perez Gomes.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do  
Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina, Programa de  
Pós-Graduação em Clínica Médica, 2023.

1. Amiloidose hereditária . 2. Acidificação  
urinária . 3. Transtirretina. 4. Acidose tubular  
renal . I. Waddington-Cruz, Marcia, orient. II.  
Perez Gomes, Carlos, coorient. III. Título.

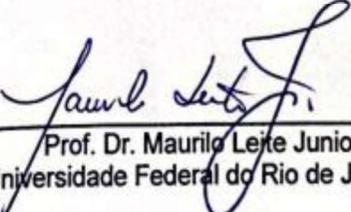
Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos  
pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

PRISCILLA CARDIM FERNANDES

**AVALIAÇÃO DA ACIDIFICAÇÃO URINÁRIA EM PORTADORES DE AMILOIDOSE  
HEREDITÁRIA POR MUTAÇÃO DA TRANSTIRRETINA (ATTRv)**

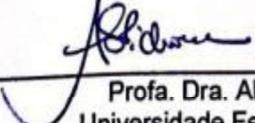
Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Medicina.

Aprovada em 17 de abril de 2023.



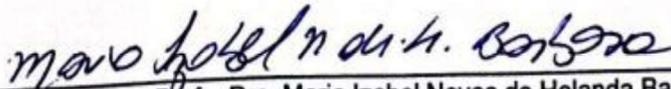
---

Prof. Dr. Maurilo Leite Junior  
Universidade Federal do Rio de Janeiro



---

Profa. Dra. Alinie da Silva Pichone  
Universidade Federal do Rio de Janeiro



---

Profa. Dra. Maria Izabel Neves de Holanda Barbosa  
Hospital Federal de Bonsucesso

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho a todos os participantes da pesquisa que permitiram acesso aos seus dados e cooperaram prontamente, visando a evolução da ciência; à professora Marcia Waddington Cruz, um exemplo de retidão e disciplina na vida profissional e ao professor Carlos Perez Gomes, um grande mestre em tubulopatias, que me proporcionou a oportunidade de realizar esse estudo relevante, trazendo-me um imensurável crescimento em minha prática médica.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha mãe, Sandra Gomes Cardim, que tanto se esforçou para oferecer as condições necessárias para que eu trilhasse o caminho que tanto desejei, além de ser o meu maior exemplo de docência.

Ao meu marido querido e companheiro de jornada Guilherme Moura da Silva Ferreira, que nunca hesitou em demonstrar seu apoio incondicional às minhas escolhas e que diversas vezes se sobrecarregou com nossas responsabilidades para que eu pudesse ter tempo de me dedicar ao meu propósito.

Aos meus filhos Antônio e Betina que, com sua alegria, são o combustível necessário para me impulsionar a trilhar o caminho desejado e fomentam diariamente a minha busca por um mundo melhor, onde eu possa ser exemplo para eles, além de qualificada e acessível às pessoas que mais necessitam.

## RESUMO

A amiloidose hereditária por mutação da transtirretina (ATTRv) é uma doença sistêmica, progressiva e incapacitante de caráter autossômico dominante e penetrância variável. É a forma mais comum de amiloidose hereditária (familiar). A apresentação clínica é predominantemente neurológica e cardíaca, mas já foi comprovado depósito amiloide nos compartimentos glomerular e tubulointersticial dos rins. Portanto, distúrbios de acidificação urinária como a acidose tubular renal (ATR) podem ser manifestações precoces de acometimento renal nesta população. O objetivo deste estudo foi avaliar a prevalência de ATR subclínica em indivíduos portadores de ATTRv que fazem parte do Centro de Estudos em Paramiloidose Antônio Rodrigues de Mello (CEPARM), situado no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Incluímos em caráter seccional indivíduos acompanhados ambulatorialmente já sintomáticos da ATTRv e também carreadores assintomáticos, maiores de 18 anos, com TFG > 45 ml/min/1,73m<sup>2</sup> (estimada pela equação CKD-EPI), sem acidose metabólica sistêmica. Após 12h de restrição hídrica (TRH), coletamos amostras de sangue venoso para bioquímica, gasometria e amostras de urina para análise por fita reagente, gasometria, pH urinário (pHu) por potenciometria (0h, 1h, 2h, 3h e 4h), amônio urinário (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) por espectrofotometria e acidez titulável (AT) por NaOH (0h e 4h, respectivamente). Protocolo de acidificação urinária foi realizado com furosemida e fludrocortisona. Acidose Tubular Proximal (ATRp) foi diagnosticada se FEHCO<sub>3</sub> > 10%. Acidose Tubular Distal (ATRd) forma incompleta foi diagnosticada se pHu > 5,3 em todas as medidas com ausência de aumento de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ou AT. Análise estatística foi realizada através de testes de Wilcoxon, Friedman, correlação linear simples e curva ROC. Avaliamos 49 indivíduos, 40(35,5-56,5) anos, 63% mulheres, 84% caucasianos, IMC 24,9±4,9kg/m<sup>2</sup>, TFG 85,5±20,5ml/min/1.73m<sup>2</sup>, ausência de proteinúria patológica ou acidose metabólica. 94% apresentavam variante genética Val50Met. 57% dos indivíduos eram sintomáticos. A prevalência de ATRp foi de 2% (n=1). A prevalência de ATRd forma incompleta foi de 16,3% (n=8) com curva de pHu com as seguintes medianas: 0h 6,0; 1h 6,2; 2h 6,3; 3h 5,7; 4h 6,1 (p=0,477). No subgrupo com ATRd não houve aumento significativo nas excreções urinárias de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e AT: NH<sub>4</sub><sup>+</sup> de 46,2(28,4-75,4)

$\mu\text{Eq}/\text{min}/1,73\text{m}^2$  para 64,3(28,3-84,2)  $\mu\text{Eq}/\text{min}/1,73\text{m}^2$ , ( $p=0,742$ ) e AT de 18,1(15,1-23,6)  $\mu\text{Eq}/\text{min}/1,73\text{m}^2$  para 17,7(15,9-24,5)  $\mu\text{Eq}/\text{min}/1,73\text{m}^2$  ( $p=0,945$ ). Observamos boa correlação entre pHu por potenciometria versus pHu fita reagente (*Spearman's Rho* 0,797,  $R^2$  0,827;  $p<0,0001$ ). O  $\text{pHu}<5,5$  na fita reagente teve 100% de sensibilidade e VPN para afastar ATRd forma incompleta (AUC 0,909;  $p<0,001$ ). Portanto, este é o primeiro trabalho a demonstrar ATR em indivíduos portadores de ATTRv. O pHu na fita reagente após TRH teve boa acurácia para triagem de ATRd forma incompleta. Novos estudos são necessários para avaliar o impacto do diagnóstico e tratamento precoces de ATR nesta população.

Palavras-chave: 1. Amiloidose hereditária. 2. Transtirretina. 3. Amiloidose renal 4. Acidose tubular renal 5. Acidose tubular renal distal

## ABSTRACT

Hereditary transthyretin amyloidosis (ATTRv) is a systemic, progressive, disabling disease of autosomal dominant character and variable penetrance. It is the most common form of inherited (familial) amyloidosis. The clinical presentation is predominantly neurological and cardiac, but amyloid deposition has been proven in the glomerular and tubulointerstitial compartments of the kidneys. Therefore, urinary acidification disorders such as renal tubular acidosis (RTA) may be early manifestations of renal involvement in this population. This study aimed to evaluate the prevalence of subclinical RTA in patients with ATTRv who part of the Centro de Estudos em Paramiloidose Antônio Rodrigues de Mello (CEPARM), located at the University Hospital Clementino Fraga Filho from Federal University of Rio de Janeiro. We included outpatients with ATTRv, older than 18 years, with  $GFR > 45 \text{ ml/min/1.73m}^2$  (estimated by the CKD-EPI equation), without systemic metabolic acidosis. After 12h of water deprivation (WDT), we collected venous blood samples for biochemistry, blood gas and urine samples for analysis by dipstick, urinary pH (UpH) by potentiometry (0h, 1h, 2h, 3h and 4h), urinary ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) by spectrophotometry and titratable acidity (TA) by NaOH (0h and 4h, respectively). Urinary acidification protocol was performed with furosemide and fludrocortisone. Proximal Tubular Acidosis (pRTA) was diagnosed if  $\text{FE}_{\text{HCO}_3} > 10\%$ . Incomplete form distal tubular acidosis (dRTA) was diagnosed if  $\text{UpH} > 5.3$  in all measurements with absence of increased  $\text{NH}_4^+$  or TA. Statistical analysis was performed using Wilcoxon test, Friedman test, simple linear correlation, and ROC curve. We evaluated 49 patients, 40(35.5-56.5) years old, 63% female, 84% Caucasian, BMI  $24.9 \pm 4.9 \text{ kg/m}^2$ ,  $GFR 85.5 \pm 20.5 \text{ ml/min/1.73m}^2$ , absence of pathological proteinuria or metabolic acidosis. 94% had Val50Met genetic variant. 57% of patients were symptomatic. The prevalence of pRTA was 2% (n=1). The prevalence of incomplete form dRTA was 16.3% (n=8) with UpH curve with the following medians: 0h 6.0; 1h 6.2; 2h 6.3; 3h 5.7; 4h 6.1 (p=0.477). In the subgroup with dRTA there was no significant increase in urinary excretions of  $\text{NH}_4^+$  and TA:  $\text{NH}_4^+$  from  $46.2(28.4-75.4) \mu\text{Eq/min/1.73m}^2$  to  $64.3(28.3-84.2) \mu\text{Eq/min/1.73m}^2$ , (p=0.742) and TA from  $18.1(15.1-23.6) \mu\text{Eq/min/1.73m}^2$  to  $17.7(15.9-24.5) \mu\text{Eq/min/1.73m}^2$  (p=0.945). We observed good correlation between UpH by

potentiometry versus UpH dipstick (Spearman's Rho 0.797,  $R^2$  0.827;  $p < 0.0001$ ). The UpH  $< 5.5$  on the dipstick had 100% sensitivity and NPV to rule out dRTA (AUC 0.909;  $p < 0.001$ ). Therefore, this is the first study to demonstrate RTA in patients with ATTRv. The UpH on the dipstick after WDT had good accuracy for screening for dRTA. Further studies are needed to evaluate the impact of early diagnosis and treatment of RTA in this population.

Keywords: 1. Hereditary amyloidosis 2. Transthyretin 3. Renal amyloidosis 4. Renal tubular acidosis 5. Distal renal tubular acidosis

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Estadiamento prognóstico da taxa de filtração glomerular e albuminúria .....	39
<b>Figura 2</b> – Figura ilustrativa do néfron e suas divisões funcionais. ....	40
<b>Figura 3</b> - Esquema das células principal e intercalada tipo A no ducto coletor. ....	41
<b>Figura 4</b> - Diagnóstico diferencial das Acidoses tubulares renais. ....	44
<b>Figura 5</b> - Aparelho de gasometria arterial e urinária (AGS 22 Drake).....	52
<b>Figura 6</b> – Espectrofotômetro. ....	52
<b>Figura 7</b> - Bureta com NaOH 0,1% (viragem colorimétrica da amostra de urina).....	53
<b>Figura 8</b> - Esquema demonstrativo do protocolo de acidificação urinária.....	54
<b>Figura 9</b> - Fluxograma de seleção dos pacientes para o estudo. ....	57
<b>Figura 10</b> - Curva de pH urinário por potenciometria do grupo com ATRd.....	66
<b>Figura 11</b> - Amônio urinário do grupo com ATRd pré (0h) e pós (4h) teste de acidificação urinária. ....	67
<b>Figura 12</b> - Acidez titulável urinária do grupo com ATRd pré (0h) e pós (4h) teste de acidificação urinária. ....	68
<b>Figura 13</b> - Curva de correlação linear entre o pHu da fita reagente e potenciometria. ....	73
<b>Figura 14</b> - Curva ROC de sensibilidade do pHu por fita reagente <5,5 para afastar ATRd. ....	74

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Metodologia dos exames laboratoriais.....	555
<b>Tabela 2</b> - Características clínicas e epidemiológicas (população total) .....	599
<b>Tabela 3</b> - Resultados Laboratoriais Séricos (população total) .....	60
<b>Tabela 4</b> - Resultados Laboratoriais Urinários (população total) .....	611
<b>Tabela 5</b> - Características Clínicas e Epidemiológicas entre Subgrupos Assintomáticos e Sintomáticos.....	633
<b>Tabela 6</b> - Resultados Laboratoriais Séricos entre Subgrupos Assintomáticos e Sintomáticos	644
<b>Tabela 7</b> - Resultados Laboratoriais Urinários entre Subgrupos Assintomáticos e Sintomáticos .....	655
<b>Tabela 8</b> - Características Clínicas e Epidemiológicas entre Subgrupos sem e com ATRd .....	70
<b>Tabela 9</b> - Resultados Laboratoriais Séricos entre Subgrupos sem e com ATRd .....	711
<b>Tabela 10</b> - Resultados Laboratoriais Urinários entre Subgrupos sem e com ATRd .....	772

## LISTA DE ANEXOS

Anexo A: Carta de aprovação do CEP.....	91
Anexo B: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	93
Anexo C: Folha de registro do teste de avaliação de função renal tubular .....	96
Anexo D: Trabalhos apresentados/publicados em congressos .....	97
Anexo E: Artigo a ser submetido .....	100

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADD - Água destilada e deionizada

AL – Amiloidose por cadeia leve

AT 0h – Acidez titulável basal (inicial)

AT 4h – Acidez titulável após 4<sup>a</sup> hora do teste de acidificação (final)

ATR - Acidose Tubular Renal

ATR 1c – Acidose Tubular Renal tipo 1 forma completa

ATR 1i – Acidose Tubular Renal tipo 1 forma incompleta

ATTRv – amiloidose por mutação da transtirretina

ATTRwt – amiloidose por transtirretina não mutada, do tipo selvagem

CEPARM – Centro de Estudos em Paramiloidose Antônio Rodrigues de Mello

Cr – Creatinina sérica

CKD-EPI – “Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration”

DRC – doença renal crônica

EAS – elementos anormais e sedimentoscopia

FAPERJ - Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro

FE – Fração de excreção

HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> – bicarbonato

HUCFF – Hospital Universitário Clementino Fraga Filho

IF – imunofluorescência

IHQ – imuno-histoquímica

IMC – índice de massa corpórea

LCR – líquido cefalorraquidiano

NCC – Transportador sódio (Na)- Cloreto (Cl) presente no túbulo distal

NH<sub>4</sub> 0h – Amônio basal (inicial)

NH<sub>4</sub> 4h – Amônio após a 4<sup>a</sup> hora do teste de acidificação (final)

NKCC – Transportador sódio (Na)-potássio (K)-2 cloretos (Cl) presente na porção espessa da alça de Henle

OAS - Oligonucleotídeos *antisense*

pCO<sub>2</sub> u – pressão parcial de CO<sub>2</sub> urinário

pHu EAS– pH urinário na fita reagente

pH 0h – pH urinário basal (inicial) (potenciometria)

pH 1h– pH urinário após a 1<sup>a</sup> hora do teste de acidificação (final) (potenciometria)

pH 2h– pH urinário após a 2<sup>a</sup> hora do teste de acidificação (final) (potenciometria)

pH 3h – pH urinário após a 3<sup>a</sup> hora do teste de acidificação (final) (potenciometria)

pH 4h – pH urinário após a 4<sup>a</sup> hora do teste de acidificação (final) (potenciometria)

TFG – Taxa de Filtração Glomerular

THAOS - Transthyretin Amyloidosis Outcomes Survey

TRH – teste de restrição hídrica

TRP – Taxa de reabsorção de fosfato

TRS – terapia renal substitutiva

TTR – transtirretina

# Sumário

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>21</b>
2.1	AMILOIDOSE HEREDITÁRIA POR TRANSTIRRETINA	21
2.1.1	Definição e fisiopatologia	21
2.1.2	Epidemiologia e distribuição geográfica	24
2.1.3	Quadro clínico	25
2.1.4	Diagnóstico	28
2.1.5	Tratamento	30
2.1.6	Evolução e prognóstico	33
2.2	AMILOIDOSE POR TRANSTIRRETINA (ATTRv) E RIM	34
2.2.1	Amiloidoses em geral e o rim	34
2.2.2	Amiloidose hereditária por transtirretina (ATTRv) e o rim	36
2.3	AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL	38
2.3.1	Avaliação da função renal glomerular	38
2.3.2	Avaliação da função renal tubular pela acidificação urinária	40
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>47</b>
3.1	OBJETIVO GERAL	47
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
<b>4</b>	<b>PACIENTES E MÉTODOS</b>	<b>48</b>
4.1	LOCAL DO ESTUDO	48
4.2	SELEÇÃO DOS PACIENTES	49
	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	49
	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	49
4.3	METODOLOGIA	50
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	56
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>57</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>75</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>84</b>
<b>8</b>	<b>LIMITAÇÕES DO ESTUDO</b>	<b>85</b>

<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>86</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>91</b>
ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO CEP .....	91
ANEXO B- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	93
ANEXO C: FOLHA DE REGISTRO DO TESTE DE AVALIAÇÃO DE FUNÇÃO RENAL TUBULAR .....	96
ANEXO D: TRABALHOS APRESENTADOS/PUBLICADOS EM CONGRESSOS .....	97
ANEXO E: ARTIGO A SER SUBMETIDO.....	100

## 1 INTRODUÇÃO

O termo "amiloidose" abrange diferentes entidades de doença decorrentes de alterações conformacionais em proteínas solúveis nativas que se dobram incorretamente e se agregam extracelularmente em fibrilas insolúveis e altamente ordenadas, levando à disfunção de diferentes órgãos e tecidos (GOMES, 2011).

A amiloidose hereditária por transtirretina (ATTRv) é uma doença grave, sistêmica, hereditária com caráter autossômico dominante, de início na idade adulta. Embora rara, é uma doença incapacitante e com risco de vida e o diagnóstico precoce é crucial. É causada por mutações no gene da transtirretina (TTR), levando à deposição extracelular de fibrilas amiloides em vários órgãos, incluindo o sistema nervoso periférico e autônomo, além de coração, rim e olhos, com consequente disfunção orgânica local (ANDO *et al*, 2013). O quadro clínico pode incluir polineuropatia rapidamente progressiva, de padrão sensitivo-motor e incapacitante, perda ponderal inexplicada, arritmias, distúrbios de condução, hipertrofia cardíaca, síndrome do túnel do carpo bilateral, proteinúria, elevação da creatinina, opacidade do vítreo, diarreia crônica, tudo isso em um cenário de rápida progressão da doença (WADDINGTON-CRUZ *et al*, 2018).

Embora o conhecimento sobre amiloidose hereditária tenha aumentado entre os médicos, o subdiagnóstico ainda é comum, resultando em atrasos no início do tratamento e consequente aumento da morbidade dos pacientes. O diagnóstico precoce é importante, dado o surgimento de terapias eficazes que revolucionaram o tratamento na última década (CARROLL *et al*, 2022). O transplante de fígado, que era o tratamento de primeira linha, agora está sendo amplamente substituído por tratamentos menos invasivos (YAMAMOTO *et al*, 2007). Estabilizadores de TTR como diflunisal e tafamidis podem retardar a progressão da doença, oferecendo benefícios quando iniciados precocemente (COELHO *et al*, 2018). Além disso, medicamentos modernos silenciadores de RNA, como Patisiran e Inotersen, resultaram em redução de até 80% na produção de TTR mutada e selvagem, levando à estabilização ou leve melhora da neuropatia periférica e cardiopatia, bem como melhora na qualidade de vida e resultados funcionais. Os avanços terapêuticos levantaram desafios adicionais, incluindo otimização de técnicas de diagnóstico e refinamento do seguimento (CARROLL *et al*, 2022).

Embora o envolvimento renal glomerular seja bem conhecido e comum em outros tipos de amiloidose, como nas formas por cadeia leve (AL) e secundária a inflamações crônicas (AA) (SETHI e THEIS, 2017), poucos dados estão disponíveis sobre o envolvimento renal na amiloidose hereditária por transtirretina, especialmente em pacientes com início tardio e provenientes de áreas não-endêmicas (FERRARO *et al*, 2021). Inicialmente considerada como uma doença de evolução benigna em relação à função renal, posteriormente foi reconhecido que a progressão para insuficiência renal em estágio avançado ocorre em até um terço dos pacientes portadores da mutação Val50Met (LOBATO *et al*, 1998). O diagnóstico de nefropatia amiloide pode ser inferido pela presença de albuminúria em indivíduos com a mutação documentada, embora o padrão ouro para o diagnóstico definitivo seja a histopatologia renal. No entanto, a albuminúria não é um marcador específico de dano tubulointersticial e pode estar ausente em cerca de 10% dos pacientes que evoluem para diálise. Não há descrição na literatura de disfunção renal tubular na ATTRv até o momento (LOBATO *et al*, 2003). Portanto, é pertinente avaliar se essa população apresenta distúrbio de acidificação urinária, uma vez que essa disfunção tubular subclínica é possível devido aos depósitos medulares já identificados e pode ser uma ferramenta valiosa no diagnóstico precoce do acometimento renal desta doença. Desta forma, o objetivo deste estudo foi analisar a prevalência de Acidose Tubular Renal (ATR) em indivíduos com ATTRv, e comparar diferentes subgrupos classificados pelo diagnóstico de ATR e/ou pela presença de sintomas extra-renais.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Amiloidose hereditária por transtirretina

#### 2.1.1 Definição e fisiopatologia

Amiloidose é o termo genérico utilizado para se referir ao depósito extracelular de proteínas solúveis com alteração de sua estrutura molecular. Essa, por sua vez, leva a formação de compostos insolúveis, as fibrilas amiloides que, ao se depositarem nos tecidos, comprometem a estrutura e a função dos órgãos. Sendo assim, observamos um grande espectro de manifestações clínicas relacionadas, a depender do tipo, localização e monta do depósito. Pode ser classificada como: primária, secundária (ou reacional) e hereditária (GOMES, 2011). A fibrilogênese envolve o enovelamento anormal da proteína levando a uma mudança conformacional para uma estrutura secundária de folha  $\beta$ -pregueada, em consequência da qual a proteína se torna hidrofóbica, insolúvel, não funcional e resistente à degradação. A formação de amiloide envolve uma combinação de vários fatores, incluindo: um aumento sustentado na concentração de proteínas com uma mutação adquirida ou hereditária, ou proteínas do tipo selvagem com uma propensão intrínseca ao dobramento incorreto, ou uma remodelação proteolítica de uma proteína do tipo selvagem em um fragmento amiloidogênico. A formação da estrutura terciária e quaternária das proteínas passa por um controle de qualidade tanto intracelular como extracelular, eliminando as proteínas mal dobradas. É somente quando esses sistemas são sobrecarregados pelas condições listadas acima, ou tem sua capacidade reduzida devido ao envelhecimento, que ocorre a amiloidogênese (PICKEN, 2020).

De acordo com a sociedade internacional de amiloidose, há aproximadamente 36 proteínas amiloidogênicas já descritas (CARROLL *et al*, 2022). Cerca de 20 destas causam formas familiares (ou hereditárias) de amiloidose, dentre elas as mais comuns são: transtirretina, apolipoproteína AI, apolipoproteína AII, gelsolina, cadeia alfa-A do fibrinogênio, lisozima e cistatina C. Todos, exceto a cistatina C, afetam clinicamente o rim (LOBATO e ROCHA, 2012).

A transtirretina é uma proteína não glicosilada humana de 55 kDa, composta por quatro subunidades idênticas, sintetizadas predominantemente no fígado, mas também no plexo coroide, epitélio pigmentar da retina e pâncreas, sendo secretada no plasma como transportador de tiroxina (T4) e retinol (vitamina A). Além disso, um papel neuro protetor da TTR no sistema nervoso central também já foi relatado. Trabalhos recentes mostram que camundongos *knockout* para TTR apresentaram disfunção sensorial e motora além de comprometimento da recuperação nervosa em resposta a lesões por esmagamento, reforçando a importância da TTR no reparo nervoso (FLEMING; SARAIVA; SOUSA, 2007).

Diversas amiloidoses estão associadas ao envelhecimento, incluindo formas sistêmicas e localizadas, como a deposição amiloide atrial e em vesícula seminal. O desenvolvimento dessas amiloidoses está relacionado à redução da eficácia dos sistemas de controle de qualidade de dobramento de proteínas. A transtirretina não mutada ou selvagem também pode levar a um subtipo de amiloidose relacionado à idade, anteriormente conhecida como amiloidose sistêmica senil (LOBATO *et al*, 2004).

A amiloidose por TTR derivada da proteína do tipo selvagem (ATTRwt) é uma doença adquirida, comum do envelhecimento, com estudos de autópsia revelando que 10% a 25% das pessoas com mais de 80 anos tinham deposição de amiloide do tipo selvagem no miocárdio e 44% no trato gastrointestinal e tecido subcutâneo (CARROLL *et al*, 2022). Uma carga significativa de deposição de amiloide é necessária para causar doença sintomática e, portanto, a deposição histopatológica não equivale necessariamente a significância clínica.

A amiloidose derivada da mutação ou variante genética da TTR (ATTRv) é a forma mais comum de amiloidose hereditária (familiar). Os primeiros casos surgiram na região da Póvoa de Varzim e Vila do Conde em Portugal, tendo sido descrita pela primeira vez por Corino de Andrade em 1952. Também é conhecida popularmente como “Doença dos Pezinhos”. Em Portugal, local com maior número de casos da doença, existem mais de 600 famílias em acompanhamento com mais de 2000 casos sintomáticos (ANDO *et al*, 2013).

A ATTRv é uma doença genética rara, sistêmica, autossômica dominante, de penetrância variável, com cerca de 50.000 pacientes em todo o mundo. As mutações tornam instável a estrutura tetramérica normal da TTR, causando dissociação em monômeros livres, os quais agregam-se em fibrilas insolúveis que se depositam como amiloide em diversos tecidos, incluindo o sistema nervoso periférico, trato gastrointestinal, coração, rins e olhos, resultando em dano celular local (WADDINGTON-CRUZ *et al*, 2018). As fibrilas amiloides podem causar danos teciduais locais por compressão, obstrução, toxicidade celular ou prejuízo da perfusão local. A deposição vascular pode ser uma característica patológica da amiloidose sistêmica, resultando em apresentações amiloides atípicas, como claudicação mandibular e isquemia miocárdica na ausência de doença aterosclerótica. A toxicidade celular é mediada por oligômeros e protofibrilas de baixo peso molecular, pela ativação do receptor para produtos finais de glicosilação avançada, resultando em estresse oxidativo, ativando a via das caspases e quinases, resultando em interrupção da diferenciação celular e apoptose (FINSTERER *et al*, 2019).

Atualmente há cerca de 140 diferentes mutações descritas produzindo TTR mutada. Apenas cerca de dez tipos não são patogênicos. A mutação mais prevalente é a Val50Met, que ocorre no braço longo do cromossomo 18 do gene que codifica a TTR, onde há a troca do aminoácido valina da posição 50 pelo aminoácido metionina na proteína TTR. A maior parte dos pacientes é heterozigota. A Val50Met, é responsável por 50% dos casos de ATTRv em todo o mundo. Entretanto, a prevalência dessa mutação varia muito dependendo da região geográfica (PARMAN *et al*, 2016). Os locais de maior prevalência são Portugal, Suécia, Japão, Brasil e Maiorca. Algumas mutações induzem cardiomiopatia como a característica predominante, por exemplo, Val122Ile, Ile68Leu, Thr60Ala, Leu111Met, enquanto outras são marcadas pela predominância do fenótipo neurológico, como a Val50Met. Entretanto, ambos os fenótipos podem estar presentes em diferentes proporções (ANDO *et al*, 2013). Possuir a mutação não garante que a doença se desenvolverá, pois a penetrância depende da mutação, da família e do grupo étnico afetado (DUBREY *et al*, 2011). Além disso, portadores da mesma mutação apresentam graus de penetrância diferentes. Essa característica sugere a existência de modificadores genéticos, fatores epigenéticos ou influência ambiental (OLSSON *et al*,

2010). Há dados na literatura que postulam que a penetrância é maior quando a doença é herdada da mãe, sugerindo um polimorfismo mitocondrial que poderia explicar parcialmente as diferenças na penetrância (BONAITI *et al*, 2010).

### 2.1.2 Epidemiologia e distribuição geográfica

Em todo o mundo, a prevalência da ATTRv é estimada em 0,56 a 1 por 10<sup>6</sup> habitantes, com maior prevalência em Portugal, Suécia e Japão (GERTZ e DISPENZIERI, 2020). A mutação mais prevalente em todo o mundo é a Val50Met, encontrada principalmente em regiões de Portugal, Espanha, França, Japão, Suécia, América do Sul e algumas partes não endêmicas da África. Nos Estados Unidos, as mutações mais comuns são Val122Ile (mais comum em afro-americanos), Thr60Ala (mais comum em caucasianos) e Val50Met, enquanto as mutações mais comuns em todo o mundo são Val50Met, Val122Ile e Glu89Gln. Ser77Tyr é particularmente prevalente entre judeus iemenitas (ZHEN *et al*, 2014). Leu111Met e Ile68Leu são mutações relatadas principalmente na Dinamarca e Itália, respectivamente, e causam cardiomiopatia grave em idades relativamente precoces. Embora a prevalência mundial da variante Val122Ile possa exceder a da variante Val50Met, a penetrância de Val50Met parece maior do que para Val122Ile. (OBI *et al*, 2022).

No Brasil, o Rio de Janeiro é a região onde a ATTRv é mais prevalente no Brasil e indicando ser uma região endêmica da doença. No levantamento realizado por Waddington-cruz *et al* em 2019, a mutação Val50Met foi a mais comum (219 casos, 92,4%), seguido por Ile122Val, Ile107Val, Ala19Asp, Glu89Lys e Gly53Glu. Em um país de dimensões continentais e multirracial como o Brasil, é essencial entender que há um contexto complexo de múltiplas influências étnicas.

### 2.1.3 Quadro clínico

A ATTRwt apresenta-se predominantemente no sexo masculino, entre a sexta e a oitava décadas de vida, manifestando-se como insuficiência cardíaca de fração de ejeção preservada, fibrilação atrial e arritmias ventriculares, necessitando ocasionalmente de implante de cardioversor. A síndrome do túnel do carpo é uma manifestação comum, assim como a estenose do canal espinhal, enquanto outras manifestações sistêmicas são menos frequentes (BRUNJES, 2016). É provável que a ATTRwt se torne o tipo mais comum de amiloidose cardíaca a médio e longo prazo (YANAGISAWA *et al*, 2015).

Já as principais manifestações clínicas da ATTRv incluem a polineuropatia, cardiomiopatia e envolvimento ocular. A amiloidose leptomeníngea pela TTR é uma manifestação neurológica rara. O padrão de comprometimento clínico pode variar de acordo com as áreas geográficas. Em áreas endêmicas, como Portugal, os pacientes apresentam início precoce dos sintomas (terceira a quarta década) e deterioram-se rapidamente devido à disfunção autonômica e à rápida progressão do déficit sensório-motor. Por outro lado, em áreas não endêmicas, muitos pacientes apresentam início tardio dos sintomas e a polineuropatia progride lentamente, muitas vezes com envolvimento cardíaco concomitante, mas com menos disfunção autonômica (FERRARO *et al*, 2021).

A polineuropatia periférica é o fenótipo mais comum em áreas endêmicas e não endêmicas, tendo penetrância variável. É representada pelo acometimento sensório-motor e autonômico. A idade de início dos sintomas da polineuropatia foi descrita como bimodal, com um pico na terceira a quarta década de vida e outro na sexta década. A idade de início também é influenciada pelo tipo de mutação e origem geográfica do paciente. Clinicamente, é caracterizada por neuropatia sensório-motora axonal progressiva que afeta todas as modalidades sensoriais. As modalidades de temperatura e dor são acometidas inicialmente, antes da vibratória e de posição segmentar. As alterações da sensibilidade com o tempo assumem disposição de meias e luvas e de localização na face ântero-medial do abdome, mostrando sofrimento axonal primário (PLANTÉ-BORDENEUVE e SAID, 2011). A neuropatia sensitiva apresenta-se inicialmente na parte distal dos membros, com apresentação “em bota” e “em luva”, com

parestesia e hipoestesia seguidas de dor neuropática. A neuropatia de fibras finas também é frequentemente relatada, caracterizada por perda de nocicepção e sensação térmica, queimação nos pés e parestesias em extremidades inferiores distais. A dor neuropática é mais frequente na ATTRv de início tardio, particularmente com a variante Thr60Ala (CARR *et al*, 2016). A síndrome do túnel do carpo bilateral ocorre frequentemente, podendo preceder o envolvimento de outros órgãos por anos.

A neuropatia autonômica ocorre em aproximadamente 75% dos pacientes com ATTRv, caracterizada por hipotensão ortostática (tontura, intolerância ao exercício e fadiga inespecífica), anidrose, sintomas gastrointestinais como vômitos recorrentes, diarreia ou diarreia alternada com constipação, incontinência fecal e gastroparesia, que pode levar a supercrescimento de bactérias do intestino delgado - fenômeno de alça cega (OBICI e SUHR, 2019). Sintomas geniturinários também são consequentes à disfunção autonômica, como retenção ou incontinência urinária, nocturia, esvaziamento vesical incompleto e disfunção erétil. Podem ocorrer desnutrição e perda de peso, que são fatores preditores de mau prognóstico (KOIKE *et al*, 2004). A deposição de amiloide na parede intestinal pode contribuir para os sintomas gastrointestinais. Defeitos de condução cardíaca aparecem com frequência, exigindo implante de marca-passo, juntamente com espessamento miocárdico. Os sintomas autonômicos podem ser incapacitantes, com alta morbidade por arritmias e morte súbita (YAMAMOTO *et al*, 2007). A estenose do canal vertebral também é uma característica da ATTRv é devido à deposição de amiloide no ligamento amarelo, resultando em claudicação neurogênica. Posteriormente, pode ocorrer neuropatia motora com importante comprometimento da mobilidade (PINTO *et al*, 2021).

A cardiomiopatia é evidente em cerca de 50% dos portadores de ATTRv. Sua fisiopatologia se deve a infiltração do miocárdio pelas fibrilas amiloides TTR, aumentando acentuadamente a rigidez miocárdica, resultando em disfunção diastólica e consequentemente insuficiência cardíaca restritiva, também conhecida como insuficiência cardíaca com fração de ejeção normal ou preservada. Há ainda a possibilidade bloqueios de condução e arritmias ventriculares devido ao comprometimento das fibrilas autonômicas anteriormente mencionado (KAPOOR *et al*, 2019). A cardiomiopatia presente na ATTRv é indistinguível clinicamente da ATTRwt.

Eletrocardiograma com baixa voltagem ou padrões de pseudo-infarto nas derivações precordiais direitas são alguns dos principais achados. Espessamento miocárdico e realce tardio subendocárdico por gadolínio, é uma característica da RM cardíaca. A ecocardiografia demonstra paredes septais e ventriculares espessadas, relaxamento diastólico prejudicado e tensão longitudinal global reduzida. A cintilografia é o exame mais sensível para detectar a deposição de amiloide cardíaco. A denervação simpática miocárdica é um preditor independente de mortalidade e representa a importância das alterações autonômicas da cardiomiopatia da ATTRv (FINSTERER *et al*, 2019). Várias características devem levantar a suspeita de amiloidose cardíaca por TTR, incluindo pressão arterial normal a baixa, peptídeo natriurético cerebral elevado e desproporcional ao fenótipo clínico, troponina positiva e persistente na ausência de síndrome coronariana aguda, massa ventricular esquerda acentuadamente aumentada e derrame pericárdico. A sobrevida média de pacientes com amiloidose cardíaca por TTR é de aproximadamente 36 meses. Um diagnóstico correto de cardiomiopatia amiloide por TTR levaria ao refinamento dos medicamentos selecionados para o manejo da insuficiência cardíaca, como evitar bloqueadores de canais de cálcio, que são potencialmente tóxicos nessa população (CASTAÑO; BOKHARI; MAURER, 2015). De todas as mutações já descritas que possuem expressão clínica, cerca de 60% promovem o acometimento cardíaco em algum grau. As que estão associadas a um fenótipo predominantemente cardíaco são Val122Ile, Thr60Ala e Ile68Leu. É importante ressaltar que o amilóide derivado da transtirretina do tipo selvagem pode coexistir com o derivado de formas mutadas nos depósitos de amiloide de TTR (DUBREY *et al*, 2011).

O envolvimento ocular é caracterizado por olhos secos e ceratoconjuntivite, opacidade vítrea devido à deposição de amilóide, catarata, glaucoma secundário de ângulo aberto e angiopatia amilóide da retina, tipicamente evidente com mutações Val50Met (REYNOLDS *et al*, 2017).

#### 2.1.4 Diagnóstico

Por ser uma doença rara, o diagnóstico muitas vezes não é rapidamente considerado. No Brasil, o tempo médio entre o início dos sintomas e o diagnóstico é em torno de 6 anos. O diagnóstico se baseia em: uma história familiar fortemente positiva, tendo um padrão compatível com transmissão autossômica dominante; quadro clínico sugestivo; análise histopatológica do material biopsiado e teste genético. Todos são fortemente recomendados.

A coloração com vermelho do Congo com birrefringência verde-maçã sob luz polarizada representa a aparência patognomônica da substância amiloide na análise histopatológica. O diagnóstico histopatológico é o padrão-ouro. Tecidos adequados para biópsia incluem tecido adiposo subcutâneo da parede abdominal, rim, pele, mucosa gástrica ou retal; tecido nervoso sural; retináculo e gordura peritendínea obtidos na cirurgia do túnel do carpo; e tecido da glândula salivar. Embora a biópsia de um órgão-alvo tenha o maior rendimento, abordagens menos invasivas, como a biópsia de gordura abdominal ou glândula salivar, exibem sensibilidades entre 50% e 80% e especificidade de 90%. Em pacientes com sinais e sintomas típicos de amiloidose TTR, os resultados negativos da biópsia não excluem a doença. A biópsia positiva é importante também para o seguimento dos pacientes oligo sintomáticos, com exame neurológico e teste neurofisiológico limítrofes (LOBATO *et al*, 2004).

A identificação precisa da proteína amilóide específica da amiloidose sistêmica é necessária para avaliar o prognóstico, realizar aconselhamento genético e traçar a estratégia de tratamento mais adequada. A tipagem do precursor amilóide era tradicionalmente realizada por imunofluorescência (IF) ou imuno-histoquímica (IHQ). A IF é comumente usada para documentar a deposição de proteínas de imunoglobulina no rim e normalmente é realizada em seções congeladas de biópsias renais. Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromo direcionados contra imunoglobulina, complemento e fibrinogênio são incubados com lâminas de amostra de tecido e vistos sob um microscópio de fluorescência. Os estudos IHQ usam o mesmo princípio. O uso de anticorpos específicos pode auxiliar na tipagem do amilóide na amiloidose renal AL e

não AL (SETHI e THEIS, 2017). Entretanto, atualmente, métodos mais aprimorados de imunodeteção por microdissecação a laser/espectrometria de massa estão disponíveis para serem usados isoladamente ou em conjunto, conseguindo inclusive distinguir a TTR mutante da forma TTR *wild-type*. A microscopia imunoelétrica pode fornecer uma boa caracterização das fibrilas amiloides, mas essa técnica não está amplamente disponível (ANDO *et al*, 2013). Entretanto, essa rotina ainda não está disponível para todos os centros.

O teste genético é mandatório para o diagnóstico. Pacientes com história familiar positiva podem testar direto para mutação envolvida. Já aqueles com mutação desconhecida ou sem história familiar precisarão testar a partir do sequenciamento completo da TTR, a fim de identificar a mutação responsável. A análise de sequência identifica >99% das variantes patogênicas, com listas atualizadas de mutações e fenótipos de TTR relatados em um banco de dados online. Como a ATTRv agora é tratável, a literatura sugere um limiar baixo para o teste precoce do gene TTR (CARROLL *et al*, 2022).

Mutações no gene TTR podem coexistir com outras doenças causadoras de neuropatia, especialmente em pacientes mais velhos, como diabetes mellitus, e nesta circunstância, uma biópsia nervosa deve ser considerada para confirmar que a neuropatia é secundária à deposição amiloide (CARR *et al*, 2016). Como diagnóstico diferencial deve-se sempre excluir outras formas de neuropatias, como as tóxicas, metabólicas, inflamatórias, infecciosas e hereditárias. A neuropatia periférica secundária ao etilismo crônico muitas vezes é indistinguível clinicamente da ATTRv. A polineuropatia desmielinizante inflamatória crônica (CIPD - *chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy*) deve ser considerada quando uma história familiar não é conhecida. Nesta condição, predomina a disfunção das grandes fibras mielinizadas, com velocidade de condução lenta, alto teor de proteína no líquido cefalorraquidiano (LCR) e pouca disfunção autonômica (ANDO *et al*, 2013). O diagnóstico de amiloidose de cadeias leves (AL) também é frequentemente considerado devido à alta incidência de gamopatias monoclonais em idosos e à semelhança fenotípica entre as duas condições. Ambas afetam o coração, e a distinção entre esses dois diagnósticos pode ser um desafio. A

cintilografia usando marcadores ósseos marcados com tecnécio-<sup>99m</sup> (por exemplo, <sup>99m</sup>Tc-pirofosfato) é útil para diferenciar ATTRv de AL. O acometimento cardíaco pela ATTRv normalmente mostra uma captação elevada do marcador pelo miocárdio, enquanto a captação é classicamente baixa na amiloidose cardíaca AL. Outros diagnósticos a serem excluídos são: polineuropatia amilóide familiar (tipo gelsolina, tipo apolipoproteína A1), doença de Fabry, neuropatia secundária a hanseníase, síndrome do intestino irritável, distúrbios de condução cardíacos e insuficiência cardíaca por outras causas e deficiência de vitamina B12 (CARROLL *et al*, 2022).

A investigação de pacientes com suspeita de amiloidose sistêmica requer avaliação clínica criteriosa, além de exames complementares para identificação dos órgãos/sistemas acometidos. Deve-se sempre excluir outras formas de amiloidose sistêmica, mais comuns que a ATTR. O envolvimento de órgãos específicos evidenciado por sinais, sintomas e exames particulares pode determinar o fenótipo da apresentação da doença e fornecer informações prognósticas, além de guiar o diagnóstico (FEITOSA *et al*, 2022).

Portanto, a ATTRv é uma doença rara, progressiva e potencialmente fatal que apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas, tornando a história natural difícil de descrever com precisão. O diagnóstico pode ser facilmente negligenciado, pois os pacientes geralmente apresentam sintomas comuns e inespecíficos, além da heterogeneidade fenotípica da doença. (WADDINGTON-CRUZ *et al*, 2018).

### **2.1.5 Tratamento**

O acompanhamento dos pacientes idealmente deve ser feito por uma equipe multidisciplinar, composta por neurologistas, cardiologistas, nefrologistas e nutrólogos, para o adequado controle de sintomas e avaliar a viabilidade de se instituir as terapias modificadoras de doença.

O tratamento de suporte visa a prevenir e tratar as manifestações clínicas mais comuns, como a dor, náuseas/vômitos, diarreia ou constipação, desnutrição, retenção

vesical, úlceras por pressão ou mal perfurante plantar e complicações infecciosas. O tratamento do edema é muitas vezes desafiador, pois o acometimento cardíaco, vascular e autonômico leva à retenção de líquidos e hipotensão. Para o controle da dor neuropática, podem ser utilizados opioides, análogos do receptor GABA como a gabapentina ou pregabalina, antidepressivos tricíclicos e inibidores de recaptção de serotonina e noradrenalina. Para a gastroparesia, estimulantes da motilidade gástrica, antieméticos e fracionamento de refeições devem ser prescritos. Pacientes que apresentam retenção vesical devem ser orientados a fazer cateterismo vesical intermitente. Um trabalho de educação do paciente a fim de prevenir lesões e consequentes infecções deve ser realizado. Orientações simples como evitar andar descalço, sapatos abertos ou muito apertados, evitar escalda pés, cuidado ao cortar as unhas, entre outros (KAPOOR *et al*, 2019).

O tratamento específico tem como estratégias a redução da produção e/ou a deposição da TTR patogênica. As seguintes abordagens terapêuticas mostraram eficácia: silenciamento da produção de TTR, estabilização de tetrâmeros de TTR e degradação de depósitos amiloides de TTR.

O primeiro tratamento realizado para a doença foi o transplante hepático, uma vez que o fígado produz cerca de 80% da TTR. Portanto, sua substituição reduziria as concentrações séricas de TTR mutada e consequentemente a velocidade de progressão da doença. Entretanto, não é possível reverter lesões já existentes previamente ao transplante. Embora o transplante de fígado esteja associado a estabilização da polineuropatia, principalmente na mutação V50M, há importantes limitações, como morbidade e mortalidade relacionadas ao procedimento (aproximadamente 10%), exigência de doadores, imunossupressão prolongada e comprometimento da função renal a médio e longo prazo devido a associação dos imunossupressores à infiltração amiloide renal (YAMAMOTO *et al*, 2007). Além disso, não há redução da produção de TTR no plexo coroide e nas células pigmentares da retina, levando potencialmente ao desenvolvimento de doença ocular e leptomenígea (UEDA e ANDO, 2014). Atualmente, o transplante de fígado pode ser considerado em pacientes refratários ou intolerantes a outras opções farmacológicas, pacientes com necessidade de transplante duplo de

órgãos (já com disfunção renal com critério para transplante) ou em centros onde outras opções de tratamento não estão disponíveis.

Uma das terapêuticas atuais é o uso de estabilizadores de tetrâmeros de TTR como diflunisal e tafamidis, agentes projetados para estabilizar a forma circulante normal e mutada de TTR e, portanto, evitar que a proteína se dissocie e sofra as alterações conformacionais que levam à sua agregação como amiloide, sendo eficazes em reduzir a progressão da neuropatia em pacientes com polineuropatia em estágio inicial. Estudos mostram sucesso na desaceleração sustentada da progressão da neuropatia e melhora na qualidade de vida. No caso do diflunisal, efeitos colaterais significativos foram relatados, incluindo sintomas gastrointestinais e comprometimento transitório da função renal. O tafamidis mostrou atraso sustentado na progressão da polineuropatia e preservação a longo prazo do estado nutricional principalmente quando iniciado precocemente ou em quadros ainda leves. Poucos benefícios clínicos são evidentes quando iniciado em pacientes já com doença avançada. O tafamidis reduziu o risco de mortalidade em pacientes afetados precocemente (91%) e tardios (82%) em comparação com pacientes não tratados (COELHO *et al*, 2018). O tafamidis foi aprovado em 2020 para o tratamento da ATTRwt e cardiomiopatia relacionada a ATTRv.

Mais recentemente, houve a emergência da terapia de modulação genética, que usa oligonucleotídeos *antisense* (OAS) ou silenciadores de RNA como estratégias seguras e eficazes, capazes de diminuir a produção hepática de TTR variante e do tipo selvagem. O inotersen é um OAS que se liga seletivamente ao RNA mensageiro responsável por transcreever a TTR, promovendo sua degradação, impedindo a tradução do RNA, com redução dos níveis séricos de proteína TTR. O patisiran é um ácido ribonucleico de interferência curta que promove o silenciamento do RNA específico da TTR, modulando a expressão gênica através da clivagem dos RNAs mensageiros. São produzidos sinteticamente e introduzidos na célula, levando ao *knockdown* da expressão do gene alvo. Os benefícios clínicos foram evidentes independentemente do grau de neuropatia periférica e relacionados com a redução da proteína TTR. Ambos demonstraram, em ensaios clínicos randomizados e controlados, redução significativa do comprometimento neurológico e melhora da qualidade de vida quando comparados ao

placebo. Nenhuma das duas medicações atravessam eficientemente a barreira hematoencefálica e, portanto, não tem utilidade terapêutica na doença leptomeníngea. Apesar de atuarem por mecanismos distintos, ambos operam para reduzir a expressão de RNA mensageiro de TTR e dessa forma, reduzem a quantidade de proteína mutante (CARROLL *et al*, 2022).

Nenhuma terapia ainda foi aprovada para a nefropatia na ATTRv, mesmo que algum efeito do tafamidis na redução da proteinúria tenha sido descrito. Também não existem, por ora, dados específicos sobre os resultados de desfechos renais em pacientes com amiloidose renal sob terapias de silenciamento gênico.

### **2.1.6 Evolução e prognóstico**

Com os avanços no diagnóstico e o surgimento de novas terapias, o prognóstico da ATTRv está melhorando. No entanto, para aqueles que permanecem não diagnosticados ou não tem acesso aos novos tratamentos, ainda há morbidade e mortalidade significativas. A doença sem tratamento é usualmente fatal em média após 2 a 15 anos de evolução, podendo variar dependendo da região endêmica, tipo de mutação, sintomas e outros fatores. Há considerável variação fenotípica entre os indivíduos e localizações geográficas (ANDO *et al*, 2013).

Há escalas de evolução e prognósticas para o acompanhamento da polineuropatia e da cardiopatia. Em relação à cardiopatia, por exemplo, biomarcadores como troponina T e peptídeo natriurético do tipo pro B N-terminal (NT-proBNP) são marcadores de mau prognóstico quando elevados. A classe funcional III ou IV da NYHA também se mostrou um fator de risco independente para desfechos cardiovasculares adversos que incluem o desenvolvimento de doença de condução, hospitalização por insuficiência cardíaca e acidente vascular cerebral (OBI *et al*, 2022).

A manifestação clínica do acometimento renal é tardia, apesar de os depósitos estarem presentes no tecido renal já em fases precoces. Portanto, durante a maior parte da evolução histórica da doença, os pacientes evoluíam para óbito com poucas manifestações clínicas renais. Recentemente, com a introdução dos tratamentos

modificadores da doença, a expectativa de vida dessa população aumentou, sendo mais frequente a identificação do acometimento renal nessa população.

Fatores de mau prognóstico incluem genótipos não-Val50Met, desnutrição, disfunção autonômica e polineuropatia grave com restrição a deambulação (ANDO *et al*, 2013). As principais causas de óbito são: doença cardíaca, insuficiência renal, desnutrição, infecção de úlceras de decúbito, infecção de corrente sanguínea, pneumonia, arritmias e caquexia (ROCHA *et al*, 2014).

É relevante destacar a importância do rastreio dos familiares de casos já confirmados, uma vez que até 35% dos portadores assintomáticos da mutação podem evoluir para o estado sintomático. Embora os fatores que contribuem para a transição da amiloidose ATTRv assintomática para sintomática não sejam totalmente compreendidos, há consenso de que, como o dano tecidual associado à doença é progressivo e amplamente irreversível, os portadores do gene TTR em risco devem ser identificados e monitorados pelo menos anualmente para facilitar o diagnóstico e tratamento o mais cedo possível (COELHO *et al*, 2022).

## **2.2 AMILOIDOSE POR TRANSTIRRETINA (ATTRv) e RIM**

### **2.2.1 Amiloidoses em geral e o rim**

A amiloidose renal não é uma doença frequente: sua incidência anual é de aproximadamente 3% de todas as biópsias renais. Quando apenas adultos não diabéticos com síndrome nefrótica são considerados, essa incidência sobe para cerca de 12%. A frequência da infiltração renal depende do tipo de amiloidose, sendo de 90% na amiloidose AA e de cerca de 50% na AL. Nas amiloidoses hereditárias, o envolvimento do rim é variável (SCHENA *et al*, 1996). Outras amiloidoses familiares com potencial acometimento renal são raras e a gravidade da doença renal depende do tipo de mutação encontrada na proteína precursora (LOBATO, 2003).

O rim é um dos principais órgãos afetados nas amiloidoses em geral. A apresentação clínica mais comum é a proteinúria, composta principalmente por albumina, que pode variar de faixa subnefrótica até proteinúria maciça de faixa nefrótica. A

hematúria isolada é incomum. A amiloidose AL é o subtipo de amiloidose renal mais frequente em todo o mundo, sendo mais prevalente em países desenvolvidos, enquanto a amiloidose AA prevalece em países em desenvolvimento devido à alta prevalência de doenças infecciosas. A amiloidose AL tende a apresentar uma síndrome nefrótica mais pronunciada e hipotensão em comparação com as formas não AL. Ao contrário da amiloidose AL, que geralmente se apresenta com síndrome nefrótica, muitas amiloidoses não-AL podem apresentar piora gradual da função renal sem proteinúria significativa (SETHI e THEIS, 2017).

Depósitos restritos aos compartimentos tubulointersticiais ou vasculares já foram descritos em alguns tipos de amiloidose renal, levando a disfunção renal progressiva com proteinúria leve ou ausente. Esse tipo de apresentação clínica é observado em amiloidose por mutação de apolipoproteína I e II, transtirretina e amiloidose por fator quimiotático leucocitário 2 - ALECT2. Embora raros, diabetes insípidos e síndrome de Fanconi já foram descritos como resultado de depósitos amiloide no néfron distal e proximal, respectivamente (SCHENA *et al*, 1996).

Em geral, a deposição de amilóide ocorre principalmente nos glomérulos. Na microscopia ótica, o depósito amiloide glomerular aparece como material amorfo no mesângio e nas alças capilares, por vezes intenso assumindo uma configuração nodular na coloração de hematoxilina-eosina. O aspecto nodular pode levantar os diagnósticos diferenciais com a nefropatia diabética e doença de deposição de cadeia leve, porém a proteína amilóide predomina nos tecidos acometidos pela amiloidose, com redução da deposição de colágeno na matriz extracelular evidenciada pela fraca coloração com ácido periódico de *Schiff* (PAS). Depósitos tubulointersticiais de amiloide produzem atrofia tubular e fibrose intersticial (FEITOSA *et al*, 2022). Na microscopia eletrônica, o material amiloide aparece como fibrilas não ramificadas, aleatoriamente depositadas, sem orientação específica no mesângio, vasos e/ou interstício. O tamanho da fibrila ajuda a diferenciar entre amiloidose e outras doenças de depósito renal, como glomerulonefrite fibrilar e glomerulonefrite imunotactóide. Além disso, o aparecimento de fibrilas amiloides é característico, estabelecendo o diagnóstico mesmo quando a coloração com vermelho do Congo é negativa, o que pode ocorrer em até 5-13% dos casos (SETHI e THEIS, 2017).

### 2.2.2 Amiloidose hereditária por transtirretina (ATTRv) e o rim

Grande parte da literatura sobre envolvimento renal na ATTRv é baseada em pequenas séries, além de a avaliação de diferentes mutações não ser homogênea. Portanto, as informações ainda são limitadas. O envolvimento renal foi mais bem documentado na ATTRv por mutação Val50Met e acredita-se que seja extremamente raro na ATTRwt (FERRARO *et al*, 2021).

Inicialmente encarada como doença de evolução benigna em relação à função renal, o envolvimento renal na ATTRv é observado em até 20% dos casos. Notavelmente, a deposição de amiloide foi descrita em glomérulos, vasos e interstício, mesmo em pacientes sem evidência clínica de envolvimento renal. Há uma deposição precoce de amiloide de TTR na medula. No entanto, as manifestações clínicas parecem correlacionar-se majoritariamente com o acometimento glomerular e vascular. A doença pela mutação V50M caracteriza-se por um discreto envolvimento dos tubos contornados proximais e do interstício cortical, priorizando tipicamente os túbulos contornados distais e alça de Henle (LOBATO *et al*, 1998). Não houve descrição de disfunção tubular até o momento (LOBATO *et al*, 2004). A disfunção renal e a proteinúria são proporcionais à gravidade dos depósitos. A deposição renal não se correlaciona com a deposição nos nervos periféricos, ou seja, não há relação entre a gravidade da nefropatia e da neuropatia (FEITOSA *et al*, 2022). As manifestações renais começam habitualmente por proteinúria não seletiva, intermitente e assintomática, podendo progredir até síndrome nefrótica e uremia. O período desta progressão pode variar de cinco a vinte anos (LOBATO *et al*, 2004). A deposição de TTR em cultura de células na forma de pequenos agregados tóxicos não fibrilares pode ocorrer antes da formação de amiloide, sugerindo que oligômeros pré-fibrilares já podem causar morte celular (MENDES SOUSA *et al*, 2001).

A microalbuminúria pode preceder o início da neuropatia e até metade dos pacientes pode evoluir para disfunção renal, sendo o tempo necessário para isso de aproximadamente 2 anos e o tempo de evolução para insuficiência renal franca em torno de 5 anos (LOBATO E ROCHA, 2012). O início tardio dos sintomas (após os 60 anos de

idade), sexo feminino, baixa penetrância familiar e cardiomiopatia prévia são fatores fortemente relacionados à DRC.

Os dados sobre o comprometimento da função renal glomerular na ATTRv são bastante variáveis na literatura, com várias definições de DRC. A prevalência de DRC varia de 10% a 50% dos pacientes sintomáticos em diferentes coortes (SOLIGNAC, 2022) e cerca de 10% dos pacientes portadores da mutação Val50Met evoluem para a DRC estágio avançado com necessidade de terapia de substituição renal (TRS) (LOBATO *et al*, 2003). Fatores adicionais como disfunção vesical e retenção urinária devem ser investigados, uma vez que também contribuem para piora da função renal.

Atualmente, o diagnóstico de nefropatia amilóide é inferido através da presença de albuminúria em pacientes já com sintomas extra renais. Raramente portadores assintomáticos são rastreados. Entretanto, a albuminúria não é um marcador de dano tubulointersticial e pode estar ausente em 10% dos pacientes que progridem para doença renal terminal (ROCHA *et al*, 2014). Além disso, os depósitos amiloides renais podem já estar presentes mesmo na ausência alterações clínicas ou laboratoriais detectáveis. O padrão ouro para o diagnóstico definitivo é a histopatologia renal (FENOGLIO *et al*, 2022).

Lobato e Rocha, em 2012, realizaram biópsia renal dos portadores de microalbuminúria e não encontrou outras alterações glomerulares que explicassem a excreção urinária anormal de albumina além dos depósitos amiloides (LOBATO e ROCHA, 2012). Também foi realizado um estudo em que biópsia renal foi feita numa pequena série de pacientes, onde metade não apresentava alterações urinárias detectáveis e a outra metade já cursava com microalbuminúria. Todos tiveram depósito amiloide renal detectado, predominantemente na medula, porém não existem estudos publicados até o momento sobre a função renal tubular nesta população. O acometimento glomerular e vascular foi mais proeminente em pacientes que já apresentavam alterações urinárias detectáveis. Logo, a nefropatia não pode ser considerada uma ocorrência tardia da doença (LOBATO *et al*, 1998).

Em média, a evolução para doença renal crônica (DRC) estágio avançado ocorre após 10 anos da instalação da neuropatia (GERTZ *et al*, 2015). Nessa população de pacientes, o método de substituição renal melhor documentado é a hemodiálise. A diálise peritoneal é um método pouco viável, devido aos distúrbios gastrointestinais, desnutrição

e limitação de atividades cotidianas. Após o início de terapia renal substitutiva, a sobrevida média é de dois anos (ROCHA *et al*, 2014).

O transplante renal isolado, na ausência de outros tratamentos não é recomendado, uma vez que a produção constante da proteína precursora amiloidogênica é mantida, com risco de nefropatia *de novo* no enxerto. Medicações como o Tafamidis podem retardar ou interromper a doença renal, sendo uma boa opção terapêutica para os pacientes já com nefropatia instalada. Porém deve ser preferencialmente usado antes que ocorram danos renais extensos (FERRARO *et al*, 2021).

## **2.3 Avaliação da função renal**

### **2.3.1 Avaliação da função renal glomerular**

Os rins recebem cerca de 20% do débito cardíaco, o que representa um fluxo sanguíneo de 1.000 a 1.200 ml/min para um adulto de 70 kg. O fluxo proporcional ao peso do rim é de 5 a 50 vezes maior que em outros órgãos, equivalente a 4 ml/min/grama. O néfron é a unidade funcional do rim e é constituído pelo glomérulo e segmentos tubulares. Aproximadamente 25% do plasma que chega ao rim são filtrados pelos glomérulos, produzindo cerca de 120 ml/min ou 170 L/dia de ultrafiltrado. Porém, apenas 1,2% desse volume são eliminados e o restante é reabsorvido pelos túbulos (SEGURO e YU, 2018).

A creatinina é filtrada livremente no glomérulo e 7-10% é secretada. Apesar de superestimar a taxa de filtração glomerular (TFG) e depender da massa muscular, o *clearance* de creatinina continua sendo o parâmetro recomendado atualmente para avaliação da função renal. Fórmulas foram desenvolvidas para estimar o *clearance* sem necessitar da coleta de urina de 24h, sendo o CKD-EPI a mais indicada (KDIGO, 2013).

A presença de albuminúria também é um indicativo de disfunção glomerular, além de ser um marcador prognóstico da velocidade de progressão da queda da TFG, como indicado na FIGURA 1.

**Prognosis of CKD by GFR and albuminuria category**

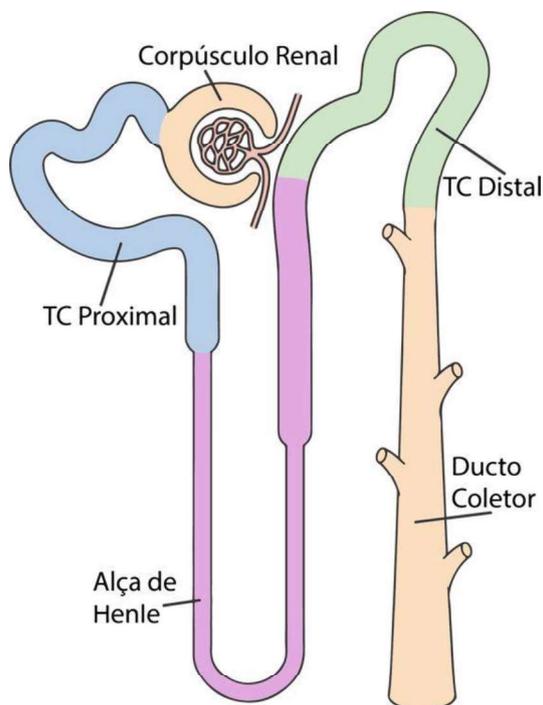
Prognosis of CKD by GFR and Albuminuria Categories: KDIGO 2012				Persistent albuminuria categories Description and range		
				A1	A2	A3
				Normal to mildly increased	Moderately increased	Severely increased
				<30 mg/g <3 mg/mmol	30-300 mg/g 3-30 mg/mmol	>300 mg/g >30 mg/mmol
GFR categories (ml/min/1.73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

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

**Figura 1** - Estadiamento prognóstico da taxa de filtração glomerular e albuminúria segundo KDIGO - Kidney Disease: (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney inter., Suppl.* 2013; 3: 1–150.

### 2.3.2 Avaliação da função renal tubular pela acidificação urinária

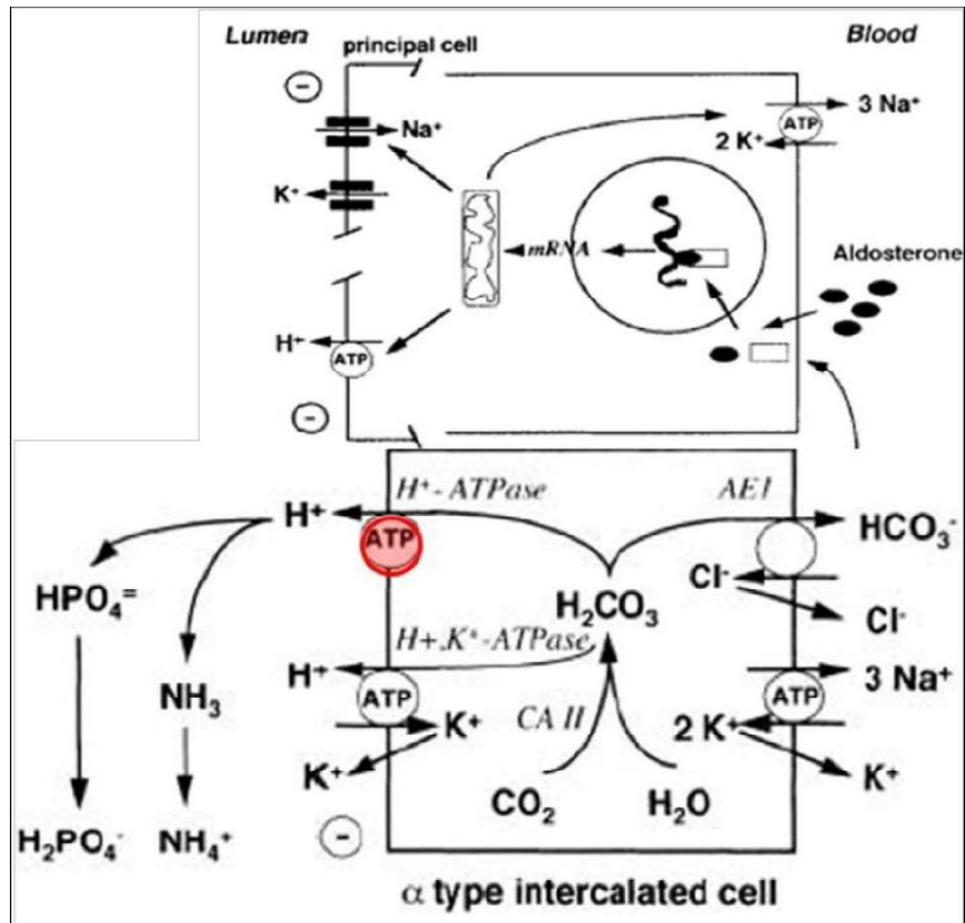
A estrutura do néfron e suas divisões funcionais estão ilustradas na FIGURA 2.



**Figura 2** – Figura ilustrativa do néfron e suas divisões funcionais. Disponível em: <<https://br.pinterest.com/pin/855613629192055716/>> Acesso em: 31 jan. 2023.

No túbulo proximal ocorre reabsorção de 60 a 70% da carga filtrada de água, sódio e cloro. Além disso, também são reabsorvidos: glicose, fosfato, potássio, cálcio, magnésio, aminoácidos, ácido úrico e há a regeneração do bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ). A alça de Henle em sua porção fina descendente é altamente permeável à água e pouco permeável a solutos. Aproximadamente 20% da água filtrada é reabsorvida neste segmento. A porção fina ascendente é impermeável à água e permeável a Na e Cl, que são reabsorvidos de forma passiva. A porção espessa ascendente da alça de Henle também é impermeável à água e é responsável por 25% da reabsorção da carga filtrada de sódio. Nessa porção está presente o cotransportador NKCC, essencial aos mecanismos de concentração e diluição urinárias. O túbulo distal também é impermeável à água e nele está localizado o cotransportador NCC que pode ser inibido por tiazídicos. O ducto coletor é responsável pela reabsorção de sódio e secreção de potássio, nas células principais, sendo estes processos modulados pela aldosterona. Já as células

intercaladas do ducto coletor são responsáveis pela acidificação urinária (FIGURA 3). O ducto coletor medular interno é a porção final do néfron, onde ocorrem os ajustes finais para a formação da urina (HELOU; SEGURO; KUDO, 2018).



**Figura 3** - Esquema das células principal e intercalada tipo A no ducto coletor. Em destaque a bomba de  $\text{H}^+$ -ATPase. Ausência da  $\text{H}^+$ -ATPase nas células intercaladas na acidose tubular renal distal clássica. Adaptado de JOO et al, Clin Nephrol, 1998.

O controle renal da homeostase acidobásica ocorre através de dois mecanismos principais: regeneração tubular do bicarbonato filtrado livremente pelos glomérulos, principalmente no néfron proximal, e secreção tubular de íons hidrogênio ( $\text{H}^+$ ), principalmente no néfron distal. Através dessa regulação, o pH da urina pode variar de forma fisiológica de 4,5 até valores em torno de 8,0 (KARET, 2011).

O bicarbonato é livremente filtrado pelos glomérulos e precisa ser reabsorvido ao longo do néfron. Em torno de 80% da reabsorção do  $\text{HCO}_3^-$  ocorre no túbulo proximal, a qual depende da secreção de  $\text{H}^+$  e não do transporte direto de bicarbonato através da membrana apical da célula tubular (SORIANO, 2002). No néfron distal, existe menor aporte de bicarbonato filtrado (cerca de 5%) em virtude da grande reabsorção tubular proximal, de modo que nesse segmento a regeneração de bicarbonato ocorre principalmente por dois mecanismos, que correspondem à titulação de ânions tampões, com destaque para o fosfato (ácido titulável mais abundante), e formação do amônio ( $\text{NH}_4^+$ ), que dependem da secreção de íons hidrogênio. O principal mecanismo de excreção de  $\text{H}^+$  no néfron distal se dá através de  $\text{H}^+$ -ATPases presentes na membrana apical das células dos túbulos contornados distais e coletores, ou seja, trata-se de um transporte ativo (HAMN e HERING-SMITH, 1993).

Acidez titulável (AT) corresponde à quantidade de  $\text{H}^+$  que foi secretado pelas células do túbulo distal e ducto coletor e ligou-se aos sais neutros filtrados pelo glomérulo, dando origem a sais ácidos na urina. Para calcular a acidez titulável, basta adicionar à urina coletada uma substância alcalina (base forte) até que o pH da mesma se iguale ao do plasma, em torno de 7,35-7,45, ocorrendo viragem colorimétrica da solução preparada com urina fresca e fenolftaleína. A quantidade dessa substância adicionada, medida em mililitros, equivale à quantidade de  $\text{H}^+$  que foi secretado pelos túbulos e se ligou aos tampões filtrados. A excreção de acidez titulável não é o único instrumento de que o organismo dispõe para excretar ácido. Outro mecanismo de extrema importância corresponde à excreção de amônio. Ambos permitem excreção ácida sem acidez urinária excessiva, sendo apenas aproximadamente 1% da carga de  $\text{H}^+$  eliminada na forma livre (HENDERSON e PALMER, 1914).

A acidose tubular renal é definida por uma incapacidade reabsorção do bicarbonato filtrado e/ou de excreção de uma carga de ácido ( $\text{H}^+$ ) pelos rins, comprometendo a manutenção do equilíbrio ácido-base. Distingue-se da acidose urêmica pela presença de taxa de filtração glomerular preservada ou levemente diminuída e por se tratar de uma acidose hiperclorêmica com *anion gap* normal (UNWIN e CAPASSO, 2001).

A classificação das acidoses tubulares renais compreende 4 tipos. A ATR tipo 1 corresponde à ATR distal e é a mais prevalente, podendo ser na forma completa (bicarbonato plasmático diminuído, ou seja, com acidose metabólica) ou na forma incompleta (concentração plasmática de bicarbonato normal, ou seja, sem acidose metabólica), essa última frequentemente acompanhada de hipopotassemia. A ATR tipo 2 corresponde à ATR proximal e se caracteriza por comprometimento da reabsorção ou regeneração do  $\text{HCO}_3^-$  no túbulo proximal. Já a ATR tipo 3 é menos comum e apresenta características das formas distal e proximal, refletindo uma possível imaturidade tubular em crianças. Pode ser um distúrbio transitório em crianças com formas primárias de ATR tipo 1 ou estar relacionada a uma deficiência hereditária de anidrase carbônica tipo II (SLY *et al*, 1985). A ATR tipo 4 apresenta-se com hiperpotassemia e é causada por deficiência de aldosterona ou resistência tubular a esse hormônio, ou seja, hipoaldosteronismo primário e pseudohipoaldosteronismo, respectivamente (UNWIN e CAPASSO, 2001).

Na ATR proximal ou tipo 2, a reabsorção de bicarbonato nos túbulos proximais está comprometida, o que resulta em diminuição do limiar de reabsorção de  $\text{HCO}_3^-$  e aumento da fração de excreção de  $\text{HCO}_3^-$  (>10%) com nível sérico parcialmente reduzido. Nas fases iniciais, o pH urinário é elevado (pH>5,5), porém se reduz à medida que a concentração sérica de bicarbonato cai (pH<5,5). Isso ocorre porque os mecanismos de acidificação distal da urina encontram-se preservados (SORIANO, 2002).

A ATR distal ou tipo 1 caracteriza-se por dificuldade de acidificação distal da urina, não ocorrendo redução do pH urinário (pH>5,5 sempre) na presença de acidemia ou mesmo após uma sobrecarga ácida (BATLLE e FLORES, 1996; SORIANO, 2002). Os pacientes podem apresentar também hipercalciúria e nefrocalcinose.

Na ATR tipo 4 ou hiperpotassêmica, além da deficiência de aldosterona ou resistência tubular à aldosterona, o defeito de acidificação urinária também pode estar relacionado a um comprometimento da gênese do próprio amônio. Apesar disso, a secreção celular de  $\text{H}^+$  encontra-se preservada, o que faz com que ocorra acidificação urinária (pH<5,0) quando realizada uma sobrecarga ácida, porém com uma taxa líquida de excreção de ácidos reduzida em virtude da baixa taxa de excreção de  $\text{NH}_4^+$  (SORIANO, 2002).

O diagnóstico de ATR deve ser considerado quando existir acidose metabólica hiperclorêmica com *Anion Gap* plasmático na faixa normal, em um paciente que não apresente sinais de perda gastrointestinal de bicarbonato, como diarreia, que não esteja utilizando acetazolamida e que não tenha ingerido ácidos (SORIANO, 2002). O diagnóstico diferencial pode ser feito através de testes laboratoriais resumidos na FIGURA 4.

	ATR tipo 2	ATR tipo 1 "Clássica" ou secretora		ATR tipo 3	ATR tipo 4 (hipercalêmica)
Na presença de acidose metabólica (espontânea ou após sobrecarga ácida)					
K <sup>+</sup> plasmático	Normal ou ↓	Normal ou ↓	↑	Normal ou ↓	↑
<i>Anion Gap</i> urinário	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
pH urinário	< 5,5	> 5,5	> 5,5	> 5,5	< 5,5
Excreção de NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Normal	↓	↓	↓	↓
Fração de excreção de K <sup>+</sup>	Normal ou ↑	↑	↓	↑	↓
Excreção de Ca <sup>2+</sup>	Normal	↑	↑	↑	Normal ou ↓
Excreção de Citrato	Normal	↓	↓	↓	Normal
Com equilíbrio ácido-base normal (após administração de substância alcalinizante)					
Fração de Excreção de HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	> 10 a 15%	< 5%	< 5%	> 5 a 15%	> 5 a 10%
ΔpCO <sub>2</sub> (U-S)	> 20 mmHg	< 20 mmHg	> 20 mmHg	< 20 mmHg	> 20mmHg
Outros defeitos tubulares	Frequentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes
Nefrocalcinose e/ou litíase	Ausentes	Frequentes	Frequentes	Frequentes	Ausentes
Envolvimento ósseo	Frequente	Raro	Raro	Raro	Ausente

**Figura 4** - Diagnóstico diferencial das Acidoses tubulares renais. ΔpCO<sub>2</sub> (U-S): gradiente de pressão parcial de CO<sub>2</sub> entre a urina e o sangue. NH<sub>4</sub><sup>+</sup>: amônio. Adaptado de SORIANO, J.R., J Am Soc Nephrol 2002; 13: 2160-2170.

A avaliação da reabsorção proximal do bicarbonato pode ser feita pela titulação do HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, pelo cálculo da fração de excreção renal de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> após sobrecarga alcalina e pela relação entre o HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> plasmático e pH urinário durante infusão de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Defeitos na acidificação urinária distal podem ser detectados através de aferição do pH urinário e

da excreção de  $\text{NH}_4^+$  e de AT, cálculo do *anion gap* urinário e do *gap* osmolal urinário, obtenção do  $\text{pCO}_2$  urinário após sobrecarga alcalina, dosagem do citrato urinário e testes funcionais com estímulo de acidificação urinária para obtenção de pH urinário e excreção de  $\text{NH}_4^+$ . O pH urinário mede apenas a atividade do  $\text{H}^+$  livre na urina, que representa menos de 1% do hidrogênio excretado no túbulo distal, e apenas sua medida não é suficiente para afastar defeitos de acidificação. Por isso, para investigação mais detalhada de ATR, o pH deve ser sempre medido em conjunto com outros testes, tais como dosagem do  $\text{NH}_4^+$  e da AT, além do cálculo da fração de excreção de bicarbonato (WRONG, 1991).

Neste contexto, o teste de acidificação urinária com administração oral de furosemida + fludrocortisona (adaptado de WALSH *et al*, 2007) é confiável para a detecção de defeitos na acidificação distal da urina em pacientes sem acidose metabólica sistêmica (ATRd forma incompleta). Este teste é praticamente isento de efeitos colaterais e sem necessidade de coleta da gasometria arterial, como ocorre no teste clássico com administração oral de cloreto de amônio, além da vantagem de permitir que o teste de acidificação seja completado em menos tempo, já que em cerca de 4 horas é possível diferenciar um indivíduo normal de um portador de acidose tubular distal, quando o efeito máximo de acidificação é atingido ( $\text{pH} < 5,3$ ). O teste pode ser finalizado após 4 horas ou antes disso, caso o pH caia para menos do que 5,3, indicando uma acidificação urinária normal (WALSH *et al*, 2007; RASTOGI *et al*, 1984).

Considerando as amiloidoses em geral, há uma série de possibilidades de lesão em cada um dos compartimentos renais. Em relação às doenças tubulares, a mais comum é a ATR tipo 2, que geralmente apresenta-se como manifestação da síndrome de Fanconi na amiloidose AL. Esta decorre da dificuldade de proteólise das cadeias leves no túbulo proximal, interferindo em sua função de absorção. Existem alguns raros relatos de ATR tipo 4, principalmente na amiloidose AA (KARET, 2011; HOGAN *et al*, 2019). No entanto, considerando apenas a ATTRv, grande parte da literatura sobre envolvimento renal é baseada em pequenas séries, descrevendo majoritariamente acometimento glomerular com proteinúria e queda da TFG. Nenhum desses estudos relata dados sobre a função renal tubular. Portanto, é pertinente avaliar se essa população apresenta distúrbio de acidificação urinária, uma vez que essa disfunção tubular é possível devido

aos depósitos medulares e pode ser uma ferramenta valiosa no diagnóstico precoce a ainda subclínico do acometimento renal na ATTRv.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar a função tubular renal através da acidificação urinária em indivíduos portadores de variante genética no gene da TTR, sintomáticos e assintomáticos.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar a prevalência de acidose tubular renal e seus diferentes subtipos em indivíduos portadores de ATTRv.
- Avaliar variáveis clínicas, epidemiológicas e laboratoriais na população total de indivíduos portadores de ATTRv.
- Comparar variáveis clínicas, epidemiológicas e laboratoriais entre subgrupos de indivíduos sem e com sintomas sistêmicos de ATTRv.
- Comparar variáveis clínicas, epidemiológicas e laboratoriais entre subgrupos de indivíduos sem e com diagnóstico de acidose tubular renal.
- Correlacionar os valores de pH da fita reagente de EAS com as medidas de pH (potenciometria).
- Estimar ponto de corte de pH da fita reagente para triagem de ATR nesta população.

## 4 PACIENTES E MÉTODOS

### 4.1 Local do estudo

Trata-se de estudo observacional, transversal, realizado em centro único (Hospital Universitário Clementino Fraga Filho - HUCFF), em indivíduos portadores de amiloidose hereditária por mutação da transtirretina acompanhados ambulatorialmente no Centro de Estudos em Paramiloidoses Antônio Rodrigues de Melo (CEPARM).

Durante as consultas ambulatoriais de rotina, os indivíduos selecionados receberam as informações sobre o estudo e aqueles que preencheram os critérios de inclusão e concordaram em participar do estudo, foram agendados para os testes funcionais no Laboratório de Fisiopatologia Renal, localizado no 7º andar no serviço de Nefrologia do HUCFF. Todos os demais exames de sangue, amostras de urina e de urina de 24 horas foram processados no Laboratório Central do HUCFF. Todos os integrantes responderam ao termo de consentimento livre e esclarecido para inclusão no estudo, tendo a identidade permanecido em sigilo para fins de publicação científica.

Todos participaram da pesquisa de forma voluntária e sem remuneração ou ajuda de custo. A utilização do material biológico foi exclusiva para este projeto, e todos os indivíduos foram informados pessoalmente dos resultados de seus exames e receberam orientação a respeito. Os testes e exames laboratoriais realizados no Laboratório de Fisiopatologia Renal foram financiados com verba própria do serviço de Nefrologia e da FAPERJ. Já os exames realizados pelo Laboratório Central, como faziam parte do acompanhamento ambulatorial rotineiro dos pacientes, foram cobertos pelo Sistema Único de Saúde. Se por qualquer motivo não houvesse interesse ou possibilidade na continuação do paciente no estudo, este seria excluído do mesmo e continuaria seu acompanhamento no ambulatório de origem normalmente.

## 4.2 Seleção dos pacientes

A seleção foi realizada de acordo com os seguintes critérios de inclusão e exclusão:

### **Critérios de Inclusão**

- Portadores de variante genética da TTR comprovada através de estudo genético, sintomáticos e assintomáticos, maiores de 18 anos.
- Taxa de filtração glomerular (TFG) estimada pela equação CKD-EPI maior ou igual a 45 ml/min/1,73m<sup>2</sup>.
- Concordância em participar do estudo de acordo com o termo de consentimento livre e esclarecido e que não preencharem nenhum critério de exclusão.

### **Critérios de Exclusão**

- Gravidez
- Infecção do trato urinário ativa,
- Infecção pelo vírus do HIV, hepatites B e C
- Doença pulmonar crônica
- Diarreia aguda
- Taxa de filtração glomerular (TFG) estimada pela equação CKD-EPI menor que 45 ml/min/1,73m<sup>2</sup>.
- Obstrução urinária, derivação urinária para pele ou intestino
- Doenças autoimunes
- Uso de medicamentos nefrotóxicos, como anti-inflamatórios não esteroidais
- Contraindicações ao uso de furosemida ou fludrocortisona
- Participantes de estudo duplo cego no momento da análise
- Residência fora do Rio de Janeiro, devido ao deslocamento prejudicado até o centro
- Portadores de amiloidose de outro tipo, sem ser por variante genética da transtirretina

### 4.3 Metodologia

Os indivíduos foram recrutados no ambulatório do CEPARM do HUCFF. Durante a seleção, foram registradas as seguintes variáveis: idade, gênero, etnia, peso, altura, comorbidades, tempo de diagnóstico da ATTRv, pressão arterial, história de transplante hepático prévio ou uso de tafamidis e demais medicações em uso contínuo, presença ou não de sintomas cardíacos (espessamento progressivo da parede biventricular; disfunção diastólica decorrente da perda de complacência; distúrbios de condução e sintomas de insuficiência cardíaca congestiva com fração de ejeção preservada; arritmias cardíacas e/ou bloqueios de condução) e/ou sintomas neurológicos (disautonomia; dor neuropática e/ou neuropatia periférica sensitivo-motora).

Os indivíduos selecionados receberam agendamento para comparecer em outra data às 07:30h no Laboratório de Fisiopatologia Renal localizado no 7º andar do HUCFF, no serviço de Nefrologia, para realização dos testes funcionais. Os pacientes permaneceram no hospital durante aproximadamente 4 horas contadas do momento de sua chegada.

Para o teste funcional de acidificação urinária, os pacientes foram previamente orientados a ficar em dieta zero a partir das 19h da véspera dos exames, inclusive sem poder ingerir líquidos neste período de 12 horas, para que fosse caracterizado um teste de restrição hídrica (TRH). Entre 03:30h e 04:00h do dia dos exames, os pacientes desprezavam toda a urina e anotavam o horário exato, não devendo mais urinar até a chegada ao Laboratório de Fisiopatologia Renal. No momento da chegada, os pacientes esvaziavam espontaneamente a bexiga e coletavam todo o volume de urina (amostra inicial ou basal), permitindo assim o cálculo do fluxo urinário (HELOU; SEGURO; KUDO, 2018). Pacientes que faziam uso de diuréticos foram orientados a suspender a medicação antes do comparecimento ao laboratório.

A amostra inicial ou basal de urina era usada para diversas medidas: cálculo do fluxo urinário considerando o horário da última micção e o volume medido, dosagem basal de pH urinário por gasometria e potenciometria (pH 0h), pCO<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> total e bicarbonato

urinário por gasometria, dosagem de  $\text{NH}_4^+$  urinário, AT e avaliação de elementos anormais em fita de EAS, que avaliará basicamente o pH (pHu EAS) (WALSH *et al*, 2007).

Neste momento também era coletada gasometria venosa para avaliação de acidose sistêmica ( $\text{HCO}_3^- < 22 \text{mEq/l}$ ) e para o cálculo da fração de excreção de bicarbonato em conjunto com o bicarbonato urinário. O bicarbonato sérico foi obtido pela gasometria venosa realizada no laboratório central do HUCFF (exame convencional), essencial para o diagnóstico de acidose sistêmica ( $\text{HCO}_3^- < 22 \text{mEq/l}$ ) e para o cálculo da fração de excreção de bicarbonato em conjunto com o bicarbonato urinário. Uma fração de excreção de bicarbonato maior do que 10% define ATR proximal ou tipo 2 (SORIANO, 2002).

A dosagem do pH urinário foi realizada com teste de furosemida e fludrocortisona (WALSH *et al*, 2007), após 12 horas em jejum completo (TRH). Foram administrados 01 comprimido de furosemida 40 mg e 01 comprimido de fludrocortisona 0,1 mg. A furosemida, ao inibir o transportador NKCC na porção espessa da alça de Henle, aumenta o aporte de sódio nos segmentos mais distais do nefron, favorecendo a secreção de  $\text{H}^+$ . Já a fludrocortisona, com seu efeito mineralocorticoide, estimula diretamente a secreção de  $\text{H}^+$  no ducto coletor. O pH urinário foi medido de hora em hora até completar 4 horas (pH 0h – pH 1h – pH 2h – pH 3h – pH 4h). Na primeira medida, ainda sem efeito dos medicamentos, é necessário que o pH urinário atinja um valor inferior a 5,5. Somente naqueles que não atingiram esse valor o teste de furosemida e fludrocortisona foi aplicado. Após a administração das drogas, o pH urinário deve então cair para valores inferiores a 5,3 nas medidas subsequentes. Caso o pH da primeira urina (pH 0h) tenha sido maior do que 5,5 e as medidas após a administração de furosemida e fludrocortisona não tenham atingido valores inferiores a 5,3, é considerado o diagnóstico de ATR tipo 1 ou distal (WALSH *et al*, 2007; SHAVIT *et al*, 2016). A medida do pH foi realizada em aparelho de gasometria capaz de receber amostras de urina (FIGURA 5).



**Figura 5** - Aparelho de gasometria arterial e urinária (AGS 22 Drake).

Para a dosagem do  $\text{NH}_4^+$  urinário é necessário que o paciente, em jejum de 12 horas, anote o horário da última micção no domicílio e colete toda a urina na chegada ao laboratório, permitindo o cálculo do fluxo urinário. Da urina coletada, foi retirado 01 ml, para diluição a 1:25 com água destilada e deionizada (ADD). Dessa urina diluída foi coletado 01 ml, na qual foram adicionadas 02 gotas de Reativo de Iodo 2%, 09 ml de ADD e 01 ml do Reativo de Nessler, sempre agitando a solução a cada substância adicionada. A solução preparada, após 5 min, foi lida no espectrofotômetro (FIGURA 6). O  $\text{NH}_4^+$  foi dosado na urina basal, coletada na chegada ao laboratório, e na urina da quarta hora. O valor de referência desse teste é  $28\text{-}68\mu\text{Eq}/\text{min}/1,73\text{m}^2$ . Valores baixos de amônio urinário indicam deficiência da secreção de  $\text{H}^+$ , sugerindo ATR tipo 1 ou distal (HENDERSON e PALMER, 1914).



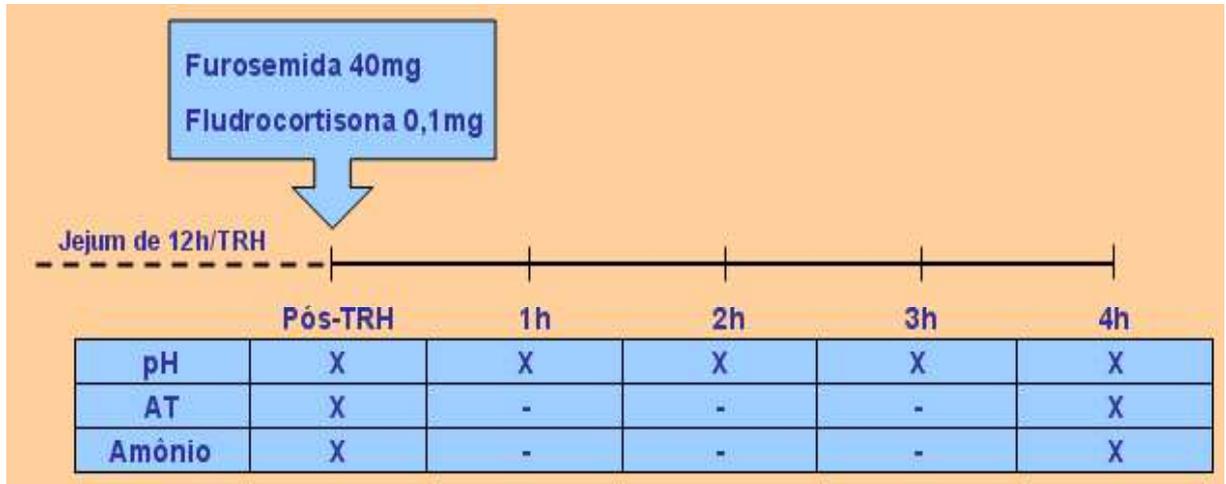
**Figura 6** – Espectrofotômetro.

A AT foi dosada empregando-se a fenolftaleína. O paciente, em jejum de 12 horas, anotar o horário da última micção conforme mencionado na descrição da dosagem do amônio urinário, pois a medida da acidez titulável também depende do cálculo do fluxo urinário. Da urina basal foram retirados 25 ml de urina e colocados em um frasco de Erlenmeyer. Em seguida, foi adicionado 0,100 ml de fenolftaleína alcoólica 1,0%. A solução obtida foi então titulada utilizando bureta (FIGURA 7) com NaOH 0,1% até ocorrer viragem colorimétrica, obtendo-se o resultado em mililitros de NaOH, o qual foi ajustado para o fluxo urinário e superfície corpórea. A mudança de cor para um padrão avermelhado indica que a solução passou a ser alcalina, marcando então o momento em que os sais ácidos foram titulados pela substância alcalina adicionada. A dosagem da AT foi realizada na urina basal e na urina coletada na quarta hora. O valor de referência é de  $21-47\mu\text{Eq}/\text{min}/1,73\text{m}^2$  e valores baixos também serão compatíveis com ATR distal ou tipo 1 (HENDERSON e PALMER, 1914).



**Figura 7** - Bureta com NaOH 0,1% (viragem colorimétrica da amostra de urina)

O protocolo de acidificação urinária foi realizado conforme exemplificado na FIGURA 8.



**Figura 8** - Esquema demonstrativo do protocolo de acidificação urinária.

Foram solicitados exames de sangue após jejum de 12 horas e urina (amostra e coleta de 24 horas). Os exames foram realizados em um segundo momento, no laboratório central do HUCFF (TABELA 1).

**Tabela 1 - Metodologia dos exames laboratoriais.**

Exame	Material	Método	Valores de Referência
Creatinina urinária	Urina 24h	Jaffé Modificado	H 600-2500 mg/24h M 600-1500 mg/24h
Proteinúria	Urina 24h	Vermelho de Pirogalol	<149,1 mg/24h
Albuminúria	Urina 24h	Imunoturbidimétrico	<30 mcg/mg de Cr
Uréia	Urina 24h	Enzimático	14-43 g/24h
Sódio	Urina 24h	Potenciometria	40-220 mEq/24h
Cálcio	Urina 24h	O-cresolftaleína Modificado	42-353 mg/24h
Fósforo	Urina 24h	Fosfomolibdato Modificado	400-1300 mg/24h
Potássio	Urina 24h	Potenciometria	25-125 mEq/24h
Cloro	Urina 24h	Potenciometria	110-250 mEq/24h
Magnésio	Urina 24h	MTB (Azul de Metiltimol) Modificado	24-255 mg/24h
Ácido úrico	Urina 24h	Uricase-UV Modificado	150-800 mg/24h
Citrato	Urina 24h	Enzimático	> 320 mg/24h
Bicarbonato	Urina	Calculado por gasometria urinaria	<1mmol/L
Hemograma Completo	Sangue	Contagem automática por impedância e laser	Hemoglobina: 13-18 g/dL Hematócrito: 40-54% Leucócitos: 4000-11000 Plaquetas: 150-450mil
Glicemia	Sangue	Hexoquinase-UV (Kunst)	70-99 mg/dL
Hemoglobina glicada	Sangue	Cromatografia líquida de alta performance	<5,7 %
Uréia	Sangue	Enzimático	15-40 mg/dL
Creatinina	Sangue	Jaffé Modificado	H 0,8-1,3 mg/dL M 0,6-1,0 mg/dL
Ácido úrico	Sangue	Uricase-UV Modificado	H 2,6-6,0 mg/dL M 3,5-7,2 mg/dL
Sódio	Sangue	Potenciometria	136-145 mEq/L
Potássio	Sangue	Potenciometria	3,5-5,1 mEq/L
Cálcio	Sangue	O-cresolftaleína Modificado	8,5-10,1 mg/dL
Fósforo	Sangue	Fosfomolibdato Modificado	2,5-4,9 mg/dL
Magnésio	Sangue	MTB (Azul de Metiltimol) Modificado	1,8-2,4 mg/dL
Cloro	Sangue	Potenciometria	98-107 mEq/L
Albumina	Sangue	Verde Bromocresol Automatizado	3,4-5,0 g/dL
Fosfatase alcalina	Sangue	IFCC modificado	45-129 U/L
Transaminase glutâmico pirúvica (TGP)	Sangue	IFCC modificado	10-49 U/L
Transaminase glutâmico oxalacética (TGO)	Sangue	IFCC modificado	<34 U/L
Colesterol total	Sangue	Enzimático	<190 mg/dL
Triglicerídeos	Sangue	GPO- Trinder sem branco de soro	<150 mg/dL
Colesterol HDL	Sangue	Eliminação/ Catalase	>40mg/dL
Colesterol LDL	Sangue	Ecação de Friedewald	<130mg/dL
25(OH)D3 Vitamina D	Sangue	Imunoensaio	>30 ng/mL
Bicarbonato	Sangue	Gasometria	22-26 mEq/L
Ânion Gap	Sangue	Potenciometria / Gasometria	8-16 mEq/L

A partir das amostras de sangue e urina, foi possível calcular o intervalo aniônico sérico [AG = Na – (Cl + HCO<sub>3</sub>)] (8-14mmol/L), intervalo do *anion gap* urinário [uAG = (Na+K)-Cl)] (valores negativos em mmol/L), TFG medida (>60ml/min), aparência de nitrogênio proteico para estimativa da ingestão de proteína [(PNA = ((uréia urinária x 0,46) + 2) x 6,25)/peso corporal)] (0,8-1,2g ptn/Kg/24h), estimativa de ingestão de NaCl (g/24h) e excreção fracionada de eletrólitos. A fração de excreção (FE) de cada soluto foi calculada pela fórmula geral:

$$FE \text{ soluto} = 100 \times \frac{\text{Solute urinário} \times \text{Creatinina plasmática}}{\text{Solute sérico} \times \text{Creatinina urinária}}$$

Consideramos como referência de excreção fracionada os seguintes valores: FE Na <1%, FE K <30%, FE Ca <3%, taxa de reabsorção de fosfato (TRP) [(1 – FE fosfato) x 100] >80%, FE Mg <6%, Ácido Úrico FE <10% (RASTOGI *et al*, 1984; UNWIN e CAPASSO, 2001).

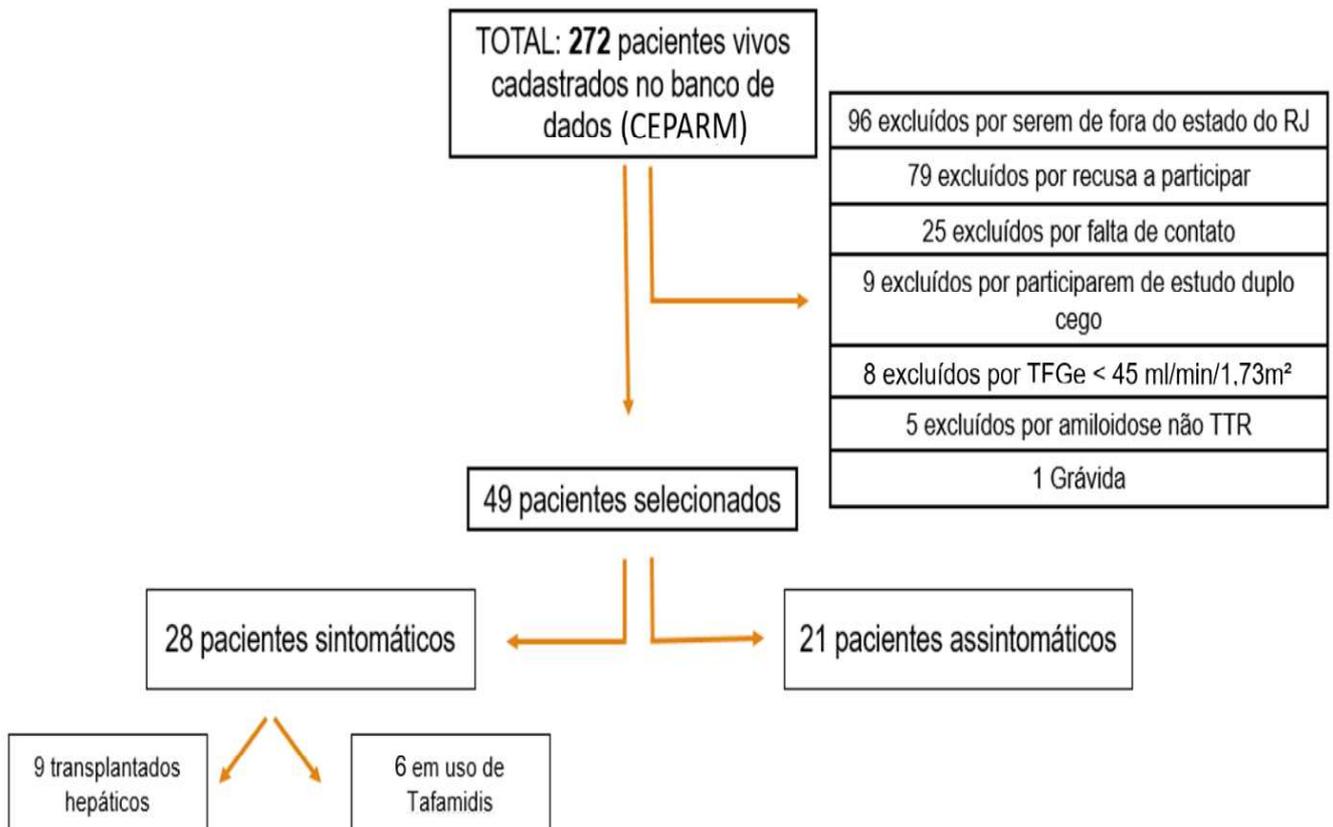
#### 4.4 Análise Estatística

As variáveis categóricas foram expressas em números absolutos e percentuais e as variáveis contínuas em média ± desvio padrão ou mediana (intervalo interquartil). Usamos Testes de Qui-quadrado e Fisher para análise de variáveis qualitativas nominais, teste T de Student não-pareado ou teste de Mann-Whitney para comparações de dois grupos independentes, e teste de Friedman com análise post-hoc para comparações de três ou mais medidas quantitativas entre mesmos pacientes. A correlação de Spearman e a análise de regressão linear foram usadas para medir a associação entre duas variáveis. Avaliamos a acurácia do pH da fita reagente para triagem de diagnóstico de ATRd por curva *Receiver Operator Characteristic* (ROC).

Todas as análises estatísticas foram realizadas no IBM SPSS *Statistics*, versão 24 (EUA), e o nível de significância estatística de erro tipo 1 foi fixado em 0,05 (bilateral).

## 5 RESULTADOS

Em fevereiro de 2019, identificamos 272 indivíduos cadastrados no CEPARM em acompanhamento ambulatorial. Destes, 96 foram excluídos por residirem fora do estado do Rio de Janeiro, 79 por recusa em participar do estudo, 25 por impossibilidade de contato telefônico, 9 por estarem participando de estudo duplo-cego no momento da avaliação, 8 por apresentarem TFGe < 45ml /min/1,73m<sup>2</sup>, 5 por amiloidose não-TTR e 1 por gravidez. Assim, selecionamos 49 indivíduos, sendo 28 sintomáticos (57,1%) e 21 carreadores assintomáticos (42,9%). De todos os pacientes sintomáticos, 9 haviam sido submetidos a transplante hepático prévio e 6 estavam em uso de Tafamidis.



**Figura 9** - Fluxograma de seleção dos pacientes para o estudo.

Trata-se de uma população composta por indivíduos jovens, em sua maioria mulheres (63,3%), caucasianos (83,7%) e com índice de massa corporal (IMC) dentro da normalidade ( $24,9 \pm 4,9$  Kg/m<sup>2</sup>), conforme exposto na TABELA 2. A maioria tem mutação Val50Met (93,8%), com 3 (1-9) anos de diagnóstico confirmado da doença. Pouco mais da metade dos indivíduos é sintomática (57,1%). Há uma baixa prevalência de doenças pré-existentes de qualquer tipo, sendo as mais frequentes hipertensão, dislipidemia, tabagismo, nefrolitíase e diabetes. Apenas 2 pacientes (4,1%) tinham marca-passo definitivo. Pacientes que faziam uso de diuréticos foram orientados a suspender a medicação antes do teste com furosemida e fludrocortisona.

A maior parte dos pacientes apresentou exames laboratoriais séricos e urinários dentro da normalidade (TABELAS 3 e 4). 87,7% (n=44) dos pacientes apresentaram função renal preservada, com creatinina de 0,9 (0,7-1,1) mg/dl e TFGe > 60 ml/min/1.73m<sup>2</sup>. Nenhum deles apresentou acidose metabólica. Apesar de 34,7% (n=17) evidenciarem proteinúria  $\geq 150$  mg na urina de 24h, a média de proteinúria permaneceu dentro da faixa de normalidade. Apenas 8,1% (n=4) tiveram albuminúria acima de 30 mg/dia. Os valores de citrato urinário e bicarbonato urinário da população geral também estavam dentro da normalidade. As estimativas de ingesta de sal (NaCl) e de proteína estavam adequadas.

**Tabela 2 - Características clínicas e epidemiológicas (população total)**

	<b>TOTAL (n=49)</b>
<b>Idade (anos)</b>	40 (35,5-56,5)
<b>Sexo feminino – N (%)</b>	31 (63,3)
<b>Etnia – N (%)</b>	
<b>Branco</b>	41 (83,7)
<b>Não-branco</b>	8 (16,3)
<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	24,9 ± 4,9
<b>Mutação – N (%)</b>	
<b>Val50Met</b>	46 (93,9)
<b>Outras</b>	3 (6,1)
<b>Sintomáticos – N (%)</b>	28 (57,1)
<b>ATRp – N (%)</b>	1 (2,0)
<b>ATRd – N (%)</b>	8 (16,3)
<b>Diagnóstico da ATTRv (anos)</b>	3 (1-9)
<b>Transplante hepático – N (%)</b>	9 (18,4)
<b>Uso de Tafamidis – N (%)</b>	6 (12,3)
<b>Pressão arterial</b>	
<b>PAS - mmHg</b>	115 (110-130)
<b>PAD - mmHg</b>	70 (60-77)
<b>Comorbidades – N (%)</b>	
<b>Hipertensão</b>	11 (22,4)
<b>Diabetes</b>	6 (12,2)
<b>Dislipidemia</b>	9 (18,4)
<b>Marca-passo definitivo</b>	2 (4,1)
<b>Nefrolitíase</b>	6 (12,2)
<b>Tabagismo</b>	7 (14,3)
<b>Incontinência urinária</b>	5 (10,2)

Média ± DP ou mediana [intervalo interquartil] ou N (percentual) quando apropriado. IMC: índice de massa corporal; DCU: distúrbio de concentração urinária; PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica.

**Tabela 3 - Resultados Laboratoriais Séricos (população total)**

	<b>TOTAL (n=49)</b>
<b>TFGe CKD-EPI (mL/min/1,73m<sup>2</sup>)</b>	85,5 ± 20,5
<b>Ureia (mg/dL)</b>	29,5 (23,3-36,5)
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	0,9 (0,7-1,1)
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	13,5 ± 1,5
<b>HbA1c (%)</b>	5,5 (5,1-6,0)
<b>Na (mEq/L)</b>	140 (139-142)
<b>K (mEq/L)</b>	4,4 ± 0,4
<b>Ca (mg/dL)</b>	9,5 ± 0,5
<b>P (mg/dL)</b>	3,5 (3,3-4,0)
<b>Cl (mEq/L)</b>	103 (100-104)
<b>Mg (mg/dL)</b>	2,1 (1,9-2,3)
<b>25(OH)D3 (ng/mL)</b>	27,7 ± 6,8
<b>PTHi (pg/mL)</b>	35 (29,5-42,6)
<b>Albumina (g/dL)</b>	4,3 (4,0-4,6)
<b>Ácido úrico (mg/dL)</b>	4,6 (3,6-5,9)
<b>TGO (U/L)</b>	19 (15-33)
<b>TGP (U/L)</b>	20 (16-29)
<b>Fosfatase alcalina (U/L)</b>	70 (55-107)
<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (mEq/L)</b>	25,5 ± 2,7
<b>Colesterol total (mg/dL)</b>	180 ± 49,6
<b>Triglicerídeos (mg/dL)</b>	92 (66-127)
<b>LDL-C (mg/dL)</b>	96 (77-121)
<b>HDL-C (mg/dL)</b>	54 ± 14
<b>Anion Gap (mEq/L)</b>	12,3 ± 4,6

Média ± DP ou mediana [intervalo interquartil] ou N (percentual) quando apropriado. TFGe = taxa de filtração glomerular estimada; HbA1c: hemoglobina glicada; 25(OH)D3: 25-hidroxi vitamina D; PTHi: paratormônio intacto; TGO: aspartato aminotransferase; TGP: alanina aminotransferase; HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>: bicarbonato; LDL: lipoproteína de baixa densidade; HDL: lipoproteína de alta densidade.

**Tabela 4 - Resultados Laboratoriais Urinários (população total)**

	<b>TOTAL (n=49)</b>
<b>Débito urinário (mL/24h)</b>	1687 ± 677
<b>TFG medida (mL/min/1,73m<sup>2</sup>)</b>	90,5 ± 30,5
<b>Proteinúria (mg/24h)</b>	141,3 ± 104,2
<b>Albuminúria &gt; 30mg/24h – N (%)</b>	4 (8,1)
<b>Citrato urinário (mg/24h)</b>	396 (271-626)
<b>HCO<sub>3</sub> urinário (mmol/L)</b>	0,7 ± 2,1
<b>Anion Gap (mEq/L)</b>	40,0 ± 47,1
<b>FE Na (%)</b>	0,8 (0,6-1,2)
<b>FE K (%)</b>	7,1 (4,7-9,8)
<b>FE Ca (%)</b>	1,7 (1,2-2,4)
<b>TRP (%)</b>	87,6 (84,3-91,5)
<b>FE Mg (%)</b>	3,3 (2,6-5,2)
<b>FE Ácido úrico (%)</b>	6,7 (5,0-8,8)
<b>pH (fita reagente)</b>	5,0 (5,0-6,0)
<b>pH 0h (potenciometria)</b>	5,3 (5,1-5,8)
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 0h</b>	30,1 (20,8-41,4)
<b>AT 0h</b>	21,3 (13,6-26,8)
<b>EIP (gPtn/Kg/24h)</b>	1,3 (1,1-1,8)
<b>Ingesta NaCl (g/24h)</b>	6,8 (5,7-11,8)

Média ± DP ou mediana [intervalo interquartil] ou N (percentual) quando apropriado. FE: fração de excreção; TRP: taxa de reabsorção de fósforo; EIP: estimativa de ingesta proteica; pH 0 h = pH antes do protocolo de acidificação urinária; NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 0h = amônia urinária antes do protocolo de acidificação urinária; AT 0 h = acidez titulável antes do protocolo de acidificação urinária.

A população total foi então dividida em 2 subgrupos baseado na ausência ou presença de sintomas sistêmicos (cardíacos e/ou neurológicos).

Na análise comparativa clínica e epidemiológica entre os subgrupos de assintomáticos e sintomáticos (TABELA 5), observamos que o subgrupo sintomático era composto por indivíduos mais velhos, com idade de 49,0 (37,3-60,0) anos, enquanto no assintomático a mediana foi de 37,0 (29,0-49,5) anos ( $p=0,010$ ). Os assintomáticos apresentavam menor tempo de diagnóstico genético 2 (1-7) anos comparados aos sintomáticos com 5 (1-14) anos ( $p=0,177$ ). Apenas o subgrupo sintomático possuía indivíduos em uso de tafamidis ou transplantados hepáticos, uma vez que são formas de tratamento apenas para a doença já manifesta. A incontinência urinária também só esteve presente entre os sintomáticos ( $p=0,043$ ). A pressão arterial sistólica foi discretamente mais baixa entre os sintomáticos, 110 (109-120) mmHg versus 120 (110-130) mmHg ( $p=0,144$ ).

Em relação aos exames laboratoriais séricos (TABELA 6), houve diferença estatística significativa nos resultados de potássio, tendo uma média de  $4,3\pm 0,3$  mmol/L entre os assintomáticos e de  $4,5\pm 0,4$  mmol/L ( $p=0,025$ ) entre os sintomáticos, entretanto com valores dentro da normalidade. Os valores de TGP e fosfatase alcalina também apresentaram diferenças significativas, sendo mais elevados entre os sintomáticos, com TGP de 22 (18-34) versus 91 (60-138) U/L ( $p=0,037$ ), e fosfatase alcalina de 19 (13-27) e 66 (48-75) U/L ( $p=0,011$ ), respectivamente.

Já na análise dos exames urinários entre estes subgrupos (TABELA 7), apesar da ausência de significância estatística e de todos os exames estarem dentro dos limites da normalidade, é relevante ressaltar que os indivíduos assintomáticos apresentaram TFG medida  $97,6\pm 22,1$  ml/min/1,73m<sup>2</sup> versus  $86,1\pm 32,9$  ml/min/1,73m<sup>2</sup> nos sintomáticos ( $p=0,069$ ), e citrato urinário de 461 (308-691) mg/24h versus 329 (257-542) mg/24h nos sintomáticos ( $p=0,075$ ). pH urinário por potenciometria foi de 5,5 (5,0-5,9) nos sintomáticos, enquanto os assintomáticos apresentaram pH urinário por potenciometria de 5,2 (5,1-5,4) ( $p=0,374$ ). Além disso, apenas o subgrupo sintomático apresentou proteinúria acima de 150 mg/dia ( $151,8\pm 122,5$  mg/dia versus  $116,8\pm 58,4$  mg/dia) ( $p=0,350$ ), assim como albuminúria elevada (14,2% dos indivíduos).

**Tabela 5** - Características Clínicas e Epidemiológicas entre Subgrupos Assintomáticos e Sintomáticos

	<b>Assintomáticos (n=21)</b>	<b>Sintomáticos (n=28)</b>	<b>“p” valor</b>
<b>Idade (anos)</b>	37,0 (29,0-49,5)	49,0 (37,3-60,0)	<b>0,010</b>
<b>Sexo feminino – N (%)</b>	16 (76,2)	15 (53,6)	0,108
<b>Etnia – N (%)</b>			
<b>Branco</b>	20 (95,2)	21 (75,0)	0,061
<b>Não-branco</b>	1 (4,8)	7 (25,0)	0,061
<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	26,4 ± 4,8	24,0 ± 4,8	0,087
<b>Mutação – N (%)</b>			
<b>Val50Met</b>	19 (90,5)	27 (96,4)	0,399
<b>Outras</b>	2 (9,5)	1 (3,6)	0,399
<b>ATR<sub>p</sub> – N (%)</b>	0	1 (3,6)	0,384
<b>ATR<sub>d</sub> – N (%)</b>	2 (9,5)	6 (21,4)	0,269
<b>Diagnóstico da ATTR<sub>v</sub> (anos)</b>	2 (1-7)	5 (1-14)	0,177
<b>Transplante hepático – N (%)</b>	0 (0)	9 (32,1)	<b>0,005</b>
<b>Uso de Tafamidis – N (%)</b>	0 (0)	6 (21,4)	<b>0,025</b>
<b>Pressão arterial</b>			
<b>PAS - mmHg</b>	120 (110-130)	110 (109-120)	0,144
<b>PAD - mmHg</b>	70 (60-75)	70 (60-79)	0,627
<b>Comorbidades – N (%)</b>			
<b>Hipertensão</b>	4 (19,0)	7 (25,0)	0,622
<b>Diabetes</b>	1 (4,8)	5 (17,9)	0,171
<b>Dislipidemia</b>	1 (4,8)	7 (25,0)	0,061
<b>Marca-passo definitivo</b>	0 (0)	2 (7,1)	0,217
<b>Nefrolitíase</b>	1 (4,8)	5 (17,9)	0,171
<b>Tabagismo</b>	1 (4,8)	6 (21,4)	0,104
<b>Incontinência urinária</b>	0 (0)	5 (17,9)	<b>0,043</b>
<b>Óbitos – N (%)</b>	0 (0)	3 (10,7)	0,126

Média ± DP ou mediana [intervalo interquartil] ou N (percentual) quando apropriado. IMC: índice de massa corporal; ATR<sub>p</sub>: acidose tubular renal proximal; ATR<sub>d</sub>: acidose tubular renal distal; PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica.

**Tabela 6 - Resultados Laboratoriais Séricos entre Subgrupos Assintomáticos e Sintomáticos**

	<b>Assintomáticos (n=21)</b>	<b>Sintomáticos (n=28)</b>	<b>“p” valor</b>
<b>TFGe CKD-EPI (mL/min/1,73m<sup>2</sup>)</b>	91,1 ± 14,6	82,9 ± 23,7	0,173
<b>Ureia (mg/dL)</b>	30 (25,5-34)	27 (23-40)	0,708
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	0,9 (0,8-0,9)	0,9 (0,7-1,1)	0,391
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	13,2 ± 1,2	13,8 ± 1,7	0,148
<b>HbA1c (%)</b>	5,4 (5,2-5,7)	5,5 (5,1-6,2)	0,292
<b>Na (mEq/L)</b>	140 (138-142)	140 (140-143)	0,200
<b>K (mEq/L)</b>	4,3 ± 0,3	4,5 ± 0,4	<b>0,025</b>
<b>Ca (mg/dL)</b>	9,3 ± 0,5	9,6 ± 0,5	0,076
<b>P (mg/dL)</b>	3,7 (3,3-4,1)	3,5 (3,3-3,8)	0,440
<b>Cl (mEq/L)</b>	103 (100-104)	103 (101-104)	0,883
<b>Mg (mg/dL)</b>	2,1 (2,0-2,2)	2,0 (1,9-2,3)	0,234
<b>25(OH)D3 (ng/mL)</b>	29,0 ± 7,7	26,7 ± 5,9	0,254
<b>PTHi (pg/mL)</b>	35 (31-42)	34 (27-51)	0,655
<b>Albumina (g/dL)</b>	4,4 (4,0-4,5)	4,3 (4,2-4,7)	0,484
<b>Ácido úrico (mg/dL)</b>	4,3 (3,6-5,4)	5,0 (3,6-5,1)	0,205
<b>TGO (U/L)</b>	16 (15-21)	24 (16-26)	0,053
<b>TGP (U/L)</b>	19 (13-27)	22 (18-34)	<b>0,037</b>
<b>Fosfatase alcalina (U/L)</b>	66 (48-75)	97 (60-138)	<b>0,011</b>
<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (mEq/L)</b>	25,6 ± 3,0	25,4 ± 2,5	0,971
<b>Colesterol total (mg/dL)</b>	167 ± 35	190 ± 57	0,110
<b>Triglicerídeos (mg/dL)</b>	91 (67-125)	93 (66-155)	0,835
<b>LDL-C (mg/dL)</b>	91 (80-113)	100 (76-128)	0,647
<b>HDL-C (mg/dL)</b>	52,7 ± 13,4	54,9 ± 13,8	0,599
<b>Anion Gap (mEq/L)</b>	11,6 ± 5,0	12,7 ± 4,3	0,429

Média ± DP ou mediana [intervalo interquartil] ou N (percentual) quando apropriado. HbA1c: hemoglobina glicada; 25(OH)D3: 25-hidroxi vitamina D; PTHi: paratormônio intacto; TGO: aspartato aminotransferase; TGP: alanina aminotransferase; HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>: bicarbonato; LDL: lipoproteína de baixa densidade; HDL: lipoproteína de alta densidade.

**Tabela 7-** Resultados Laboratoriais Urinários entre Subgrupos Assintomáticos e Sintomáticos

	<b>Assintomáticos (n=21)</b>	<b>Sintomáticos (n=28)</b>	<b>“p” valor</b>
<b>Débito urinário (mL/24h)</b>	1531,1 ± 594,7	1521,2 ± 702,3	0,310
<b>TFG medida (mL/min/1,73m<sup>2</sup>)</b>	97,6 ± 22,1	86,1 ± 32,9	0,069
<b>Proteinúria (mg/24h)</b>	116,8 ± 58,4	151,8 ± 122,5	0,350
<b>Albuminúria &gt; 30mg/24h – N (%)</b>	0 (0)	4 (14,2)	0,203
<b>Citrato urinário (mg/24h)</b>	461 (308-691)	329 (257-542)	0,075
<b>Anion Gap (mEq/L)</b>	45,0 ± 46,7	29,7 ± 38,3	0,645
<b>FE Na (%)</b>	0,9 (0,6-1,2)	0,9 (0,5-1,0)	0,596
<b>FE K (%)</b>	7,3 (4,1-12,7)	6,9 (4,5-8,7)	0,748
<b>FE Ca (%)</b>	1,9 (1,6-3,2)	1,6 (1,0-2,0)	0,135
<b>TRP (%)</b>	87,4 (85,7-91,5)	88,4 (84-91,7)	0,818
<b>FE Mg (%)</b>	3,8 (2,6-5,7)	2,8 (2,5-4,7)	0,352
<b>FE Ácido úrico (%)</b>	7,6 (6,2-8,8)	5,7 (4,7-8,3)	0,389
<b>pH (fita reagente)</b>	5,0 (5,0-5,5)	5,0 (5,0-6,0)	0,199
<b>pH 0h urinário (potenciometria)</b>	5,2 (5,1-5,4)	5,5 (5,0-5,9)	0,374
<b>NH<sub>4</sub> urinário 0h</b>	29,5 (23,4-38,6)	30,5 (19,9-44,9)	0,944
<b>AT urinária 0h</b>	22,4 (14,2-33,4)	18,9 (13,3-23,5)	0,164
<b>EIP (gPtn/kg/24h)</b>	1,4 (1,0-1,6)	1,3 (1,1-2,4)	0,455
<b>Ingesta de NaCl (g/24h)</b>	6,7 (5,7-10,4)	6,9 (5,4-11,8)	0,800

Média ± DP ou mediana [intervalo interquartil] ou N (percentual) quando apropriado. FE: fração de excreção; TRP: taxa de reabsorção de fosfato; EIP: estimativa de ingesta proteica; pH 0 h = pH antes do protocolo de acidificação urinária; NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 0h = amônia urinária antes do protocolo de acidificação urinária; AT 0 h = acidez titulável antes do protocolo de acidificação urinária.

Do total de 49 indivíduos, apenas 1 paciente (2,0%) apresentou bicarbonatúria isolada significativa no momento basal com possível diagnóstico de ATRp. Este paciente apresentava bicarbonato sérico normal e excreção normal de outros eletrólitos urinários. 8 pacientes (16,3%) foram diagnosticados com ATRd forma incompleta após teste de acidificação urinária. O subgrupo de pacientes sem ATRd (N=41) foi composto então pelos indivíduos que apresentaram pH urinário basal inferior a 5,30 em resposta ao teste de restrição hídrica, o que afastou o diagnóstico de ATRd. No subgrupo com ATRd, o pH urinário se manteve acima de 5,30 ( $p=0,477$ ) durante todo o protocolo de acidificação, conforme representado na FIGURA 10.

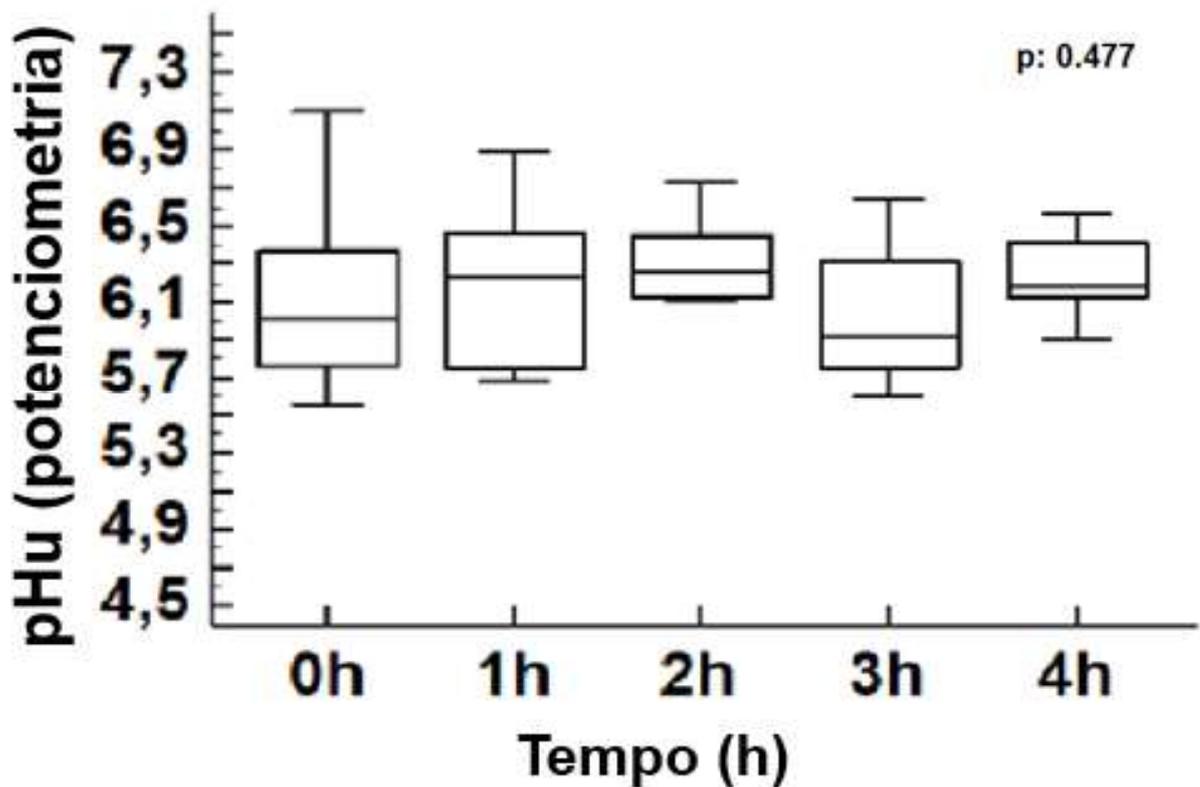


Figura 10 - Curva de pH urinário por potenciometria do grupo com ATRd.

Nestes pacientes com ATRd (n=8), realizamos dosagens de excreção de  $\text{NH}_4^+$  e AT pré e pós teste de acidificação.

Os pacientes nos quais foi feito o diagnóstico de ATR distal se caracterizaram pela ausência de aumento significativo na excreção de amônio durante o teste de acidificação com furosemida e fludrocortisona, apresentando  $\text{NH}_4^+$  pré-teste (0h) de 46,2 (28,4-75,4)  $\mu\text{Eq}/\text{min}/1,73\text{m}^2$ , enquanto o valor pós teste (4h) foi de 64,3 (28,3-84,2)  $\mu\text{Eq}/\text{min}/1,73\text{m}^2$  (p=0,742) (FIGURA 11).

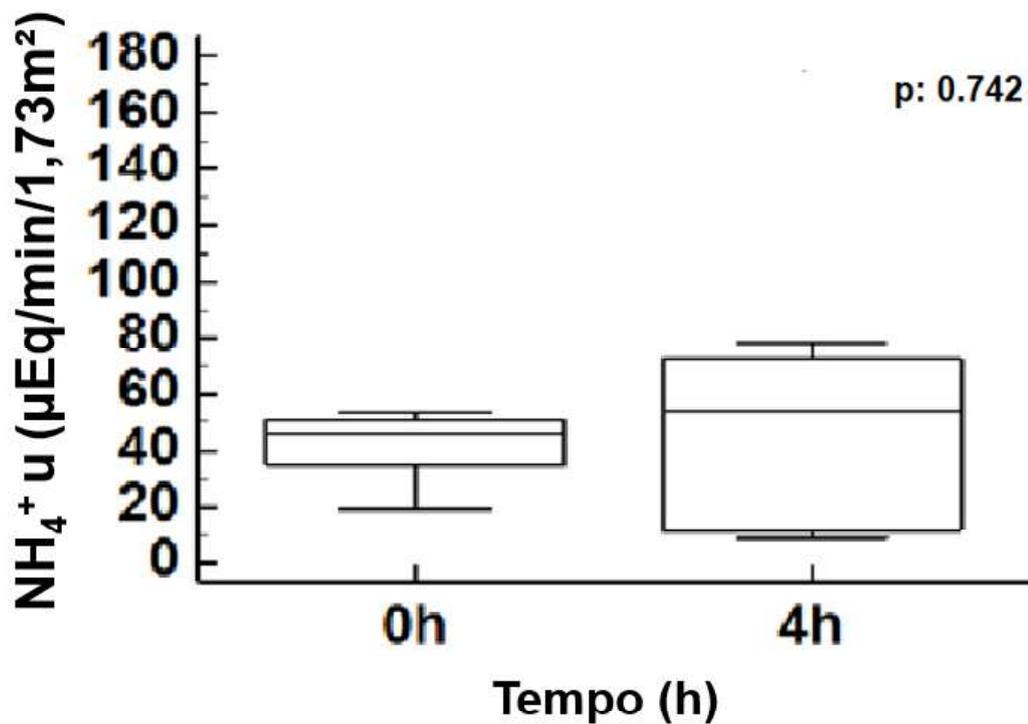
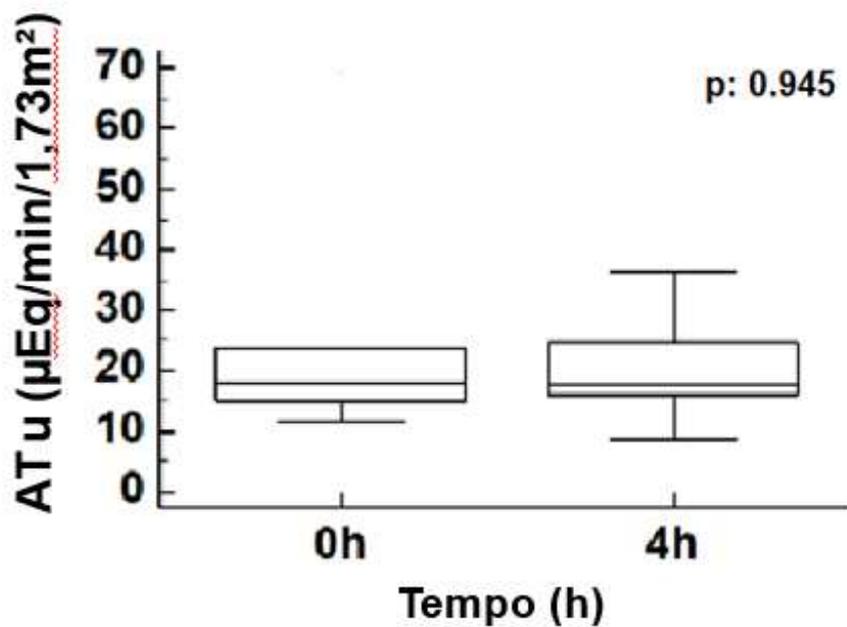


Figura 11 - Amônio urinário do grupo com ATRd pré (0h) e pós (4h) teste de acidificação urinária.

O subgrupo ATRd não apresentou aumento significativo na excreção de AT urinário em resposta ao teste de acidificação com furosemida e fludrocortisona, sendo a AT pré-teste (0h) de 18,1 (15,1-23,6)  $\mu\text{Eq}/\text{min}/1,73\text{m}^2$  e o valor pós teste (4h) de 17,7 (15,9-24,5)  $\mu\text{Eq}/\text{min}/1,73\text{m}^2$  ( $p=0,945$ ) (FIGURA 12).



**Figura 12** - Acidez titulável urinária do grupo com ATRd pré (0h) e pós (4h) teste de acidificação urinária.

Posteriormente, na análise comparativa clínico-epidemiológica entre os subgrupos sem e com ATRd (TABELA 8), dos 49 indivíduos avaliados, 9 (18,3%) apresentaram algum grau de disfunção tubular: 8 pacientes apresentaram ATRd incompleta (16,3%) e 1 paciente apresentou ATRp (2%). No grupo com ATRd, havia 2 (25%) indivíduos assintomáticos. Os 2 grupos foram homogêneos quanto à distribuição de gênero, mutação, cor de pele e IMC. Os pacientes não apresentaram diferenças significativas em relação aos níveis pressóricos ou idade. As comorbidades foram mais prevalentes no grupo sem ATRd, entretanto sem significância estatística.

Na análise comparativa dos resultados laboratoriais séricos desses subgrupos (TABELA 9), houve uma tendência de diferença significativa apenas nos valores de HbA1c, sendo de 5,5 (5,3-6,1) % no subgrupo sem ATRd e de 5,1 (5,0-5,4) % no subgrupo com ATRd ( $p=0,031$ ), além dos valores de TGO de 20 (15-32) U/L no subgrupo sem ATRd e 13 (11-18) U/L no subgrupo com ATRd ( $p=0,039$ ). O bicarbonato do subgrupo com ATRd, embora dentro do limite de normalidade, foi ligeiramente menor ( $24,5\pm 1,6$  versus  $25,7\pm 3,0$  mEq/L;  $p=0,665$ ). Na pesquisa de possíveis alterações eletrolíticas e/ou presença de acidose metabólica e/ou alterações de *anion gap* sérico, todos os resultados estiveram dentro dos valores de normalidade, sem diferenças significativas. Também não houve diferenças significativas nos marcadores de função hepática ou no controle glicêmico.

Finalmente na análise comparativa dos resultados laboratoriais urinários destes subgrupos (TABELA 10), não houve diferença significativa em relação às frações de excreção de solutos bem como na TRP, exceto a FENa, a qual foi maior no subgrupo com ATRd, sendo de 1,1 (0,9-1,7) %, enquanto no subgrupo sem ATRd foi de 0,7 (0,5-1,1) % ( $p=0,041$ ). Apesar de não haver diferença significativa, os pacientes com ATRd apresentaram uma mediana do valor de citrato urinário de apenas 56% do valor dos pacientes sem ATRd [230 (136-566) versus 405 (297-629) mg/24h; ( $p=0,159$ )] e média do bicarbonato urinário quatro vezes maior ( $2,0\pm 4,0$  versus  $0,5\pm 1,6$  mmol/L ( $p=0,075$ )). Os pHs urinários basais foram significativamente maiores no grupo ATRd, tanto na fita reagente [6,5 (6,0-6,5) versus 5,0 (5,0-5,5);  $p< 0,001$ ], quanto na potenciometria [6,2 (5,8-6,5) versus 5,2 (5,0-5,5);  $p<0,001$ ]]. O amônio basal também foi maior no grupo

com ATRd [46,4 (30,5-53,6) versus 29,1 (20-36,6)  $\mu\text{Eq}/\text{min}/1,73\text{m}^2$ ;  $p=0,016$ ]. Não houve diferença na acidez titulável basal entre esses dois subgrupos [21,6 (13,3-26,4) versus 19,0 (15,7-23,6)  $\mu\text{Eq}/\text{min}/1,73\text{m}^2$  ( $p=0,968$ )].

**Tabela 8 - Características Clínicas e Epidemiológicas entre Subgrupos sem e com ATRd**

	<b>Sem ATRd (n=41)</b>	<b>Com ATRd (n=8)</b>	<b>“p” valor</b>
<b>Idade (anos)</b>	47 (35.5-58.5)	40 (30.0-48.0)	0.550
<b>Sexo feminino – N (%)</b>	27 (65.9)	4 (50)	0.395
<b>Etnia – N (%)</b>			
<b>Branco</b>	34 (83.0)	7 (87.5)	0.755
<b>Não- branco</b>	7 (17.0)	1 (12.5)	0.755
<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	25.1 $\pm$ 4.6	25.1 $\pm$ 5.3	0.580
<b>Mutação – N (%)</b>			
<b>Val50Met</b>	38 (92.7)	8 (100)	0.435
<b>Outras</b>	3 (7.3)	0 (0)	0.435
<b>Sintomáticos – N (%)</b>	21 (51.2)	6 (75.0)	0.220
<b>Diagnóstico da ATTRv (anos)</b>	3 (1-10)	2 (2-9)	0.822
<b>Transplante hepático – N (%)</b>	8 (19.5)	1 (12.5)	0.643
<b>Uso de Tafamidis – N (%)</b>	4 (9.8)	2 (25)	0.236
<b>Pressão arterial</b>			
<b>PAS - mmHg</b>	115 (110-127.5)	120 (110-130)	0.968
<b>PAD - mmHg</b>	70 (60-80)	70 (60-70)	0.234
<b>Comorbidades – N (%)</b>			
<b>Hipertensão</b>	10 (24.4)	1 (12.5)	0.465
<b>Diabetes</b>	6 (14.6)	0 (0)	0.253
<b>Dislipidemia</b>	8 (19.5)	1 (12.5)	0.643
<b>Marca-passo definitivo</b>	1 (2.4)	1 (12.5)	0.186
<b>Nefrolitíase</b>	5 (12.2)	1 (12.5)	0.981
<b>Tabagismo</b>	6 (14.6)	1 (12.5)	0.878
<b>Incontinência urinária</b>	4 (9.8)	1 (12.5)	0.820

Média  $\pm$  DP ou mediana [intervalo interquartil], proporções quando apropriado. IMC: índice de massa corporal, ATRp: acidose tubular renal proximal, ATRd: acidose tubular renal distal, PAS: pressão arterial sistólica, PAD: pressão arterial diastólica.

**Tabela 9 - Resultados Laboratoriais Séricos entre Subgrupos sem e com ATRd**

	<b>Sem ATRd (n=41)</b>	<b>Com ATRd (n=8)</b>	<b>“p” valor</b>
<b>TFGe CKD-EPI (mL/min/1,73m<sup>3</sup>)</b>	86.4 ± 21.4	88.7 ± 18.7	0.756
<b>Ureia (mg/dL)</b>	30 (24-37)	24 (21-40)	0.358
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	0.9 (0.7-1.1)	0.9 (0.8-1.1)	0.864
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	13.6 ± 1.5	13.4 ± 1.7	0.857
<b>HbA1c (%)</b>	5.5 (5.3-6.1)	5.1 (5.0-5.4)	0.031
<b>Na (mEq/L)</b>	140 (138-142)	140 (138-144)	0.909
<b>K (mEq/L)</b>	4.4 ± 0.4	4.5 ± 0.2	0.485
<b>Ca (mg/dL)</b>	9.5 ± 0.4	9.6 ± 0.4	0.710
<b>P (mg/dL)</b>	3.7 (3.4-4.1)	3.5 (3.1-3.7)	0.529
<b>Cl (mEq/L)</b>	103 (100-104)	102 (99-104)	0.977
<b>Mg (mg/dL)</b>	2.1 (1.9-2.3)	2 (1.9-2.3)	0.988
<b>25(OH)D3 (ng/mL)</b>	28.0 ± 6.9	27.0 ± 4.0	0.777
<b>PTHi (pg/mL)</b>	25.3 (23.8-28.0)	24.9 (23.1-26.0)	0.819
<b>Albumina (g/dL)</b>	4.3 (4.0-4.7)	4.3 (4.2-4.5)	0.775
<b>Ácido úrico (mg/dL)</b>	4.4 (3.6-5.9)	5.0 (3.8-6.2)	0.389
<b>TGO (U/L)</b>	20 (15-32)	13 (11-18)	0.039
<b>TGP (U/L)</b>	20 (15-28)	18 (12-24)	0.422
<b>Fosfatase alcalina (U/L)</b>	76 (60-118)	58 (50-67)	0.085
<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (mEq/L)</b>	25.7 ± 3.0	24.5 ± 1.6	0.665
<b>Colesterol total (mg/dL)</b>	181.3 ± 52.2	166.4 ± 31.4	0.441
<b>Triglicerídeos (mg/dL)</b>	89 (66-131)	118 (65-129)	0.422
<b>LDL-C (mg/dL)</b>	97 (82-122)	81 (71-122)	0.358
<b>HDL-C (mg/dL)</b>	55 ± 13	53 ± 17	0.510
<b>Anion Gap (mEq/L)</b>	11.9 ± 4.6	13.0 ± 4.1	0.627

Média ± DP ou mediana [intervalo interquartil], proporções quando apropriado. HbA1c: hemoglobina glicada; 25(OH)D: 25hidroxi vitamina D; PTHi: paratormônio intacto; TGO: aspartato aminotransferase; TGP: alanina aminotransferase; HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>: bicarbonato; LDL: lipoproteína de baixa densidade; HDL: lipoproteína de alta densidade.

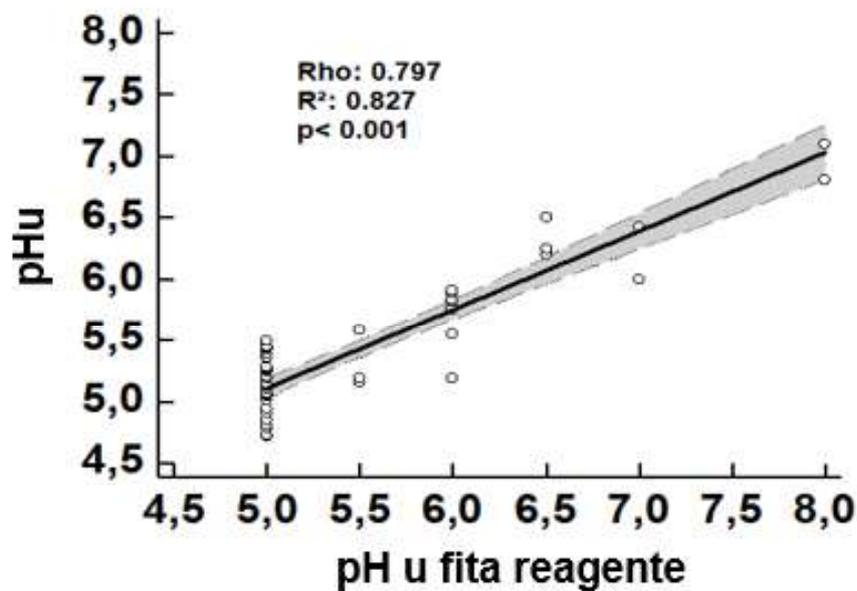
**Tabela 10 - Resultados Laboratoriais Urinários entre Subgrupos sem e com ATRd**

	<b>Sem ATRd (n=41)</b>	<b>Com ATRd (n=8)</b>	<b>“p” valor</b>
<b>Débito urinário (ml/24h)</b>	1748 ± 679	1474 ± 658	0,371
<b>TFG medida (ml/min/1.73m<sup>2</sup>)</b>	93,9 ± 30,6	74,2 ± 29,1	0,125
<b>Proteinúria (mg/24h)</b>	143,2 ± 106,8	142,4 ± 100,6	0,975
<b>Albuminúria &gt; 30mg/24h – N (%)</b>	3 (7,3)	1 (12,5)	0,830
<b>Citrato urinário (mg/24h)</b>	405 (297-629)	230 (136-566)	0,159
<b>HCO<sub>3</sub> urinário (mmol/L)</b>	0,5 ± 1,6	2,0 ± 4,0	0,075
<b>Anion Gap urinário (mmol/L)</b>	35,9 ± 44,9	62,7 ± 58,5	0,167
<b>FE Na (%)</b>	0,7 (0,5-1,1)	1,1 (0,9-1,7)	0,041
<b>FE K (%)</b>	6,9 (4,2-9,4)	7,2 (7-13)	0,286
<b>FE Ca (%)</b>	1,8 (1,3-2,3)	1,5 (0,9-2,9)	0,546
<b>TRF (%)</b>	87,6 (83,9-91,5)	88,9 (87,0-90,6)	0,591
<b>FE Mg (%)</b>	3,1 (2,5-5,2)	4,6 (3,4-5,7)	0,229
<b>FE Ácido úrico (%)</b>	6,6 (4,9-8,7)	7,1 (5,8-10,4)	0,546
<b>pH urinário (fita reagente)</b>	5,0 (5,0-5,5)	6,5 (6,0-6,5)	<0,001
<b>pH 0h urinário (potenciometria)</b>	5,2 (5,0-5,5)	6,2 (5,8-6,5)	<0,001
<b>NH<sub>4</sub> urinário 0h</b>	29,1 (20-36,6)	46,4 (30,5-53,6)	0,016
<b>AT urinária 0h</b>	21,6 (13,3-26,4)	19,0 (15,7-23,6)	0,968
<b>EIP (gPtn/kg/24h)</b>	1,3 (1,1-1,8)	1,2 (1,1-2,2)	0,203
<b>Ingesta de NaCl (g/24h)</b>	6,8 (5,8-11,8)	7,2 (3,4-8,6)	0,529

Média ± DP ou mediana [intervalo interquartil], proporções quando apropriado. FE: fração de excreção; TRF: taxa de reabsorção de fosfato; EIP: estimativa de ingesta proteica; pH 0 h = pH antes do protocolo de acidificação urinária; NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 0h = amônia urinária antes do protocolo de acidificação urinária; AT 0 h = acidez titulável antes do protocolo de acidificação urinária.

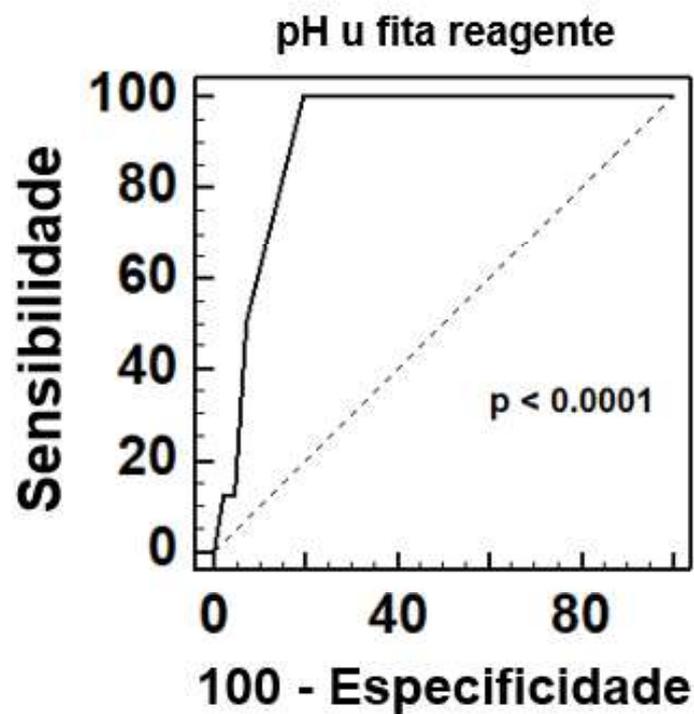
Para comparação entre os métodos de avaliação de pH urinário aferida por fita reagente (EAS ou *dipstick*) e dosagem de pH urinário medido por potenciometria (pHmetro), realizamos análise de correlação linear em toda população (n=49). Na FIGURA 13 está representado o gráfico de dispersão dos dados com a reta de regressão entre estes parâmetros (*Spearman's* Rho 0,797, R<sup>2</sup> 0,827; p<0,001). A equação de regressão linear está descrita a seguir:

$$\text{UpH potenciometria} = 0,6407 \times \text{UpH fita reagente} + 1,9084$$



**Figura 13** - Curva de correlação linear entre o pHu da fita reagente e potenciometria.

A fim de determinar o ponto de corte com melhor sensibilidade e especificidade para exclusão do diagnóstico de ATRd através de pH urinário em fita reagente, realizamos análise através de curva ROC. Identificamos que valores de pH urinário abaixo de 5,5 medidos através de fita reagente apresentaram sensibilidade de 100% e especificidade de 80,5% para exclusão de ATRd ( $p < 0,0001$ ), conforme mostrado na FIGURA 14.



**Figura 14** - Curva ROC de sensibilidade do pHu por fita reagente  $< 5,5$  para afastar ATRd.

## 6 DISCUSSÃO

Grande parte da literatura sobre envolvimento renal na ATTRv é baseada em pequenas séries. A avaliação de diferentes mutações, atualmente denominadas variantes genéticas patogênicas, não é homogênea, e os relatos apenas descrevem alterações de proteinúria, albuminúria e creatinina ou simplesmente descrevem a presença de depósitos renais de amiloide.

Apesar de tratar-se da mesma variante genética, a evolução clínica classicamente descrita em pacientes portugueses com ATTRv por Val50Met é diferente da observada no Brasil. O motivo ainda não é completamente elucidado, tendo possível influência da penetrância variável da doença. Em Portugal, observa-se proteinúria significativa e evolução para doença renal crônica estágio final em até um terço dos casos. Aqui, a doença evolui com um curso mais indolente em relação à nefropatia amiloidótica por TTR, com rara evolução para proteinúria nefrótica ou terapia renal substitutiva, mesmo antes dos novos tratamentos atualmente disponíveis, como Tafamidis e os oligonucleotídeos *antisense* (SILVA *et al*, 2019). Essa discrepância é parcialmente justificada pela penetrância variável da doença. Entretanto, a ausência de alterações laboratoriais não significa a ausência de acometimento renal, conforme já fora exposto por Lobato e Rocha em 2012, que mostrou a presença dos depósitos amiloides renais mesmo na ausência de proteinúria e alteração da creatinina. Avaliando especificamente os depósitos tubulares, nenhuma associação foi encontrada entre proteinúria e deposição de amiloide tubular (LOBATO *et al*, 1998). Portanto, devemos buscar outras formas de avaliação funcional renal diferentes das dosagens de proteinúria e creatinina, que possam representar um diagnóstico precoce da nefropatia pela ATTRv, especialmente em regiões que apresentam fenótipo com evolução indolente da nefropatia, como o Brasil. Desse modo, este é um estudo inédito, uma vez que avaliamos a capacidade de acidificação urinária dos pacientes portadores da mutação na TTR, ou seja, avaliação específica do compartimento tubulointersticial renal. Síndromes tubulares ainda não foram atribuídas à ATTRv por V50M (LOBATO e ROCHA, 2012).

Realizamos um estudo transversal com 49 indivíduos, o que a princípio pode ser considerado um número absoluto pequeno. Entretanto, quando consideramos uma doença rara como amiloidose hereditária por mutação da Transtirretina, com cerca de apenas 50.000 pacientes em todo o mundo (WADDINGTON-CRUZ *et al*, 2018) e prevalência estimada em 0,56 a 1 por 10<sup>6</sup> habitantes (SOLIGNAC *et al*, 2022), esse montante torna-se muito relevante.

A população selecionada foi majoritariamente caucasiana (83,7%) e portadora da mutação Val50Met (93,9%), o que pode ter relação com a forte colonização portuguesa no Brasil, cujo referido país europeu é uma das principais regiões endêmicas de ATTRv no mundo. No entanto, não houve determinação formal da ascendência dos participantes desse estudo. Esses achados corroboram a literatura, que descreve a Val50Met como a mutação mais prevalente em todo o mundo e em áreas endêmicas como Portugal, Japão e Suécia (CONCEIÇÃO, 2012). Quando consideramos a distribuição dos tipos de mutações dentro do território brasileiro, o perfil da população analisada também vai ao encontro dos achados nacionais já descritos por Waddington-cruz *et al*, em 2019, que mostra maior prevalência de Val50Met na região Sudeste, origem de 100% da população analisada.

Uma quantidade considerável de portadores da mutação na TTR foi assintomática (42,9%), provavelmente devido à prática de rastreio dos familiares de cada caso confirmado, independente da presença de sintomas ou não. Essa conduta possivelmente também impactou no pouco tempo de diagnóstico apresentado pelos pacientes em geral [3 (1-9) anos] e no fato de esse tempo ser menor no subgrupo dos assintomáticos quando comparados aos sintomáticos. Interessante frisar que houve baixa prevalência de doenças preexistentes potencialmente lesivas ao rim, como HAS, DM, entre outras, o que reforça que nossos resultados representam achados atribuíveis à nefropatia pela ATTRv. A baixa prevalência de manifestações cardíacas deveu-se provavelmente à elevada prevalência da mutação Val50Met, que tem uma menor incidência de acometimento cardíaco. Dos 6 pacientes que apresentaram nefrolitíase, apenas 2 foram diagnosticados com ATTRd, ambos com hipocitúria. A TFG média de 85,5±20,5 ml/min/1,73m<sup>2</sup> – bem acima de 45 ml/min/1,73m<sup>2</sup> que foi utilizada como ponto de corte – e a ausência de proteinúria mostraram função renal glomerular preservada em nossa população. Esse

dado difere dos estudos mais recentes da literatura, como o de Solignac *et al* em 2022, que fez uma análise retrospectiva de 103 pacientes com dados coletados por 10 anos, onde a prevalência de DRC foi de 23% em todos os pacientes. A proteinúria e TFG dentro da normalidade minimiza possíveis interferências nos resultados e sustenta que nossos achados podem preceder as alterações renais descritas de forma mais clássica. De maneira geral, também não detectamos distúrbios eletrolíticos ou acidobásicos sistêmicos. A estimativa de ingestão proteica calculada por excreção de uréia de 24 horas também estava dentro da normalidade na população geral. Este dado, assim como níveis séricos de albumina também normais, denota homogeneidade do estado nutricional da população. Alterações do estado nutricional poderiam interferir nos marcadores de função renal tanto glomerular quanto tubular.

Ao avaliar os subgrupos de assintomáticos versus sintomáticos, observamos pacientes transplantados hepáticos ou em uso de tafamidis apenas entre os sintomáticos, uma vez que são formas de tratamento instituídas somente para a doença já manifestada clinicamente. A incontinência urinária também só esteve presente entre os sintomáticos, uma vez que esse é um dos principais sintomas geniturinários da doença pela disfunção autonômica. Apenas um dos pacientes incontinentes era diabético, com diagnóstico há menos de 5 anos, em uso apenas de 1 classe de hipoglicemiante oral e com glicemia de jejum e hemoglobina glicada dentro do alvo. A pressão arterial sistólica foi discretamente mais baixa entre os sintomáticos, provavelmente também devido a disautonomia presente neste subgrupo. Já nos exames laboratoriais séricos, as diferenças mais significativas foram no potássio sérico, que foi discretamente mais baixo entre os assintomáticos, porém sem aparente repercussão clínica. TGP e fosfatase alcalina foram maiores entre os sintomáticos, provavelmente devido à influência de pacientes transplantados hepáticos neste subgrupo.

Na análise dos exames laboratoriais urinários, observamos uma média de TFG medida 11,7% menor no subgrupo dos sintomáticos, apesar de ambos os subgrupos apresentarem as referidas médias dentro da normalidade e sem diferença estatística significativa. Em termos de gravidade de disfunção renal glomerular, nossos dados diferem dos classicamente descritos na literatura sobre a evolução da TFG dos portadores da mutação Val50Met, que principalmente em regiões endêmicas como

Portugal é marcada por uma alta prevalência de DRC. Conforme exposto por Lobato *et al* em 2004, que avaliou como desfecho a evolução da função renal em pacientes majoritariamente com Val50Met, foi observada uma prevalência de até 30% de DRC nos portadores dessa mutação. Solignac e cols. (2022), avaliando 103 pacientes, detectaram que 79 eram sintomáticos. Assim como em nossa população, a maioria era do sexo feminino, portadores de Val50Met e com envolvimento predominantemente neurológico. Nesta última coorte, a prevalência de DRC entre os sintomáticos foi de 16,5%, também maior que a nossa.

Observamos proteinúria > 150 mg/dia e presença de microalbuminúria apenas no subgrupo dos sintomáticos, o que vai ao encontro dos achados descritos em Solignac *et al*, 2022, que mostrou proteinúria também apenas entre os sintomáticos e ainda constatou que, ao longo de 10 anos de análise, a proteinúria foi fator de risco isolado para perda de função renal. Lobato *et al*, 2003, também mostrou que a microalbuminúria é mais prevalente entre os sintomáticos, apesar de também tê-la identificado entre os assintomáticos em menor proporção. No mesmo trabalho, a presença de microalbuminúria em portadores assintomáticos da mutação, em comparação com aqueles com excreção urinária normal de albumina, conferiu um risco 4,8 vezes maior de desenvolver neuropatia, geralmente nos 3 anos subsequentes. No nosso trabalho não encontramos nenhum dos indivíduos assintomáticos com microalbuminúria, porém, nesse mesmo subgrupo, temos dois pacientes com diagnóstico de ATRd. Com isso, indagamos se o distúrbio de acidificação urinária não representaria um diagnóstico ainda mais precoce do que a microalbuminúria do acometimento renal pela ATTRv.

Em relação ao diagnóstico de ATR proximal (ou tipo 2), apenas 1 paciente foi diagnosticado (prevalência de 2%) através de bicarbonatúria isolada, compatível com demais marcadores de lesão tubular proximal preservados em nossa população, tais como TRP e FE ácido úrico.

Dos 49 indivíduos avaliados, 8 não apresentaram aumento significativo na excreção de H<sup>+</sup> em resposta ao protocolo de acidificação urinária com 40 mg de furosemida e 0,1 mg de fludrocortisona, o que correspondeu a uma prevalência de 16,3% de ATR distal na população total estudada (WALSH *et al*, 2007 - modificado). A resposta esperada ao teste era o incremento à excreção urinária de ácido, demonstrado pela

queda significativa do pH e o aumento também significativo da excreção de  $\text{NH}_4^+$  e de acidez titulável. A ATRd geralmente é uma condição subclínica e pode preceder a queda da TFG. Devemos destacar que todos os pacientes receberam o diagnóstico de ATR distal (ou tipo 1) forma secretora, uma vez que nenhum deles apresentou critérios laboratoriais para ATR tipo 1 forma hipercalêmica (ou voltagem-dependente), ATR tipo 3 (forma combinada) ou ATR tipo 4. Nenhum dos pacientes apresentava acidose sistêmica, caracterizando, portanto, a forma incompleta.

Walsh e colaboradores em 2007 (WALSH *et al*, 2007) descrevem seu protocolo de acidificação urinária usando furosemida e fludrocortisona como estratégia segura para o diagnóstico definitivo de ATRd em substituição ao mal tolerado teste com cloreto de amônio, até então considerado padrão ouro. Entretanto, após extensa revisão e novas avaliações, o mesmo grupo de pesquisadores sugere, em 2016, que o teste seja utilizado como método de rastreio de ATRd e não como método confirmatório (SHAVIT *et al*, 2016). Os pacientes que não atingiram níveis de pH urinário inferiores a 5,3 necessitariam, portanto, de teste confirmatório com cloreto de amônio para o diagnóstico de ATRd. Porém, uma vez que o cloreto de amônio provoca frequentemente irritação gástrica, com náuseas, vômitos e conseqüente risco de desidratação, este protocolo não foi aplicado em nossa população. Devido à presença de transplantados hepáticos, além da intensa disautonomia e diarreia frequentes entre os pacientes sintomáticos, este protocolo confirmatório foi considerado antiético em nossa população. Contudo, da mesma forma que nosso grupo, outros autores também definem ATRd forma incompleta com o protocolo descrito sem utilização do cloreto de amônio (GIGLIO *et al*, 2021).

Destacamos também que, para excluir ATR distal nos pacientes que atingem níveis de pH menores que 5,3, foi utilizada uma dose menor de fludrocortisona do que no protocolo de acidificação urinária proposto originalmente por WALSH *et al* (2007) a fim de minimizar os riscos de efeitos colaterais. Não observamos nenhum efeito colateral causado pelos medicamentos furosemida e fludrocortisona administrados por via oral, principalmente pelo cuidado tomado com hipersensibilidade às drogas e verificação da pressão arterial antes da administração de fludrocortisona, o que torna o teste uma ferramenta segura e, ao mesmo tempo, livre do desconforto abdominal frequentemente causado pelo cloreto de amônio via oral. Apesar da menor dose utilizada, um grupo

controle com indivíduos saudáveis submetidos previamente ao mesmo protocolo modificado foi totalmente capaz de atingir níveis de pH urinário inferiores a 5,3 com as doses de Furosemida e Fludrocortisona utilizadas neste laboratório.

O pHu 0h ou basal, cuja medida foi feita através de gasometria urinária antes da administração de furosemida e fludrocortisona, ou seja, sem efeito farmacológico de estímulo à acidificação urinária, foi significativamente menor nos pacientes sem ATRd. Entretanto, isoladamente, este exame não foi capaz de afastar o diagnóstico de ATRd em todos os pacientes sem o distúrbio, já que alguns daqueles que apresentaram pHu 0h > 5,5 antes do teste de acidificação urinária, conseguiram atingir um pHu < 5,3 ao final do teste. Isso mostra que a medida isolada do pH urinário, mesmo por potenciometria, sem a realização do teste de acidificação urinária, poderia fornecer resultado falso-positivo de ATR distal.

Diversos trabalhos na literatura mostram que a acidose metabólica crônica pode ter impactos negativos no estado nutricional e no metabolismo ósseo. Apesar de não termos encontrado acidose metabólica sistêmica, é importante destacar que mesmo a forma incompleta de ATRd (sem acidose sistêmica) pode levar a perda de massa óssea e maior risco de nefrolitíase por cálculos de fosfato de cálcio (DE BRITO-ASHURST *et al*, 2009). A desmineralização óssea, secundária ao tampão ósseo, ocorre em pacientes com acidose tubular renal incompleta e completa. Já foi demonstrado que a administração de bicarbonato de potássio em mulheres no climatério resultou em balanço positivo de cálcio e melhora da densitometria óssea, sendo assim um indicador indireto do dano osteomineral causado pela acidose metabólica crônica (SEBASTIAN *et al*, 1994). Além disso, a diminuição da excreção urinária de  $\text{NH}_4^+$  está associada a um maior risco de DRC terminal e a um rápido declínio da TFG, sugerindo que a incapacidade de excretar a carga ácida diária é prejudicial ao prognóstico renal (VALLET *et al*, 2015). Portanto, é de extrema relevância fazer um diagnóstico precoce de ATRd, a fim de proporcionar um tratamento também precoce, evitando as consequências deletérias deste distúrbio.

Considerando as amiloidoses em geral, é possível haver dano em todos os compartimentos renais. De acordo com Hogan *et al*, 2019, apresentação clínica pode variar desde proteinúria sub-nefrótica ou hematúria microscópica com função renal

preservada até síndrome nefrótica grave e/ou lesão renal aguda grave e potencial cronificação. Com foco nas desordens tubulares, embora raras, o diabetes insipidus e a síndrome de Fanconi foram descritas como resultado de depósitos de amiloide nos ductos coletores e túbulos proximais, respectivamente (BRIDOUX *et al*, 2012).

Em relação aos distúrbios específicos de acidificação urinaria, ATR, o mais descrito na literatura, na amiloidose do tipo AL (por gamopatia monoclonal de significado renal ou por mieloma múltiplo), é a ATR tipo 2 como manifestação da síndrome de Fanconi, que se deve à dificuldade de proteólise das cadeias leves no túbulo proximal, interferindo na sua função de absorção. Este espectro diferenciado de manifestações tubulares nas paraproteinemias pode ser ocasionado por obstrução tubular pelos cilindros, reação inflamatória induzida pela reabsorção maciça de proteínas amiloidogênicas no TCP, levando ao estresse oxidativo e produção de citocinas (IL-6, TNFa) com consequentes modificações morfológicas do compartimento tubulointersticial (BRIDOUX *et al*, 2012). Existem raros relatos de ATR tipo 4, principalmente na amiloidose AA (FEITOSA *et al*, 2022). Esses dados diferem dos nossos achados, onde identificamos majoritariamente ATR distal na população analisada. Lobato em 2012 descreveu, em uma série de biópsias renais em portadores de ATTRv, deposição amilóide tanto glomerular quanto vascular e tubulointersticial, sem predileção entre os compartimentos analisados. Logo, histologicamente, é compreensível o achado de ATRd em nossa população, porém não é possível explicar maior acometimento pelo nefron distal.

Outro cenário clínico, onde há uma série de trabalhos avaliando a capacidade de acidificação urinaria, é a anemia falciforme, cuja similaridade aos depósitos amiloides se dá pelo acometimento na região medular. Seja por disfunção endotelial relacionada à hemólise crônica, exposição crônica dos rins à hemoglobina livre de células ou lesão de isquemia/reperfusão promovida pelas células falciformes levando a um estado hipóxico no parênquima renal, a disfunção tubular falcêmica está mais bem documentada. Em 2020, Cazenave e colaboradores avaliaram 25 adultos com doença falciforme e TFGe  $\geq 60$  ml/min por  $1,73\text{m}^2$  aplicando o mesmo teste de acidificação urinaria com furosemida e fludrocortisona. Também não foi administrado o cloreto de amônio devido ao risco potencial de aumentar a polimerização da HbS. 4 pacientes apresentaram ATRd forma completa e 9 pacientes ATRd forma incompleta. No contexto da anemia falciforme em

particular, a acidose metabólica crônica leva a outras consequências deletérias além das já descritas anteriormente, como aumento da polimerização da HbS (CAZENAVE *et al*, 2020).

Apesar da ausência de diferença estatística significativa entre as medianas de citrato urinário dos subgrupos com e sem ATRd, apenas o subgrupo com ATRd apresentou um valor considerado como hipocitratúria (abaixo de 300 mg/24h), além de ser um valor 43,2% menor comparativamente ao subgrupo sem ATRd. A falta de significância estatística pode ser devido ao pequeno número de nossa amostra, o que gerou elevada dispersão nesta análise. A hipocitratúria sabidamente se correlaciona com a ATRd e ajuda a corroborar esta hipótese. A hipocitratúria ocorre devido à recuperação ávida de citrato pelas células tubulares proximais no cenário de acidose sistêmica (BATLLE e FLORES, 1996). Shavit e colaboradores em 2016, revendo o protocolo de Walsh de 2007, inclusive sugerem que a combinação de um teste furosemida e fludrocortisona anormal associado à hipocitratúria e urina alcalina aumenta a probabilidade diagnóstica de ATRd, podendo evitar o teste de cloreto de amônio.

Um achado interessante com consequências para prática clínica em nosso estudo foi a excelente correlação entre os pHs urinários medidos por fita reagente (EAS ou *dipstick*) e por potenciometria (pHmetro). Esse é um dado útil para triagem, uma vez que a medida por potenciometria não está amplamente disponível na prática clínica. Assim, amplia-se o acesso à medida do pHu de forma confiável para este cenário. Adicionalmente, conseguimos determinar que uma medida de pHu < 5,5 por fita reagente simples teve sensibilidade de 100% e especificidade de 80,5% para excluir o diagnóstico de ATRd.

Assim sendo, os resultados do presente estudo demonstraram uma prevalência relativamente alta de ATRd nessa população. Esses achados reforçam a importância de se rastrear o diagnóstico dessa condição, uma vez que há benefício no tratamento precoce com a reposição de álcali e correção da acidose metabólica para os pacientes portadores de ATTRv, mesmo nos pacientes ainda sem os clássicos sintomas da doença. Conforme mencionado, nenhum paciente diagnosticado com ATRd apresentava acidose metabólica sistêmica, constituindo a chamada forma incompleta de ATRd. A ausência de acidemia pode justificar a apresentação oligossintomática ou mesmo assintomática.

Estes resultados levantam aspectos importantes da disfunção tubular em pacientes com ATTRv. De todos os portadores de ATTRd, nenhum apresentava comprometimento de TFG e apenas metade apresentava proteinúria muito discreta (até o momento o marcador clínico de acometimento renal mais precoce descrito).

Sugerimos, portanto, que o distúrbio tubular de acidificação urinária (ATR) pode ser um marcador ainda mais precoce de nefropatia na ATTRv, reforçando a importância da monitorização regular da função renal tubular em todos os pacientes portadores de mutação V50M para ATTRv, como pH urinário em fita reagente. O diagnóstico e tratamento precoces da ATTRd forma incompleta (como uso de citrato de potássio), mesmo com função glomerular preservada, poderiam minimizar a progressão da lesão tubulointersticial e mesmo glomerular no futuro.

Finalmente, este é o primeiro estudo até o momento que diagnosticou distúrbios de acidificação urinária (ATR) em indivíduos portadores de mutação na transtirretina. Encontramos elevada prevalência de ATTRd subclínica, inclusive entre os portadores assintomáticos da variante genética, sugerindo que essa alteração seja um marcador precoce da nefropatia amiloide por TTR. Este diagnóstico de ATTRd forma incompleta em indivíduos com mutação Val50Met poderia inclusive ser utilizado como marcador de lesão em órgão-alvo da ATTRv.

Novos estudos longitudinais e de intervenção são necessários para avaliar o impacto do tratamento medicamentoso específico da ATTRd na progressão das nefropatias em pacientes com ATTRv, assim como dos novos agentes farmacológicos que estabilizam a doença diminuindo a produção de TTR mutada.

## 7 CONCLUSÕES

Nossa população final consistiu em 49 indivíduos com ATTRv (94% portadora de variante genética Val50Met) com mediana de 40 anos, predomínio do sexo feminino, caucasiana e bom estado nutricional. A função renal glomerular pela TFG e proteinúria estavam preservadas na população total.

Pouco mais da metade apresentava sintomas sistêmicos neurológicos e/ou cardíacos, tratamento específico por transplante hepático prévio ou uso atual de tafamidis. Estes indivíduos sintomáticos eram mais velhos, com TFG discretamente mais baixa (porém dentro da faixa de normalidade) e foram os únicos com proteinúria/albuminúria discretamente alteradas e hipocitratúria.

Nenhum paciente apresentava acidose metabólica sistêmica. A prevalência de ATRd forma incompleta foi elevada (16,3%) e de ATRp foi de apenas 2%. Não houve aumento significativo da excreção urinária de amônio nem de acidez titulável em resposta ao protocolo de acidificação urinária no subgrupo com ATRd. Houve uma tendência da FENa mais elevada e hipocitratúria nos indivíduos com ATRd.

Observamos boa correlação entre pHu por potenciometria versus pHu na fita reagente, sendo sugerido o ponto de corte  $\text{pHu} < 5,5$  na fita reagente como o de melhor acurácia para afastar ATRd na prática clínica.

## 8 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

O tamanho amostral deste estudo unicêntrico (n=49), apesar de relativamente pequeno em números absolutos, torna-se relevante no contexto de uma doença rara como a ATTRv.

A população estudada foi majoritariamente composta por apenas um tipo de mutação ou variante genética patogênica (Val50Met). Portanto, os resultados encontrados não podem ser extrapolados para as demais variantes genéticas.

O fato de ser uma pesquisa de desenho transversal (ou seccional) limita *per si* o estabelecimento de relações de causalidade.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDO, Y. et al. Guideline of transthyretin-related hereditary amyloidosis for clinicians. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 8, n. 31, p. 1-18, 2013.

BATLLE, D.; FLORES, G. Underlying defects in distal renal tubular acidosis. New understandings. **Am J Kidney Dis**, v. 27, p. 896-915, 1996.

BONAITI, B. et al. TTR familial amyloid polyneuropathy: Does a mitochondrial polymorphism entirely explain the parent-of-origin difference in penetrance? **Eur J Hum Genet**, v. 18, p. 948–952, 2010.

BRIDOUX, F. et al. Atteintes rénales des dysglobulinémies: avancées diagnostiques et thérapeutiques. **La Presse Médicale**, v. 41, n. 3, p. 276–289, 2012.

BRUNJES, D.L. et al. Transthyretin Cardiac Amyloidosis in Older Americans. **J Card Fail**, v. 22, n. 12, p. 996-1003, dez 2016.

CARR, A.S. et al. A study of the neuropathy associated with transthyretin amyloidosis (ATTR) in the UK. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 87, p. 620–627, 2016.

CARROLL, A. et al. Novel approaches to diagnosis and management of hereditary transthyretin amyloidosis. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 93, p. 668–678, 2022.

CASTAÑO, A.; BOKHARI, S.; MAURER, M. S. Unveiling wild-type transthyretin cardiac amyloidosis as a significant and potentially modifiable cause of heart failure with preserved ejection fraction. **European Heart Journal**, v. 36, n. 38, p. 2595-2597, 2015.

CAZENAVE, M. et al. Tubular Acidification Defect in Adults with Sickle Cell Disease. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 15, n. 1, p. 16-24, 2020.

COELHO, T. et al. Natural history and survival in stage 1 Val30Met transthyretin familial amyloid polyneuropathy. **Neurology**, v. 91, p. 1999–2009, 2018.

COELHO, T. et al. A natural history analysis of asymptomatic *TTR* gene carriers as they develop symptomatic transthyretin amyloidosis in the Transthyretin Amyloidosis Outcomes Survey (THAOS). **Amyloid**. V. 29 (4), p. 228-236, 2022.

CONCEIÇÃO, I. Clinical features of TTR-FAP in Portugal. **Amyloid**, v. 19, n. 1, p. 71–72, 2012.

DE BRITO-ASHURST, I. et al. Bicarbonate supplementation slows progression of CKD and improves nutritional status. **J Am Soc Nephrol**, v. 20, p. 2075-2084, 2009.

DUBREY, S.W.; HAWKINS, P.N.; FALK, R.H. Amyloid diseases of the heart: assessment, diagnosis, and referral. **Heart**, v. 97, p. 75–84, 2011.

FEITOSA, V.A. et al. Renal amyloidosis: a new time for a complete diagnosis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 55, p. 12284, out 2022.

FENOGLIO, R. et al. Renal Involvement in Transthyretin Amyloidosis: The Double Presentation of Transthyretin Amyloidosis Deposition Disease. **Nephron**, v. 146, n. 5, p. 481-488, 2022.

FLEMING, C.E.; SARAIVA, M.J.; SOUSA, M.M. Transthyretin enhances nerve regeneration. **J Neurochem**, v. 103, p. 831-839, 2007.

FERRARO, P. M. et al. Renal Involvement in Hereditary Transthyretin Amyloidosis: An Italian Single-Centre Experience. **Brain Sciences**, v. 11, n. 8, p. 980, 2021.

FINSTERER, J. et al. Hereditary transthyretin-related amyloidosis. **Acta Neurol Scand**, v. 139, p. 92–105, 2019.

GERTZ, M.; Dispenzieri, A. Systemic Amyloidosis Recognition, Prognosis, and Therapy. **JAMA**, v. 324, n. 1, p. 79, 2020.

GERTZ, M. et al. Diagnosis, Prognosis, and Therapy of Transthyretin Amyloidosis. **JACC**, v. 66, p. 2451–2466, 2015.

GIGLIO, S. et al. Distal renal tubular acidosis: a systematic approach from diagnosis to treatment. **Journal of Nephrology**, v. 34, n. 6, p. 2073-2083, 2021.

GOMES, M.M. Amiloidose familiar por transtirretina TTR Val30Met e os primórdios do Centro de Estudos de Paramiloidose Antonio Rodrigues de Mello. **Rev Bras Neurol**, v. 47, n. 2, p. 7-21, 2011.

HAMN, L.L.; HERING-SMITH, K.S. Acid-base transport in the collecting duct. **Semin Nephrol**, v. 13, p. 246-255, 1993.

HELOU, C.M.B.; SEGURO, A.C.; KUDO, L.H. Função Tubular. In: Riella, Miguel. **Princípios de nefrologia e distúrbios hidroeletrólíticos**. 6.ed. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018, P 129-160.

HENDERSON, L.J.; PALMER, W.W. On the several factors of acid excretion. **J Biol Chem**, v. 17, p. 304-315, 1914.

HOGAN, J.J. et al. Dysproteinemia and the Kidney: Core Curriculum 2019. **Am J Kidney Dis**, v. 74, n. 6, p. 822-836, 2019.

JOO, K.W. et al. Absence of H(+)-ATPase in the intercalated cells of renal tissues in classic distal renal tubular acidosis. **Clin Nephrol**, v. 49, n. 4, p. 226-231, 1998.

KAPOOR, M. et al. Clinical presentation, diagnosis and treatment of TTR amyloidosis. **J Neuromuscul Dis**, v. 6, p. 189–199, 2019.

KARET, F.E. Disorders of water and acid-base homeostasis. **Nephron Physiol**, v. 118, p. 28-34, 2011.

Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. **Kidney inter**, v. 3, p. 1–150, 2013.

KOIKE, H. et al. Pathology of early- vs late-onset TTR Met30 familial amyloid polyneuropathy. **Neurology**, v. 63, p. 129–138, 2004.

LOBATO, L. Portuguese-type amyloidosis (transthyretin amyloidosis, ATTR V30M). **J Nephrol**, v. 16, p. 438–442, 2003.

LOBATO, L. et al. Familial Amyloid Polyneuropathy Type I (Portuguese): Distribution and Characterization of Renal Amyloid Deposits. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 31, n. 6, p. 940-946, 1998.

LOBATO, L. et al. Familial ATTR amyloidosis: microalbuminuria as a predictor of symptomatic disease and clinical nephropathy. **Nephrol Dial Transplant**, v. 18, p. 532–538, 2003.

LOBATO, L. et al. End-stage renal disease and dialysis in hereditary amyloidosis TTR V30M: presentation, survival and prognostic factors. **Amyloid: J. Protein Folding Disord**, v. 11, p. 27 – 37, 2004.

LOBATO, L.; ROCHA, A. Transthyretin Amyloidosis and the Kidney. **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 7, p. 1337–1346, 2012.

MENDES SOUSA, M. et al. Deposition of Transthyretin in Early Stages of Familial Amyloidotic Polyneuropathy. **The American Journal of Pathology**, v. 159, n. 6, p. 1993–2000, 2001.

OBI, C.A. et al. ATTR Epidemiology, Genetics, and Prognostic Factors. **Methodist DeBakey Cardiovasc J**, v. 18, n. 2, p. 17-26, 2022.

OBICI, L.; SUHR, O.B. Diagnosis and treatment of gastrointestinal dysfunction in hereditary TTR amyloidosis. **Clin Auton Res**, v. 29, p. 55–63, 2019.

OLSSON, M. et al. A possible role for miRNA silencing in disease phenotype variation in Swedish transthyretin V30M carriers. **BMC Med Genet**, v. 11, p. 130, 2020.

PARMAN, Y. et al. Sixty years of transthyretin familial amyloid polyneuropathy (TTR-FAP) in Europe: where are we now? A European network approach to defining the epidemiology and management patterns for TTR-FAP. **Curr Opin Neurol**, v. 29, p. S3–S13, 2016.

PICKEN, M. M. The Pathology of Amyloidosis in Classification: A Review. **Acta Haematologica**, v. 143, n. 4, p. 322-334, 2020.

PINTEREST. Nefron geral. Rio de Janeiro, 2023. Disponível em: <https://br.pinterest.com/pin/855613629192055716/> Acesso em: 31 jan. 2023.

PINTO, M.V. et al. Neuromuscular amyloidosis: unmasking the master of disguise. **Muscle Nerve**, v. 64, p. 23–36, 2021.

PLANTÉ-BORDENEUVE, V.; SAID, G. Familial amyloid polyneuropathy. **Lancet Neurol**, v. 10, p. 1086–1097, 2011.

RASTOGI, S. P. et al. Effect of furosemide on urinary acidification in distal renal tubular acidosis. **J Lab Clin Med**, v. 104, p. 271-282, 1984.

REYNOLDS, M.M. et al. Ocular manifestations of familial transthyretin amyloidosis. **Am J Ophthalmol**, v. 183, p. 156–62, 2017.

ROCHA, A. et al. Urinary biomarkers for kidney disease in ATTR amyloidosis. **J Nephrol Ther**, v. 4, p. 181, 2014.

SCHENA, F. P. et al. Clinical and therapeutic aspects of renal amyloidosis. **Nephrol Dial Transplant**, v. 11, p. 63-68, 1996.

SEBASTIAN, A. et al. Improved mineral balance and skeletal metabolism in postmenopausal woman treated with potassium bicarbonate. **N Engl J Med**, v. 330, p. 1776–1781, 1994.

SEGURO A.C., Yu L. Filtração Glomerular. In: Riella, Miguel. **Princípios de nefrologia e distúrbios hidroeletrólíticos**. 6.ed. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018, P 113-128.

SETHI, S.; THEIS, J.D. Pathology and diagnosis of renal non-AL amyloidosis. **Journal of Nephrology**, v. 31, n. 3, p. 343–350, 2017.

SHAVIT, L. et al. Selective screening for distal renal tubular acidosis in recurrent kidney stone formers: initial experience and comparison of the simultaneous furosemide and fludrocortisone test with the short ammonium chloride test. **Nephrol Dial Transplant**, v. 31, n. 11, p. 1870-1876, 2016.

SILVA, M.D. et al. Albumin/creatinine (uACR) and protein/creatinine (uPCR) ratios in spot urine samples can be used to evaluate albuminuria and proteinuria in hereditary transthyretin amyloidosis patients. **Amyloid**, v. 26, n. 1, p. 41-42, 2019.

SLY, W.S. et al. Carbonic anhydrase II deficiency in 12 families with the autosomal recessive syndrome of osteopetrosis with renal tubular acidosis and cerebral calcification. **N Engl J Med**, v. 313, p. 139-145, 1985.

SOLIGNAC, J. et al. Kidney involvement in hereditary transthyretin amyloidosis: a cohort study of 103 patients. **Clinical Kidney Journal**, v. 15, n. 9, p. 1747–1754, 2022.

SORIANO, J.R. Renal tubular acidosis: the clinical entity. **J Am Soc Nephrol**, v. 13, p. 2160-2170, 2002.

UEDA, M.; ANDO, Y. Recent advances in transthyretin amyloidosis therapy. **Translational Neurodegeneration**, v. 3, p. 19, 2014.

UNWIN, R.J.; CAPASSO, G. The renal tubular acidosis. **J R Soc Med**, v. 94, p. 221-225, 2001.

VALLET, M. et al. Urinary ammonia and long-term outcomes in chronic kidney disease. **Kidney International**, v. 88, n. 1, p. 137–145, 2015.

WADDINGTON-CRUZ, M. et al. Hereditary transthyretin amyloidosis: baseline characteristics of patients in the NEURO-TTR trial. **Amyloid**, v. 25, n. 3, p. 180-188, 2018.

WADDINGTON-CRUZ, M.; PINTO, M.V.; FOGUEL, D. Geographic distribution of ATTR cases from CEPARM across the Brazilian territory and their clinical aspects, demographics, ethnical and family background. **Amyloid**, v. 26, p. 53–54, 2019.

WALSH, S.B., et al. Urinary acidification assessed by simultaneous furosemide and fludrocortisone treatment: an alternative to ammonium chloride. **Kidney Int**, v. 71, p. 1310-1316, 2007.

WRONG O. Distal renal tubular acidosis: the value of urinary pH, pCO<sub>2</sub> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> measurements. **Pediatr Nephrol**, v. 5, p. 249-255, 1991.

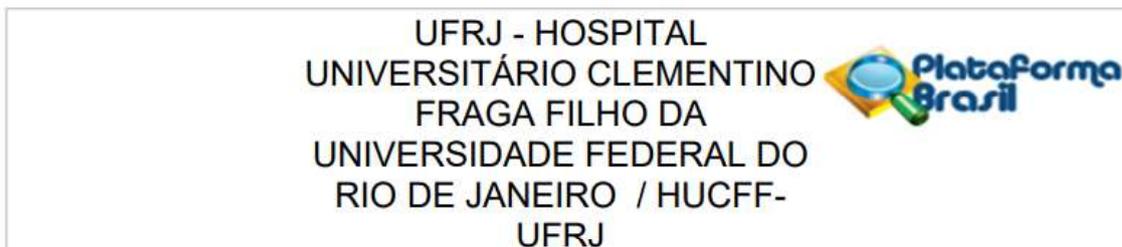
YAMAMOTO, S. et al. Liver transplantation for familial amyloidotic polyneuropathy (FAP): a single-center experience over 16 years. **Am J Transplant**, v. 7, p. 2597–2604, 2007.

YANAGISAWA, A. et al. Amyloid deposits derived from transthyretin in the ligamentum flavum as related to lumbar spinal canal stenosis. **Mod Pathol**, v. 28, n. 2, p. 201–207, 2015.

ZHEN, D. B. et al. Frequencies and geographic distributions of genetic mutations in transthyretin- and non-transthyretin-related familial amyloidosis. **Clinical Genetics**, v. 88, n. 4, p. 396–400, 2014.

## ANEXOS

### ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO CEP



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL GLOMERULAR E TUBULAR EM PACIENTES PORTADORES DE AMILOIDOSE HEREDITÁRIA POR MUTAÇÃO DA TRANSTIRRETINA.

**Pesquisador:** Moises Dias da Silva

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 47772021.5.0000.5257

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

**Patrocinador Principal:** HOSPITAL UNIVERSITARIO

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.964.441

##### Apresentação do Projeto:

Protocolo 128-21. Respostas recebidas em 07/07/2021.

As informações colocadas nos campos denominados "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo intitulado "PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_926904.pdf", postado em 07/07/2021

UFRJ - HOSPITAL  
UNIVERSITÁRIO CLEMENTINO  
FRAGA FILHO DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO DE JANEIRO / HUCFF-  
UFRJ



Continuação do Parecer: 4.964.441

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoCEP.docx	07/05/2021 22:05:45	Moises Dias da Silva	Aceito
Outros	CurriculumPesquisadores2021.docx	07/05/2021 13:48:17	Moises Dias da Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DeclaracaoPesquisadoresAssinada.pdf	07/05/2021 13:44:12	Moises Dias da Silva	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DeclaracaoInfraestruturaAssinada.pdf	07/05/2021 13:43:05	Moises Dias da Silva	Aceito
Outros	FolhadeRostoEditavel.pdf	07/05/2021 13:39:26	Moises Dias da Silva	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRostoAssinada.pdf	07/05/2021 13:36:27	Moises Dias da Silva	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RIO DE JANEIRO, 11 de Setembro de 2021

\_\_\_\_\_  
**Assinado por:**  
**Carlos Alberto Guimarães**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco N°255, 7º andar, Ala E  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 21.941-913  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3938-2480 **Fax:** (21)3938-2481 **E-mail:** cep@hucff.ufrj.br

## ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ  
Hospital Universitário Clementino Fraga Filho – HUCFF  
Serviço e Disciplina de Nefrologia - Laboratório de Fisiopatologia Renal  
Av. Professor Rodolpho Paulo Rocco, nº 255  
7º andar – Ilha do Fundão - Rio de Janeiro - RJ – Brasil CEP 21941-590

### TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Pesquisa:

“AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL GLOMERULAR E TUBULAR EM PACIENTES PORTADORES DE AMILOIDOSE HEREDITÁRIA POR MUTAÇÃO DA TRANSTIRRETINA”.

Pesquisadores Principal: Moises Dias da Silva e Priscilla Cardim Fernandes

Prezado (a) Paciente:

Você está sendo convidado(a) a participar da pesquisa “AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL GLOMERULAR E TUBULAR EM PACIENTES PORTADORES DE AMILOIDOSE HEREDITÁRIA POR MUTAÇÃO DA TRANSTIRRETINA”, desenvolvido pelos pesquisadores Moises Dias da Silva e Priscilla Cardim Fernandes, no Hospital universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF), na UFRJ, sob orientação do Prof. Dr. Carlos Perez Gomes e da Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marcia Waddington Cruz. O termo de consentimento livre e esclarecido é obtido após convite e esclarecimento verbais detalhados sobre o estudo ao paciente atendido no ambulatório de polineuropatia amiloidótica familiar do CEPARM (centro de estudos em paramiloidose Antônio Rodrigues de Melo), que funciona no sétimo andar do HUCFF. **As vias do presente termo serão rubricadas, assinadas e datadas, caso deseje participar do estudo. Uma delas será entregue para o você e a outra será retida pelo pesquisador. Sendo que só deverá ser preenchida, após você ler e compreender as informações aqui descritas, além de esclarecer todas as suas dúvidas.** Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária, ou seja, não obrigatória, neste estudo, que tem como objetivo o diagnóstico precoce das alterações renais causadas pela amiloidose hereditária por mutação da transtirretina (TTR). O organismo produz todos os dias uma grande quantidade de substâncias tóxicas, que são filtradas pelos rins e eliminadas através da urina. Alguns fatores podem dificultar a eliminação dessas substâncias, resultando em uma condição chamada de acidose. O rim também deve ser capaz de concentrar a urina, eliminando água do organismo na medida certa. Portanto, o objetivo principal do estudo é avaliar a presença de acidose (eliminação de substâncias ácidas de forma insuficiente pelos rins) e a capacidade do rim de concentrar a urina nos pacientes portadores de amiloidose por mutação da TTR. Os resultados obtidos terão como benefício o diagnóstico precoce de doença renal secundária a amiloidose e possibilitará o início do tratamento também precoce quando necessário. Essas funções serão avaliadas através de exames de sangue e urina convencionais. Serão perguntados dados como a sua data de nascimento, sexo, peso, altura, grau de escolaridade, nacionalidade, alergias, idade ao apresentar os primeiros sintomas da doença, se você tem outros parentes portadores dessa doença, se você fuma ou já fumou, se tem ou tinha o costume de ingerir bebidas alcoólicas, se já apresentou cálculos renais, se já apresentou mais de três infecções urinárias em um período de 1 (um) ano, se você possui alguma dificuldade para urinar, se você possui outras doenças crônicas diferentes da amiloidose e quais são as medicações que você toma diariamente. Você tem o direito de recusar-se a responder as perguntas que ocasionem constrangimentos de qualquer natureza. Todas as informações obtidas

por questionamento ou em exames permanecerão confidenciais e serão utilizadas somente para fins do protocolo de pesquisa. O seu nome nunca será revelado e o Sr(a). será identificado por um número em todos os relatórios e publicações oriundos desta pesquisa. Os dados obtidos com este estudo e o material biológico (urina) coletado serão utilizados somente para esta pesquisa, sendo o material biológico armazenado em um biorrepositório durante a sua permanência no local e posteriormente descartado após análise deles, de acordo com as normas de segurança de descarte de material biológico hospitalar. Os exames de sangue e urina simples serão consultados no prontuário pela equipe da pesquisa. Serão considerados os exames previamente solicitados e realizados na sua rotina de consultas ambulatoriais.

Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ Hospital Universitário Clementino Fraga Filho – HUCFF Serviço e Disciplina de Nefrologia - Laboratório de Fisiopatologia Renal Av. Professor Rodolpho Paulo Rocco, nº 255 7º andar – Ilha do Fundão - Rio de Janeiro - RJ – Brasil CEP 21941-590

Já os testes que dependem de coleta horária de urina serão realizados no Laboratório de Fisiopatologia Renal, localizado no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF), 7º andar, Serviço de Nefrologia. **Você só fará uma única visita ao hospital para realização dos testes em questão.** O comparecimento ao laboratório será previamente agendado, com marcação de data e hora. Será necessário que você, no dia anterior aos exames, fique em jejum a partir das 20 horas. Há o desconforto de não poder ingerir inclusive líquidos até chegar ao laboratório no dia seguinte. Entre 03:30h e 04:00h da manhã do dia dos exames, você precisará desprezar toda a urina e anotar a hora, não devendo mais urinar até chegar ao laboratório no HUCFF onde fará os testes. O horário de chegada ao laboratório será estabelecido para as 07:45h. No momento da chegada, será necessário que você esvazie espontaneamente a bexiga (urine completamente) e, a partir desse momento, será iniciada a coleta de urina de hora em hora, sendo que antes disso você receberá 40mg da medicação Furosemida (1 comprimido) e 0,1mg de Fludrocortisona (1 comprimido) administrados por via oral, de acordo com o protocolo de referência internacional vigente para pesquisa da acidificação da urina. Você poderá apresentar sintomas de queda da pressão arterial (hipotensão) como tontura e suor, porém serão rapidamente atendidos pelos médicos participantes do estudo caso aconteçam. Você precisará permanecer no hospital durante aproximadamente 5 horas contadas do momento de sua chegada. Após a coleta da primeira urina às 07:45h, você poderá ingerir livremente água e alimentos, que serão garantidos pelo pesquisador. Serão também considerados no estudo os dados das consultas ambulatoriais, medicações em uso e outras doenças que a pessoa já saiba que tenha. Todos vocês terão acesso aos resultados de seus exames e terão oportunidade de acompanhamento nefrológico (renal), se necessário, no ambulatório de Nefrologia do HUCFF sala 237 às terças feiras no turno da tarde. É direito de todos os participantes ter acesso a divulgação dos resultados da pesquisa, sempre mantendo o anonimato dos indivíduos. Os achados da pesquisa também serão comunicados às autoridades competentes, bem como aos órgãos legitimados pelo controle social, sempre que estes resultados puderem contribuir para a melhoria das condições de vida da população em análise, preservando, porém, a imagem e o anonimato dos indivíduos participantes, garantindo que eles não sejam estigmatizados. É direito dos participantes a garantia a ressarcimento, isto é, compensação material, de despesas do participante e de eventual acompanhante (caso se faça necessário) como, por exemplo, transporte e alimentação. O valor da passagem para o transporte será fornecido em dinheiro (ida e volta) e a alimentação será fornecida ao final dos testes ainda no laboratório em questão. É direito dos participantes a garantia de assistência imediata, integral e gratuita no HUCFF no caso de danos decorrentes da pesquisa, como por exemplo, efeitos colaterais das medicações administradas. O acompanhamento seguirá durante o tempo que for necessário para o paciente. **Importante pontuar que você terá garantido o seu direito a buscar indenização por danos decorrentes da pesquisa.**

Em qualquer etapa do estudo você terá acesso ao pesquisador responsável, Moises Dias da Silva, para esclarecimento de dúvidas, requerimento de orientações, reclamações ou requerimento de assistência para eventuais efeitos colaterais das medicações administradas nos testes. Esse acesso será 24 horas por dia 7 dias por semana em casos de urgência, através do telefone celular 21 997813428. O mesmo também pode ser encontrado no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho/HUCFF, 7º andar, CEPARM, telefone 3938-6231 ou Serviço e Disciplina de Nefrologia, também no 7º andar, telefone 3938-2337. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HUCFF – R. Prof. Rodolpho P. Rocco, 255, 7º andar/ Ala E – Cidade Universitária/Ilha do Fundão, CEP 21941913 - telefone 3938-2480 ou 3938-2481, de segunda a sexta-feira, das 8 às 16 horas, ou por meio do e-mail [cep@hucff.ufrj.br](mailto:cep@hucff.ufrj.br). **O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é um órgão que controla as questões éticas das pesquisas na instituição (UFRJ) e tem como uma das principais funções proteger os participantes da pesquisa de qualquer problema.**

A sua participação nessa pesquisa é voluntária e saiba que, se por qualquer motivo, você não quiser participar ou tiver que interromper o programa antes de seu término, isso em nada intervirá no seu atendimento nesse hospital. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com informações obtidas de outros pacientes, não sendo divulgada a identidade de nenhum paciente. Os resultados dos exames e os dados da pesquisa são de inteira responsabilidade do pesquisador e poderão ser publicados em revistas científicas. Não haverá nenhuma remuneração para que você participe do estudo, assim como nada lhe será cobrado em qualquer fase do estudo. A análise dos resultados dos seus exames, assim como a avaliação do seu prontuário, somente será feita pelos pesquisadores envolvidos no projeto. Não será permitido acesso a terceiros (seguidores, empregadores, superiores hierárquicos), garantindo proteção contra qualquer tipo de discriminação e/ou estigmatização. Você terá acesso aos resultados parciais e finais dos seus exames em todas as etapas do estudo. Será garantida a você privacidade e confidencialidade, ou seja, seus dados pessoais oriundos da participação na pesquisa serão utilizados apenas para os fins propostos no protocolo. **Declaro que concordo em participar da pesquisa:**

\_\_\_\_\_  
Nome do participante da Pesquisa / Responsável legal

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

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante da Pesquisa / Responsável legal

\_\_\_\_\_  
Nome do Pesquisador

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

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

## ANEXO C - FOLHA DE REGISTRO DO TESTE DE AVALIAÇÃO DE FUNÇÃO RENAL TUBULAR



Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ  
Hospital Universitário Clementino Fraga Filho – HUCFF  
Serviço e Disciplina de Nefrologia - Laboratório de Fisiopatologia Renal  
Av. Professor Rodolpho Paulo Rocco, nº 255

### LABORATÓRIO DE FISIOPATOLOGIA RENAL

Nome: \_\_\_\_\_ Tel.: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_ Pront.: \_\_\_\_\_

Profissão/Ocupação: \_\_\_\_\_ Alergias: ( ) S ( ) N

D.Nasc.: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ . Idade: \_\_\_ anos. Peso: \_\_\_ kg. Alt.: \_\_\_ m. SC: \_\_\_ m<sup>2</sup>. IMC \_\_\_ kg/m<sup>2</sup>

Etnia: ( ) branca ( ) parda ( ) preta Gênero: ( ) masculino ( ) feminino

Data diag: \_\_\_/\_\_\_.

Doenças associadas \_\_\_\_\_

Medicações/Doses: \_\_\_\_\_

Volume urinário: \_\_\_\_\_ em \_\_\_\_\_ h

EAS: Bil: \_\_\_ Urob: \_\_\_ Cet: \_\_\_ Glic: \_\_\_ Prot: \_\_\_ Hb: \_\_\_ Nit: \_\_\_ pH: \_\_\_ d: \_\_\_ L: \_\_\_

	Basal Pós-TRH	01h	02h	03h	04h
Fluxo Urinário		-----	-----	-----	
pH					
Amônio	/	-----	-----	-----	/
Acidez titulável	/	-----	-----	-----	/
Osmolalidade s		-----	-----	-----	-----
Osmolalidade ur		-----	-----	-----	-----
pH					
CO <sub>2</sub> total ur		-----	-----	-----	-----
Bicarbonato ur		-----	-----	-----	-----
pCO <sub>2</sub> ur		-----	-----	-----	-----

Observações: \_\_\_\_\_

Rio de Janeiro, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

## ANEXO D - TRABALHOS APRESENTADOS/PUBLICADOS EM CONGRESSOS

### 1) Trabalho apresentado no Congresso Mundial da Sociedade Internacional de Amiloidose de 2020 na forma de pôster.

# EVALUATION OF RENAL TUBULAR FUNCTION IN HEREDITARY TRANSTHYRETIN AMYLOIDOSIS PATIENTS

*Fernandes PC<sup>1</sup>; Silva MD<sup>1,2</sup>; Gomes CP<sup>2</sup>; Santa Rosa RG<sup>1</sup>; Pinto M<sup>1</sup>; Pinto LF<sup>1</sup>; Guedes M<sup>1</sup>; Pedrosa RC<sup>1</sup>; Sequeira V<sup>1</sup>; Waddington-Cruz M<sup>1</sup>*



<sup>1</sup>Federal University of Rio de Janeiro, National Amyloidosis Referral Center, CEPARM, Brazil.  
<sup>2</sup>Federal University of Rio de Janeiro, Nephrology Division, Rio de Janeiro, Brazil.

#### INTRODUCTION

Patients with hereditary transthyretin (ATTRv) amyloidosis usually present with neurological (sensorimotor and autonomic neuropathy) and cardiologic manifestations, but may also present with renal manifestations due to glomerular or tubulointerstitial amyloid infiltration. There are rare studies evaluating tubular renal function in this population due to subclinical initial presentation of renal tubulointerstitial diseases.

#### OBJECTIVE

To evaluate tubular renal function by urinary concentration and acidification tests in a cohort of hereditary transthyretin amyloidosis patients. tubulointerstitial diseases.

#### MATERIALS & METHODS

We included patients with ATTRv amyloidosis and preserved glomerular renal function with glomerular filtration rate (GFR) > 60ml/min/1.73m<sup>2</sup> measured by CKD-EPI equation. Urinary concentration capacity was evaluated by measuring urine osmolality (uOSM) (freezing point technique) and urine specific gravity (dipstick) after a 12h water deprivation test. Proximal and distal renal tubular acidification capacities were evaluated by urinary excretion of bicarbonate (urine gas analysis) and by measuring urine pH (upH) (urine gas analysis and dipstick) hourly after a screening test using furosemide and fludrocortisone, respectively.



Urinary ammonium (uNH<sub>4</sub><sup>+</sup>) and titratable acids (uTA) excretion were also measured for diagnostic of Renal Tubular Acidosis (RTA). Statistical analysis was performed by Mann-Whitney test or Spearman's Rho coefficient of rank correlation.



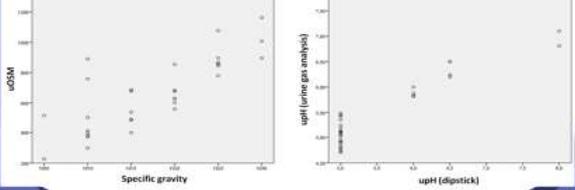
#### RESULTS

We selected 32 outpatients (43±9 years old, 38% male, 81% white skin color, BMI 24.3±4.1 kg/m<sup>2</sup>, and 7.3±7.8 years since ATTRv diagnosis). 29 patients had V30M mutation, 7 patients had history of liver transplantation and 3 patients were in use of tafamidis. The patients were divided in 2 groups according to the presence or absence of neurologic/cardiac symptoms: symptomatic (n=20) or asymptomatic (n=12). The two groups were homogenous (except for age: 50±13 x 35±11 years old, p=0.003).

In comparison between symptomatic versus asymptomatic groups, we made the following diagnostics: impaired urinary concentration (65.0 x 16.6%, p=0.008); type 2 Proximal RTA (8.3 x 0%, p=ns); type 1 Distal RTA (20 x 8.3%, p=ns); type 3 Distal RTA (8.3 x 0%, p=ns). The values of uNH<sub>4</sub><sup>+</sup> and uTA excretions were similar in the 2 groups.

Parameters / Diagnostics	Asymptomatic (n=12)	Neuro/Cardio Symptomatic (n=20)	P value*
Age (yo)	34.8 ± 10.8	49.5 ± 13.1	p=0.003
Color skin (white)	12 (100%)	14 (70%)	ns
Gender (male)	2 (16,6%)	10 (50%)	ns
BMI (Kg/m <sup>2</sup> )	24.9 ± 3.7	24.1 ± 4.4	ns
Time since diagnosis (y)	5.5 ± 7.6	8.3 ± 7.8	ns
Serum bicarbonate (mmol/L)	25.4 ± 3.4	25.3 ± 2.6	ns
Type 2 Proximal Renal Tubular Acidosis	1 (8,3%)	0	ns
Type 1 Distal Renal Tubular Acidosis	1 (8,3%)	4 (20%)	ns
Type 3 Distal Renal Tubular Acidosis	1 (8,3%)	0	ns
Impaired urinary concentration	2 (16,6%)	13 (65%)	p=0.008

There was good correlation between uOSM x specific gravity (Spearman's Rho=0.783; p<0.001) and between upH x dipstick (Spearman's Rho=0.828; p<0.001).



#### CONCLUSIONS

Urinary concentrating impairment was highly frequent in symptomatic ATTRv patients. Different types of RTA also can be diagnosed in these patients. Fasting urine specific gravity and upH (dipstick) were shown to be simple tools to exclude urinary concentration or acidification disorders. Early diagnosis of these disorders would allow preventive treatment to maintain renal function in this patients.

PM 071
ISA 2020

## 2) Trabalhos apresentados no Congresso Brasileiro de Nefrologia em 2020 na forma de pôster.

### ALTERAÇÃO DA CAPACIDADE DE CONCENTRAÇÃO URINÁRIA EM PORTADORES DE AMILOIDOSE HEREDITÁRIA POR TRANSTRINETINA.

Moisés D. Silva<sup>1,2</sup>, Priscilla Cardini<sup>1</sup>, Marcia W. Cruz<sup>2</sup>, Renata G. Santa Rosa<sup>1,2</sup>, Vanessa C. Sequeira<sup>2</sup>, Luiz Felipe R. Pinto<sup>1</sup>, Marcus Vinícius R. Pinto<sup>2</sup>, Carlos P. Gomes<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Serviço de Nefrologia, <sup>2</sup>Serviço de Neurologia, CEPARM, HUCCF, Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ



#### INTRODUÇÃO

A Amiloiose Hereditária por Transtretina (ATTR) é uma doença multisistêmica caracterizada pelo depósito de fibrilas amilóides, cujo precursor proteico é a transtretina mutada. Apesar do envolvimento do sistema nervoso periférico e cardíaco ser mais prevalente, achados como proteinúria e queda da taxa de filtração glomerular podem ocorrer, refletindo depósito no glomérulo. Todavia, a medula renal é o sítio de depósito mais usual.

#### OBJETIVO

Analisar a capacidade de concentração urinária em portadores de ATTR.

#### PACIENTES E MÉTODOS

Incluimos portadores de ATTR sintomáticos ou assintomáticos por envolvimento neurológico e/ou cardíaco, maiores de 18 anos, com TFG >45 ml/min/1,73m<sup>2</sup>. Realizamos teste de restrição hídrica de 12h para coleta de amostras de urina e soro. A osmolaridade urinária (OSMu) e a densidade urinária (Du) foram medidas por Osmômetro (Model Osmometer 3320) e por fitas reagentes (Uriquest), respectivamente. Diminuição da capacidade de concentração urinária foi definida quanto OSMu < 650 mOsm/KgH<sub>2</sub>O. A análise estatística feita através de Teste de correlação de Pearson, regressão linear simples e curva ROC.

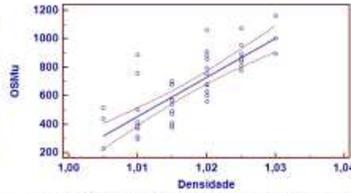


Fig 1: Curva de regressão densidade x osmolaridade urinária

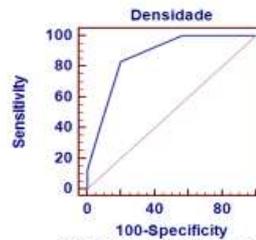


Fig 2: Curva ROC da densidade urinária

#### RESULTADOS

Avaliamos 49 indivíduos (44±13 anos, 36% homens, IMC 25,1±4,9 kg/m<sup>2</sup>; TFG 85,2±22,2 ml/min/1,73m<sup>2</sup>). 57,1% eram sintomáticos. 49% apresentaram diminuição da capacidade de concentração urinária. Na análise comparativa entre os grupos com (n=24) e sem (n=25) diminuição da capacidade de concentração urinária, observamos diferença estatística na OSMu utilizada como padrão-ouro (458±107 versus 846±134 mOsm/KgH<sub>2</sub>O p<0,001) e Du (1,013±0,004 versus 1,021±0,005 p<0,001). Na comparação entre os grupos assintomático (n=21) e sintomático (n=28) verificamos diferença significativa na OSMu (832±193 versus 524±156 mOsm/KgH<sub>2</sub>O p<0,001) e na Du (1,020±0,006 versus 1,015±0,005 p=0,004). Houve correlação significativa entre OSMu e Du gerando a seguinte equação de regressão linear OSMu = -27275,52+27455,85\*Du (R<sup>2</sup>=0,608). Através de curva ROC, encontramos Du > 1,020 (AUC 0,867; IC 95% 0,739-0,947; p<0,001) como melhor ponto de corte para descartar diminuição da capacidade de concentração urinária (sensibilidade e VPN de 100%).

#### CONCLUSÕES

Observamos alta prevalência de diminuição da capacidade de concentração urinária, sobretudo nos pacientes sintomáticos com envolvimento neurológico e/ou cardíaco. A Densidade urinária na fita reagente apresentou boa acurácia como teste de triagem nesta população de portadores de ATTR.

#### Referências:

- Walsh SB, et al. Urinary acidification assessed by simultaneous furosemide and fludrocortisone treatment: an alternative to ammonium chloride. *Kidney Int* 2007; 71:1310-1316
- Ando Y, et al. Guideline of transthyretin-related hereditary amyloidosis for clinicians. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2013; 8:31

### ACIDOSE TUBULAR RENAL EM UMA COORTE DE PORTADORES DE AMILOIDOSE HEREDITÁRIA POR TRANSTRINETINA (ATTR)

Priscilla Cardini<sup>1</sup>, Moisés Dias da Silva<sup>1,2</sup>, Marcia Waddington Cruz<sup>2</sup>, Renata Gervais de Santa Rosa<sup>1,2</sup>, Vanessa Cristina Cunha Sequeira<sup>2</sup>, Luiz Felipe Rocha Pinto<sup>1</sup>, Marcus Vinícius Rocha Pinto<sup>2</sup>, Carlos Perez Gomes<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Serviço de Nefrologia, HUCCF, Universidade Federal do Rio de Janeiro -UFRJ, <sup>2</sup>Serviço de Neurologia, CEPARM, HUCCF, Universidade Federal do Rio de Janeiro -UFRJ



#### INTRODUÇÃO

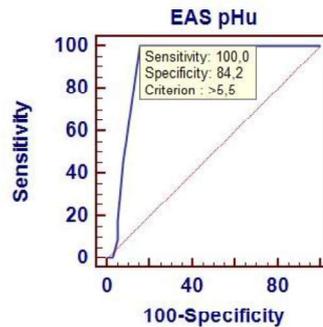
A amiloiose hereditária por mutação da transtretina (ATTR) é uma doença sistêmica, progressiva e incapacitante de caráter autossômico dominante e penetrância variável. É a forma mais comum de amiloiose hereditária (familiar). A apresentação clínica é predominantemente neurológica e cardíaca, mas já foi comprovado depósito amilóide nos compartimentos tubulointersticial e glomerular dos rins. Portanto, distúrbios de acidificação urinária, sobretudo acidose tubular renal distal (ATRd), podem ser manifestações precoces de acometimento renal nesta população.

#### OBJETIVO

Avaliar a prevalência de distúrbio de acidificação urinária subclínica em pacientes portadores de ATTR.

#### PACIENTES E MÉTODOS

Incluimos pacientes ambulatoriais portadores da mutação V30M ATTR, maiores de 18 anos, com TFG >45ml/min/1,73m<sup>2</sup>, sem acidose metabólica sistêmica. ATRd (forma incompleta) foi diagnosticada através de teste de acidificação urinária após restrição hídrica de 12 horas (TRH) e administração oral de 40mg de furosemida e 0,1mg de fludrocortisona. Coletamos amostras de sangue venoso para gasometria e de urina para análise por fita reagente, gasometria, pH urinário (pHu) por potenciometria (0h, 1h, 2h, 3h e 4h), amônio urinário (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) por espectrofotometria e acidez titulável (AT) por NaOH (0h e 4h, respectivamente). O diagnóstico de ATRd foi estabelecido se pHu > 5,3 em todas as medidas e ausência de aumento de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ou AT. Análise estatística foi realizada através de testes de Wilcoxon, Friedman e curva ROC.



#### RESULTADOS

Avaliamos 49 pacientes, 44,8±13,5 anos, 37% homens, 84% caucasianos, IMC 25,1±4,9kg/m<sup>2</sup> e com TFG 85,2±22,4ml/min/1,73m<sup>2</sup>. A prevalência de ATRd foi de 22,4% (n=11) com curva de pHu: 0h 6,0±1,6; 1h 5,9±1,7; 2h 6,1±1,5; 3h 5,8±1,2; 4h 6,1±1,5 (p=0,907). Não houve aumento significativo nas excreções urinárias de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e AT: NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 45,9(19,6-169,1μEq/min/1,73m<sup>2</sup>); 65,8(0,4-784,1μEq/min/1,73m<sup>2</sup>) (p=0,520) e AT 15,7(5,1-68,3μEq/min/1,73m<sup>2</sup>); 18,8 (1,3-363,0μEq/min/1,73m<sup>2</sup>) (p=0,898). 2 pacientes (4,1%) apresentaram bicarbonatúria discreta. pHu < 5,5 na fita reagente teve 100% de sensibilidade e VPN para afastar ATRd (AUC 0,909; p<0,001).

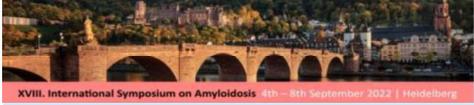
#### CONCLUSÕES

A prevalência de ATRd forma incompleta foi elevada nesta coorte de portadores de ATTR assintomáticos do ponto de vista renal. pHu na fita reagente após TRH teve boa acurácia para triagem de ATRd. O diagnóstico e tratamento precoce permitiriam minimizar o risco de desenvolvimento de complicações da ATRd nesta população.

#### Referências:

- Walsh SB et al. Urinary acidification assessed by simultaneous furosemide and fludrocortisone treatment: an alternative to ammonium chloride. *Kidney Int* 2007; 71:1310-1316
- Ando Y, et al. Guideline of transthyretin-related hereditary amyloidosis for clinicians. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2013; 8:31

### 3) Trabalho apresentado no Congresso Mundial da Sociedade Internacional de Amiloidose de 2022 na forma de pôster.



ISA 2022




**XVIII. International Symposium on Amyloidosis** | 30th - 4th September 2022 | Heidelberg

## GLOMERULAR AND TUBULAR RENAL FUNCTION IN PATIENTS WITH HEREDITARY TRANSTHYRETIN AMYLOIDOSIS (ATTR)

Moisés Dias da Silva<sup>1</sup>, Priscilla Cardim Fernandes<sup>1</sup>, Carlos Perez Gomes<sup>1</sup>, Renata Gervais Santa Rosa<sup>1</sup>, Celso Caruso-Neves<sup>2</sup>, Diogo de Barros Peruchetti<sup>2</sup>, Rodrigo Pacheco S Aguiar<sup>2</sup>, Gabriela de Nieto Amorim<sup>1</sup>, Roberto Coury Pedrosa<sup>1</sup>, Mariana Andrade Guedes<sup>1</sup>, Luiz Felipe R Pinto<sup>1</sup>, Paula R S A Vasconcellos<sup>1</sup>, Marcia Waddington Cruz<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>CEPARM, Federal University of Rio de JaneiroUFRJ, Brazil  
<sup>2</sup>Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Federal University of Rio de JaneiroUFRJ, Brazil

PO 111

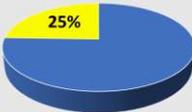
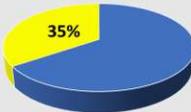
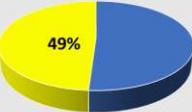
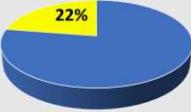
**INTRODUCTION**

Transthyretin mutation hereditary amyloidosis (TTR) is a systemic, progressive and disabling disease with an autosomal dominant character and variable penetrance. It is the most common form of hereditary (familial) amyloidosis. The clinical presentation is predominantly neurological and cardiac, but amyloid deposits have been demonstrated in the tubulointerstitial and glomerular compartments of the kidneys. Therefore, changes in glomerular or tubular renal function may be early manifestations of renal impairment in this population.

**RESULTS**

We evaluated 49 patients (46 carriers of the Val50Met mutation), 44.8±13.5 years of age, 6.5 ±7.5 years of diagnosis of the disease, 63% female, 84% Caucasian, BMI 25.1 ±4.9kg/m<sup>2</sup> and GFR 85.2±22.4ml/min/1.73m<sup>2</sup>. 57% of patients were symptomatic. Serum bicarbonate 25.1mmol/L (23.9 -26.5); Proteinuria 107mg/24h (73-190), Albuminuria 3.8mg/24h (3.8 -8.6) with prevalence of 25% (pathological proteinuria) and 9% (microalbuminuria), respectively. Urine specific gravity 1,015 (1,011 -1,020), UOSM 653mOsm/Kg/H<sub>2</sub>O (448-851) with 49% of decreased urinary concentration capacity. UpH: 0h 5.06 (5.07 -5.80); UNH<sub>4</sub><sup>+</sup>: 30.1µEq/min/1.73m<sup>2</sup> (20.8-41.3); UTA 21.2µEq/min/1.73m<sup>2</sup> (3.5-40.4); urinary citrate: 308mg/24h (218 -528) with 22% of renal tubular acidosis; UGGT 49.3U/ gcreat (9.5-100.0) with 35% of patients presenting elevated biomarker. When comparing the asymptomatic versus symptomatic groups, there was a significant difference in UOSM (p<0.001), urine specific gravity (p=0.001) and urinary citrate (p=0.008).

**Prevalence of renal dysfunctions in ATTR patients (N=49)**

Proteinuria > 150mg/24h 	Elevated proximal tubular biomarker 
Urinary concentration disorder 	Renal Tubular Acidosis 

**OBJECTIVE**

To evaluate the glomerular and tubular renal function in patients with ATTR.

**METHODS**

Cross-sectional study including outpatients with ATTR, older than 18 years old, with GFR>45ml/min/1.73m<sup>2</sup> estimated by the CKD-EPI equation. We collected blood samples for electrolyte and blood venous gas analysis, and urine sample after 12 hours of water restriction for analysis by dipstick, urinary osmolality (UOSM) by freezing point, urinary pH (UpH) by potentiometry, urinary ammonium (UNH<sub>4</sub><sup>+</sup>) by spectrophotometry and titratable acidity (UTA) by NaOH. We performed urinary measurement of gamma -glutamyl transferase (UGGT) as a biomarker of tubular lesion by 5 - Amino-2-Nitrobenzoate (14 -79U/gcreat). Proteinuria, albuminuria, citrate and electrolyte measurements were performed in 24 -hour urine. Results expressed as mean±SD or median (interquartile range). Comparison between groups was performed using non -parametric tests (Mann -Whitney).

**CONCLUSION**

Renal glomerular function was relatively preserved with low levels of tubular proteinuria. The prevalence of renal tubular function disorders was high, both in asymptomatic and symptomatic patients. We suggest that early diagnosis of subclinical renal tubular dysfunctions is important to minimize the risk of progression to chronic kidney disease in this population.

**REFERENCES**

1. Lobato et al, Clin J Am Soc Nephrol 7: 1337-1346, 2012. 2. Soriano, J Am Soc Nephrol 13: 2162-170, 2002.3. Lobato et al, Am J Kidney Dis 31 (6):949-946, 1998.

## ANEXO E – ARTIGO A SER SUBMETIDO

### Renal Tubular Acidosis in Hereditary Transthyretin Amyloidosis (ATTRv)

Priscilla Cardim Fernandes<sup>1</sup>, Moises Dias da Silva<sup>1 2</sup>, Carlos Perez Gomes<sup>1 2</sup>, Marcia Waddington Cruz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>CEPARM, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil;

<sup>2</sup>Division of Nephrology, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil.

#### ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Hereditary transthyretin amyloidosis (ATTRv) is a severe autosomal dominant inherited systemic disease, affecting the peripheral and autonomic nervous system, heart, kidney, and the eyes. Amyloid deposition has been proven in glomerular and tubulointerstitial compartments. Therefore, urinary acidification disorders such as renal tubular acidosis (RTA) may be early manifestations of renal involvement in this population.

**OBJECTIVE:** Evaluate the prevalence of subclinical RTA in individuals with TTR mutation.

**METHODS:** We included symptomatic and asymptomatic individuals with TTR mutation, older than 18 years, GFR>45 ml/min/1.73m<sup>2</sup>, without systemic metabolic acidosis. Urinary acidification protocol was performed with furosemide and fludrocortisone after 12h water deprivation test (WDT). Proximal Tubular Acidosis (pRTA) was diagnosed if FE<sub>HCO<sub>3</sub></sub>>10%. Incomplete form distal tubular acidosis (dRTA) was diagnosed if UpH>5.3 in all measurements without increased urine ammonium (U<sub>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></sub>) and Titratable Acidity (U<sub>TA</sub>)

**RESULTS:** We selected 49 individuals, 40(35.5-56.5) years old, 63% female, 84% Caucasian, BMI 24.9±4.9kg/m<sup>2</sup>, GFR 85.5±20.5ml/min/1.73m<sup>2</sup>, normal proteinuria, and no systemic metabolic acidosis. 94% had Val50Met genetic variant. 57% were symptomatic. The prevalence of pRTA was 2% (n=1) and of incomplete form dRTA was 16.3% (n=8) with UpH curve with the following medians: 0h 6.0; 1h 6.2; 2h 6.3; 3h 5.7; 4h 6.1 (p=0.477). In the subgroup with dRTA there was no significant increase in urinary excretions of UNH<sub>4</sub><sup>+</sup> and UTA. We observed good correlation between UpH by potentiometry versus UpH dipstick. The UpH<5.5 on the dipstick had 100% sensitivity and NPV to rule out dRTA.

**CONCLUSION:** This is the first study to demonstrate RTA in individuals with TTR mutation. The UpH dipstick after WDT had good accuracy for screening for dRTA. Further studies are needed to evaluate the impact of early diagnosis and treatment of RTA in this population.

Keywords: Hereditary amyloidosis, transthyretin, renal amyloidosis, renal tubular acidosis, distal renal tubular acidosis

## INTRODUCTION

Hereditary transthyretin amyloidosis (ATTRv) is an autosomal dominant disease with variable penetrance and is the most common form of hereditary amyloidosis. There are currently about 120 different mutations producing mutated TTR, among them only about ten types are non-pathogenic, and Val50Met is the most prevalent mutation <sup>(1)</sup>.

It is a multisystem, progressive, and disabling disease. The clinical presentation is characterized by involvement of the peripheral nervous system, heart, digestive system, kidneys, and eyes. Its clinical presentation is varied, ranging from exclusive neurological involvement to sporadic cases with strictly cardiologic manifestations <sup>(2)</sup>. The classic course of ATTRv consists of sensorimotor and autonomic polyneuropathy, gastrointestinal dysfunction, cardiac conduction block, infiltrative cardiomyopathy (familial amyloid cardiomyopathy), nephropathy and, less commonly, ocular deposition causing vitreous opacity or glaucoma <sup>(3)</sup>. The mean age of symptoms onset is by the fourth and fifth decades. Without treatment, the median duration from onset of symptoms to death is approximately 10 to 15 years <sup>(4)</sup>.

Initially regarded as a disease with a benign evolution in relation to renal function, it was later recognized that progression to end-stage renal failure occurs in up to one-third of patients carrying the Val50Met mutation as a natural course of the disease <sup>(5)</sup>. Nephropathy is more common in women, in patients with late-onset neuropathy, in cases with low family penetrance, and in patients already with cardiomyopathy <sup>(6)</sup>. A crucial matter in ATTRv nephropathy is recognizing the presence and distribution of renal amyloid deposits. The glomeruli, medulla, basement membrane of distal tubules, loops of Henle, and interstitium are typically filled with amyloid deposits, even in the early stages of the disease. Renal dysfunction and proteinuria are proportional to the degree of amyloid deposition in the glomeruli, arterioles, and medium vessels, but do not correlate with deposits in renal medulla <sup>(7)</sup>. Currently, the diagnosis of amyloid nephropathy can be inferred from the presence of albuminuria in patients with documented neuropathy, although the gold standard for definitive diagnosis is renal histopathology. However, albuminuria is not a specific marker of tubulointerstitial damage and may be absent in about 10 percent of patients who progress to end-stage renal disease <sup>(8,9)</sup>. There has been no description of tubulopathies in ATTR so far.

Renal tubular acidosis (RTA) is a tubular dysfunction and consists in an inability to excrete an acid load by the kidneys or to reabsorb filtered  $\text{HCO}_3^-$ , compromising the maintenance of acid-base balance <sup>(10)</sup>. It is distinguished from uremic acidosis by the presence of preserved or slightly decreased glomerular filtration rate and by being a hyperchloremic acidosis with a normal anion gap <sup>(11)</sup>. There are four types of RTA: Type 2 or proximal RTA is marked by impaired reabsorption or regeneration of  $\text{HCO}_3^-$  in the proximal tubule, which lowers the  $\text{HCO}_3^-$  reabsorption set point and increases  $\text{HCO}_3^-$  excretion fraction (>10%) even with a normal serum level <sup>(12)</sup>. Type 1 or distal RTA is the most prevalent and may be complete (decreased plasma bicarbonate) or incomplete (normal plasma bicarbonate concentration). Hypokalemia is usually present in the incomplete form. There is an impairment in distal acidification of the urine, with no reduction

in urinary pH in the presence of acidemia or even after acid overload <sup>(13)</sup>; Type 3 RTA is rare and presents characteristics of distal and proximal forms; Type 4 or hyperkalemic RTA, is caused by aldosterone deficiency or tubular resistance to this hormone <sup>(14)</sup>.

Therefore, it is pertinent to evaluate whether this population has urinary acidification disorder, since this tubular dysfunction is possible due to the medullar deposits, and it could be a valuable tool in the early diagnosis of ATTRv renal involvement. The aim of this study was to analyze the prevalence of RTA in patients with ATTRv and to compare different subgroups of patients by RTA diagnosis and by the presence of extrarenal symptoms.

## PATIENTS AND METHODS

A cross-sectional study was designed to evaluate the prevalence of subclinical urinary acidification disorders in individuals with mutation in TTR, followed in the Antonio Rodrigues de Mello Paramyloidosis Study Center (CEPARM), located at the Clementino Fraga Filho University Hospital (HUCFF) of the Federal University of Rio de Janeiro - UFRJ, Brazil. We included asymptomatic and symptomatic individuals, older than 18 years, eGFR > 45 ml/min/1.73 m<sup>2</sup> estimated by the CKD-EPI equation, and with bladder emptying control preserved. We excluded patients with active urinary tract infection, HIV, HBV or HCV infections, chronic lung disease, acute diarrhea, autoimmune diseases, pregnant women, and contraindications to the use of furosemide or fludrocortisone. The patients were evaluated from March 2019 to February 2020.

We considered symptomatic patients to be those with symptoms related to sensory motor polyneuropathy, dysautonomia, cardiac conduction disturbances, arrhythmias, or systolic or diastolic dysfunction. Asymptomatic patients were those with a positive genetic test for the mutation, but without the symptoms or signs mentioned above. <sup>(1,2,3)</sup>

All patients had their last meal at 8:00 pm of the previous day and remained in complete fasting from liquids and solids until 8:00 am, assuring maximum urinary concentration for 12 hours (water deprivation test – WDT). At 8:00 am, the first urine sample was collected (baseline sample), for the following measurements: urine pH (UpH), pCO<sub>2</sub>, and urinary bicarbonate (UHCO<sub>3</sub>) by urine gas analysis (potentiometry), ammonium (UNH<sub>4</sub><sup>+</sup>) by spectrophotometry, titratable acid (UTA) by NaOH in burette, and urinalysis by dipstick. All samples of fresh urine were collected and immediately analyzed to avoid dissipation of CO<sub>2</sub>. A venous blood sample was also collected at this initial moment for blood gas analysis and the following laboratory exams: complete blood count, glucose, glycated hemoglobin (HbA1c), sodium, potassium, calcium, magnesium, phosphate, chloride, uric acid, albumin, urea, creatinine, cholesterol, aspartate and alanine aminotransferases, alkaline phosphatase (45-129 U/L), intact PTH (iPTH) (12-65 pg/ml), vitamin D (25(OH)D3) (>30 ng/mL). For patients who did not achieve baseline urine pH < 5.5 by potentiometry after WDT, we used a modified protocol described by Wash *et al* to evaluate decreased urinary acidification capacity of distal nephron <sup>(11)</sup>. This acidification stress test consists in the administration

of 40mg of furosemide and 0,1mg of fludrocortisone, followed by urine collection every hour during 4 hours for pH measurement (0h, 1h, 2h, 3h, 4h). In the last urine sample (4h),  $\text{UNH}_4^+$  and UTA were also measured to compare with the baseline sample. pRTA was defined by  $\text{FE}_{\text{HCO}_3} > 10\%$  <sup>(15)</sup>. Incomplete dRTA was defined by  $\text{UpH} > 5.3$  on all measurements and no increase in  $\text{UNH}_4^+$  (26-28 mEq/min/1.73m<sup>2</sup>) or UTA (22-47 mEq/min/1.73m<sup>2</sup>) <sup>(16)</sup> after urinary acidification test <sup>(11, 17)</sup>.

In the same week, the patients had a 24-hour urine collection for measurements of proteinuria (<150mg/24h), albuminuria (<30µg/24h), creatinine, sodium, potassium, calcium, magnesium, phosphate, chloride, uric acid, and citrate (>320mg/24h) <sup>(18,19)</sup>. From the blood and urine samples, we were able to calculate serum anion gap [ $\text{AG} = \text{Na} - (\text{Cl} + \text{HCO}_3)$ ] (8-14mmol/L), urine anion gap [ $\text{uAG} = (\text{Na} + \text{K}) - \text{Cl}$ ] (negative values in mmol/L), measured GFR (>60ml/min), protein nitrogen appearance for estimation of protein intake [ $\text{PNA} = ((\text{urinary urea} \times 0.46) + 2) \times 6.25$ ]/body weight)] (0.8-1.2 g ptn/Kg/24h), NaCl intake estimative (g/24h) and fractional excretion (FE) of electrolytes <sup>(11,12)</sup>. The FE of every electrolyte is calculated by the formula:

$$\text{FE electrolyte} = 100 \times \frac{\text{Urine electrolyte} \times \text{Plasma creatinine}}{\text{Plasma electrolyte} \times \text{Urine creatinine}}$$

We considered as reference of fractional excretion the following values: FE Na <1%, FE K <30%, FE Ca <3%, phosphate reabsorption rate (PRR) [ $(1 - \text{FE phosphate}) \times 100$ ] >80%, FE Mg <6%, FE Uric Acid <10% <sup>(12,20)</sup>.

Categorical variables were expressed as absolute numbers and percentages, and continuous variables as mean  $\pm$  standard deviation or median (interquartile interval). We used Unpaired t-test or Mann Whitney for two-group comparisons, and Friedman Test with post-hoc analysis for three or more groups comparisons. Spearman's correlation and linear regression analysis were used to measure association between two variables. We evaluated the accuracy of dipstick pH for dRTA diagnosis with Receiver Operator Characteristic (ROC) curve. The statistical analyses were performed using IBM SPSS Statistics, version 24 (USA), and significance level was fixed at 0.05 (two-sided). The study was approved by the local Ethics Committee and the subjects gave their informed consent.

## RESULTS

There were 272 patients treated at the outpatient clinic of the CEPARM at the time. Of these, 96 were excluded for living outside the state of Rio de Janeiro, 79 for refusal to participate, 25 for impossibility of telephone contact, 9 for participating in a double-blind study at the time of evaluation, 8 for having eGFR < 45ml/min/1.73m<sup>2</sup>, 5 for having non-TTR amyloidosis and 1 for pregnancy. Therefore, we selected 49 patients, of which 28 patients were symptomatic (57.1%) and 21 asymptomatic (42.9%). From all symptomatic patients, 9 had undergone previous liver transplant and 6 were under use of Tafamidis, specific drug that stabilizes the mutated TTR protein.

The data are presented with the total population, subgroups based on the absence or presence of systemic symptoms (cardiac and/or neurological), and subgroups with and without dRTA. Baseline clinical and laboratory characteristics of symptomatic and asymptomatic group are shown in table 1, 2 and 3.

This is a population composed of young individuals, mostly women, Caucasian, with laboratory results within the normal range. 87.7% (n=44) of patients had preserved renal function, with creatinine of 0.9 (0.7-1.1) mg/dl and GFR<sub>e</sub> > 60 ml/min/1.73m<sup>2</sup>. None of them had systemic metabolic acidosis. Most have Val50Met mutation (94%) and have been diagnosed for an average of 3 years. There is a low prevalence of pre-existing diseases of any type. About half of the patients were symptomatic. Although 34.7% (n=17) showed proteinuria ≥ 150 mg on 24-h urine analysis, the mean proteinuria remained within the normal range. Only 8.1% (n=4) had albuminuria above 30 mg/day.

From the 49 patients evaluated, 9 had some degree of renal acidification dysfunction: 8 patients presented incomplete dRTA (16.3%) and 1 patient presented pRTA (2%). Among dRTA subgroup, 2 patients were asymptomatic.

There was no significant difference between the subgroups with and without dRTA from the epidemiological point of view. However, when we compare symptomatic versus asymptomatic subgroups, the asymptomatic subgroup had younger individuals. The other three parameters with significant difference were: use of Tafamidis, previous liver transplant and urinary incontinence, which were present only in the symptomatic group.

In laboratorial results, there was a significant difference between the patients with and without dRTA only in HbA1c and AST, but it does not seem to have a clinical impact. Among the symptomatic and asymptomatic subgroups, there was a difference in potassium values, also without apparent clinical impact, and in ALT and ALP values, which were higher in the symptomatic group probably due to liver transplant patients. The average proteinuria among the total number of patients was within the normal range.

In urine analysis, we found a higher FENa among the dRTA group. There was no significant difference in urinary citrate between the groups with and without dRTA.

Baseline urine pHs were significantly higher in the dRTA group, both in dipstick and potentiometry, and baseline urine ammonia was also higher in the dRTA group. There was no difference in baseline titratable acidity between these two subgroups. In figure 1, we show the urine pH curve of patients with dRTA, presenting no significant drop (UpH<5.3) during the acidification stress test. As also shown in Figure 1, there was no increase in either UTA or UNH<sub>4</sub><sup>+</sup> after the acidification stress test in this group of patients with dRTA.

Furthermore, we obtained a highly significant correlation between the dipstick UpH and the UpH potentiometry (Spearman's Rho 0.797, p<0.001), as represented by the regression line in Figure 2. We also identified through a ROC curve that the best cut-off point in dipstick to rule out dRTA was UpH <5.5, with 100% sensitivity and 80,5% specificity.

## DISCUSSION

This cross-sectional study involved outpatients with ATTRv followed by a multidisciplinary team at a reference center in ATTR. Usually, patients with ATTRv have preserved glomerular renal function, therefore, it was one of our inclusion criteria. We found a prevalence of 18.3% of RTA in this population, presented mainly by dRTA, which is usually a subclinical condition and may precede the drop in GFR.

Considering amyloidosis in general, there are several possibilities for damage in each of the kidney compartments. Focusing on tubular disorders, the most common is type 2 RTA as a manifestation of Fanconi's syndrome in AL amyloidosis, which is due to the difficulty of proteolysis of light chains in proximal tubule, interfering with its absorption function<sup>(21)</sup>. There are a few reports of type 4 RTA, mainly in amyloidosis AA<sup>(22)</sup>. However, considering only ATTRv, much of the literature about renal involvement is based on small series, describing mainly proteinuria and impairment of GFR. None of these studies reports data about tubular function.

According to Lobato and Rocha, the occurrence and onset of nephropathy in ATTRv vary according to the mutation. In our study we focused on V50M mutation, the most prevalent mutation in Brazil. In this type, renal failure generally occurs 5 years after microalbuminuria, even sooner in women<sup>(5)</sup>. A crucial matter in ATTRv nephropathy is recognizing the presence and distribution of renal amyloid deposits<sup>(6)</sup>. A few studies systematically evaluated the renal histopathology in ATTRv Val50Met and showed that in addition to the glomerular compartment, medulla, basement membrane of distal tubules, loops of Henle, and interstitium are typically filled with amyloid, even in the early stages of the disease<sup>(7)</sup>. Glomerular deposits are discreet and commonly cause albuminuria, which has been well described in the literature. Patients with albuminuria had a more extensive amyloid involvement than those without clinical renal disease<sup>(8)</sup>. Renal dysfunction and the degree of proteinuria are correlated with heavy amyloid deposition in the glomeruli, arterioles, and medium vessels, but not with deposition in medullary tissues<sup>(6)</sup>. On the other hand, there are amyloid deposits in tubulointerstitial compartment even when the patients present normal levels of albuminuria<sup>(7)</sup>. So, it is necessary to assess whether the tubulointerstitial function is also impaired, since the presence of deposits in this region is proven. This can be a tool for early diagnosis of renal manifestation of ATTRv, since it is a subclinical alteration. The search for early diagnostic tools has become relevant in recent years, due to the new treatment's options, which have prolonged the survival of patients. Furthermore, most of the currently available treatments only stabilize the disease, so they can only be initiated in patients who already have some clinical manifestation<sup>(2)</sup>. Thus, an early diagnosis is crucial for an early treatment.

Our population was composed mainly by female sex, Caucasian, given that it is a disease typically prevalent in Portuguese people and their descendants. The mean BMI was normal in general population and in each subgroup, although the symptomatic subgroup had a lower BMI, despite the absence of statistical significance. This may be due to the typical dysautonomia with significant delay in gastric emptying and chronic diarrhea. Liver transplant patients or patients under tafamidis use were only in the symptomatic subgroup, since these are forms of treatment used only for clinically manifest disease<sup>(1)</sup>.

Due to Portuguese colonization in Brazil, the most prevalent mutation in our cohort was Val50Met. There was a low prevalence of pre-existing diseases potentially harmful to the kidney, which reinforces that the results shown represent findings attributable to ATTRv nephropathy. Proteinuria and eGFR, as estimated by CKD-EPI formula, showed mostly preserved glomerular renal function in our population, which supports that our findings may precede the more classically described renal alterations.

Despite the normal GFR of all included patients, we observed a high prevalence of low urinary acidification capacity, mainly dRTA (16.3%). It is interesting to note that no patients diagnosed with dRTA had systemic metabolic acidosis, constituting the so-called incomplete form of dRTA. The absence of acidemia may justify an oligosymptomatic or even asymptomatic presentation.

Chronic metabolic acidosis can have negative impacts on nutritional status and bone metabolism. Although we did not find systemic metabolic acidosis, it is important to highlight that even the incomplete form of dRTA (without systemic acidosis) can lead to bone mass loss and increased risk of nephrolithiasis due to calcium phosphate stones <sup>(23)</sup>. Bone demineralization, secondary to bone buffering, occurs in patients with incomplete and complete renal tubular acidosis. It has been shown that administration of potassium bicarbonate in climacteric women resulted in positive calcium balance and improved bone densitometry, thus being an indirect indicator of osteomineral damage caused by chronic metabolic acidosis <sup>(24)</sup>. Furthermore, decreased UNH<sub>4</sub><sup>+</sup> excretion is associated with a higher risk of end-stage CKD and a rapid decline in GFR, suggesting that the inability to excrete the daily acid load is detrimental to renal prognosis <sup>(25)</sup>. Therefore, it is important to make an early diagnosis of dRTA to provide early treatment as well, avoiding the deleterious consequences of this disorder.

Tables 1, 2 and 3 shows the comparison between symptomatic versus asymptomatic and patients with dRTA versus without dRTA, from epidemiological, laboratorial, and urinary point of view, respectively. Asymptomatic group had younger individuals, probably because of the family screening performed on relatives of confirmed cases. Although hypokalemia is classically described in dRTA, we did not observe this disorder in our patients, and there was also no significant difference in serum potassium levels between the groups with and without dRTA.

UTA is the amount of H<sup>+</sup> secreted by the cells of the distal tubule and collecting duct, bound to the neutral salts filtered by the glomerulus, giving rise to the acid salts in the urine <sup>(26)</sup>. TA is not the only available way of acid excretion. Another mechanism is the excretion of UNH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Both allow acid excretion without excessive urinary acidity, with only about 1% of the H<sup>+</sup> load being eliminated in free form <sup>(27)</sup>. There was no significant increase in UNH<sub>4</sub><sup>+</sup> or UTA in response to the urinary acidification protocol in the subgroup with dRTA.

Despite the absence of a statistically significant difference between the median urinary citrate values of the subgroups with and without dRTA, only the subgroup with dRTA showed a value considered as hypocitraturia (<340 mg/24h). Furthermore, it is 43.2% lower compared to the subgroup without dRTA. The lack of statistical significance may be due to the small number of our sample, which caused high dispersion in this analysis. Hypocitraturia is classically related to dRTA and helps to corroborate the diagnosis. It occurs

due to avid citrate recovery by proximal tubular cells in the setting of systemic acidosis<sup>(28)</sup>. Shavit and colleagues in 2016, revising Walsh's 2007 protocol, even suggest that the combination of an abnormal furosemide and fludrocortisone test associated with hypocitraturia, and alkaline urine increases the diagnostic probability of dRTA, and may avoid ammonium chloride testing<sup>(17)</sup>. In addition, there was a tendency for FENa to be slightly higher in individuals with dRTA, which may worsen hypotension in patients who already have dysautonomia.

An interesting finding was the significant correlation between the urinary pHs measured by dipstick and by potentiometer. This is useful for screening, since potentiometry is not widely available in clinical practice. Therefore, it expands access to reliably measuring UpH for this setting. Additionally, we were able to determine that a measurement of UpH<5.5 by single reagent strip had a sensitivity of 100% and specificity of 93.9% to exclude the diagnosis of dRTA.

A limitation of this study was that we did not use an ammonium chloride overload<sup>(11, 29, 30)</sup> after the furosemide and fludrocortisone protocol, aiming to avoid the potential side effects of induced metabolic acidosis, such as nausea, vomiting, hemodynamic instability, etc. Our patients could already have dysautonomia, with a tendency to hypotension, in addition to a history of liver transplantation in some of them, increasing the risk of side effects from the use of ammonium chloride. Another issue was that our population was mostly composed of only one type of mutation or pathogenic genetic variant (Val50Met). Therefore, the results found cannot be extrapolated to the other genetic variants.

By our knowledge, this is the first study to show renal tubular disorders evaluated by urinary acidification capacity in ATTRv patients. We found a high prevalence of subclinical ATTRv and suggest how to diagnose this early renal manifestation of ATTRv. Diagnosis of subclinical ATTRv in patients with Val50Met mutation may allow specific treatment not only to avoid the complications of dRTA, but also the initiation of new agents that stabilize or decrease production of the mutated TRR. Further studies are needed to evaluate the impact of drug treatment on the progression of nephropathies in patients with ATTRv.

#### **DECLARATION OF INTEREST**

The authors report no conflicts of interest.

**REFERENCES**

- 1- Ando Y, Coelho T, Berk JL, et al. Guideline of transthyretin-related hereditary amyloidosis for clinicians. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2013; 8:31.
- 2- Cruz MW, Benson MD. A Review of Tafamidis for the Treatment of Transthyretin-Related Amyloidosis. *Neurol Ther*. 2015; 4:61–79.
- 3- Planté-Bordeneuve V, Said G. Familial amyloid polyneuropathy. *Lancet Neurol*. 2011;10: 1086–1097.
- 4- Gertz M, Benson MD, Dyck PJ, et al. Diagnosis, Prognosis, and Therapy of Transthyretin Amyloidosis. *JACC*. 2015; 66: 2451–2466.
- 5- Lobato L, Beirão I, Silva M, et al. End-stage renal disease and dialysis in hereditary amyloidosis TTR V30M: presentation, survival and prognostic factors. *Amyloid: J. Protein Folding Disord*. 2004; 11: 27 – 37.
- 6- Lobato L, Rocha A. Transthyretin Amyloidosis and the Kidney. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2012; 7: 1337–1346.
- 7- Lobato L, Beirão I, Guimarães S, et al. Familial Amyloid Polyneuropathy Type I (Portuguese): Distribution and Characterization of Renal Amyloid Deposits. *American Journal of Kidney Diseases*. 1998; 31 (6): 940-946.
- 8- Lobato L, Beirão I, Silva M, et al. Familial ATTR amyloidosis: microalbuminuria as a predictor of symptomatic disease and clinical nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2003; 18: 532–538.
- 9- Rocha A, Bravo F, Beirão I, et al. Urinary biomarkers for kidney disease in ATTR amyloidosis. *J Nephrol Ther*. 2014; 4: 5.
- 10- Seguro AC, Kudo LH, Helou CMB. Função Tubular. In: Riella, Miguel. *Princípios de nefrologia e distúrbios hidroeletrólitos*. Guanabara Koogan, 2010, P 38-49.
- 11- Walsh SB, Shirley DG, Wrong OM, et al. Urinary acidification assessed by simultaneous furosemide and fludrocortisone treatment: an alternative to ammonium chloride. *Kidney Int*. 2007; 71: 1310-1316.
- 12- Soriano JR. Renal tubular acidosis: the clinical entity. *J Am Soc Nephrol*. 2002; 13: 2160-2170.
- 13- Battle D, Flores G. Underlying defects in distal renal tubular acidosis. New understandings. *Am J Kidney Dis*. 1996; 27: 896-915.
- 14- Seguro AC, Yu L. Filtração Glomerular. In: Riella, Miguel. *Princípios de nefrologia e distúrbios hidroeletrólitos*. Guanabara Koogan, 2010, P 30-36.
- 15- Sly WS, Whyte MP, Sundaram V, et al. Carbonic anhydrase II deficiency in 12 families with the autosomal recessive syndrome of osteopetrosis with renal tubular acidosis and cerebral calcification. *N Engl J Med*. 1985; 313: 139-145.
- 16- Wrong O. Distal renal tubular acidosis: the value of urinary pH, pCO<sub>2</sub> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> measurements. *Pediatr Nephrol*. 1991; 5: 249-255.
- 17- Shavit L, Chen L, Ahmed F, et al. Selective screening for distal renal tubular acidosis in recurrent kidney stone formers: initial experience and comparison of the simultaneous furosemide and fludrocortisone test with the short ammonium chloride test. *Nephrol Dial Transplant* 2016; 31 (11): 1870-1876.
- 18- Banhara PB, Gonçalves RT, Rocha PT, et al. Tubular dysfunction in renal transplant patients using sirolimus or tacrolimus. *Clinical Nephrology*. 2015; 63 (6): 331-337.
- 19- Amarante G, Zotin MC, Rocha E, et al. Renal tubular dysfunction in patients with primary Sjogren syndrome. *Clinical Nephrology*. 2014; 81 (3): 185-191.
- 20- Magaldi AJB. Mecanismo de Concentração e de Diluição Urinária. In: Riella, Miguel. *Princípios de nefrologia e distúrbios hidroeletrólitos*. Guanabara Koogan, 2010, P 59-69.

- 21- Hogan JJ, Alexander MP, Leung N. Dysproteinemia and the Kidney: Core Curriculum 2019. *Am J Kidney Dis.* 2019; 74(6): 822-836.
- 22- Sebastian, A. Renal Amyloidosis, Nephrotic Syndrome, and Impaired Renal Tubular Reabsorption of Bicarbonate. *Annals of Internal Medicine.* 1968; 69(3): 541.
- 23- de Brito-Ashurst I, Varaganam M, Raftery MJ, et al. Bicarbonate supplementation slows progression of CKD and improves nutritional status. *J am soc nephrol.* 2009; 20: 2075-2084.
- 24- Sebastian, A. Harris ST, Ottaway JH, et al. Improved mineral balance and skeletal metabolism in postmenopausal woman treated with potassium bicarbonate. *N engl j med.* 1994; 330: 1776–1781.
- 25- Vallet, M. Metzger M, Haymann JP, et al. Urinary ammonia and long-term outcomes in chronic kidney disease. *Kidney international.* 2015; 88(1): 137–145.
- 26- Henderson LJ, Palmer WW. On the several factors of acid excretion. *J Biol Chem.* 1914; 17: 304-315.
- 27- Hamn LL, Hering-Smith KS. Acid-base transport in the collecting duct. *Semin Nephrol.* 1993; 13: 246-255.
- 28- Battle D, Flores G. Underlying defects in distal renal tubular acidosis. New understandings. *Am J Kidney Dis.* 1996; 27: 896-915.
- 29- Giglio S, Montini G, Trepiccione F, et al. Distal renal tubular acidosis: a systematic approach from diagnosis to treatment. *Journal of Nephrology.* 2021; 34(6): 2073-2083.
- 30- Rastogi SP, Crawford C, Wheeler R, et al. Effect of furosemide on urinary acidification in distal renal tubular acidosis. *J Lab Clin Med.* 1984; 104: 271-282.

TABLE 1: Epidemiological and clinical features

	TOTAL (n=49)	No dRTA (n=41)	dRTA (n=8)	“p” value	Asymptomatic (n=21)	Symptomatic (n=28)	“p” value
Age (yo)	40 (35.5-56.5)	47 (35.5-58.5)	40 (30.0-48.0)	0.550	37.0 (29.0-49.5)	49.0 (37.3-60.0)	<b>0.010</b>
Female sex – N (%)	31 (63.3)	27 (65.9)	4 (50)	0.395	16 (76.2)	15 (53.6)	0.108
<b>Skin color – N (%)</b>							
White	41 (83.7)	34 (83.0)	7 (87.5)	0.755	20 (95.2)	21 (75.0)	0.061
Non-white	8 (16.3)	7 (17.0)	1 (12.5)	0.755	1 (4.8)	7 (25.0)	0.061
BMI (Kg/m <sup>2</sup> )	24.9 ± 4.9	25.1 ± 4.6	25.1 ± 5.3	0.580	26.4 ± 4.8	24.0 ± 4.8	0.087
<b>Mutation – N (%)</b>							
Val50Met	46 (93.9)	38 (92.7)	8 (100)	0.435	19 (90.5)	27 (96.4)	0.399
Other	3 (6.1)	3 (7.3)	0 (0)	0.435	2 (9.5)	1 (3.6)	0.399
Symptomatic – N (%)	28 (57.1)	21 (51.2)	6 (75.0)	0.220	NA	NA	NA
pRTA – N (%)	1 (2.0)	NA	NA	NA	0	1 (3.6)	0.384
dRTA – N (%)	8 (16.3)	NA	NA	NA	2 (9.5)	6 (21.4)	0.269
Diagnosis of ATTR (years)	3 (1-9)	3 (1-10)	2 (2-9)	0.822	2 (1-7)	5 (1-14)	0.177
Hepatic transplant – N (%)	9 (18.4)	8 (19.5)	1 (12.5)	0.643	0 (0)	9 (32.1)	<b>0.005</b>
Tafamidis use – N (%)	6 (12.2)	4 (9.8)	2 (25)	0.236	0 (0)	6 (21.4)	<b>0.025</b>
<b>Arterial Blood pressure</b>							
SBP - mmHg	115 (110-130)	115 (110-127.5)	120 (110-130)	0.968	120 (110-130)	110 (109-120)	0.144
DBP - mmHg	70 (60-77.5)	70 (60-80)	70 (60-70)	0.234	70 (60-75)	70 (60-79)	0.627
<b>Comorbid conditions – N (%)</b>							
Hypertension	11 (22.4)	10 (24.4)	1 (12.5)	0.465	4 (19.0)	7 (25.0)	0.622
Diabetes	6 (12.2)	6 (14.6)	0 (0)	0.253	1 (4.8)	5 (17.9)	0.171
Dyslipidemia	9 (18.4)	8 (19.5)	1 (12.5)	0.643	1 (4.8)	7 (25.0)	0.061
PACE	2 (4.1)	1 (2.4)	1 (12.5)	0.186	0 (0)	2 (7.1)	0.217
Nephrolithiasis	6 (12.2)	5 (12.2)	1 (12.5)	0.981	1 (4.8)	5 (17.9)	0.171
Smoking	7 (14.3)	6 (14.6)	1 (12.5)	0.878	1 (4.8)	6 (21.4)	0.104
Urinary incontinence	5 (10.2)	4 (9.8)	1 (12.5)	0.820	0 (0)	5 (17.9)	<b>0.043</b>

Mean ± SD or median [interquartile range], proportions where appropriate. BMI: Body mass index, pRTA: proximal renal tubular acidosis, dRTA: distal renal tubular acidosis, SBP: Systolic blood pressure, DBP: Diastolic blood pressure, PACE: pacemaker.

TABLE 2: Laboratory results

	TOTAL (n=49)	No dRTA (n=41)	dRTA (n=8)	"p" value	Asymptomatic (n=21)	Symptomatic (n=28)	"p" value
eGFR CKD-EPI (ml/min/1.73m <sup>2</sup> )	85.5 ± 20.5	86.4 ± 21.4	88.7 ± 18.7	0.756	91.1 ± 14.6	82.9 ± 23.7	0.173
Urea (mg/dL)	29.5 (23.3-36.5)	30 (24-37)	24 (21-40)	0.358	30.0 (25.5-34.0)	27.0 (23.0-40.0)	0.708
Creatinine (mg/dL)	0.9 (0.7-1.1)	0.9 (0.7-1.1)	0.9 (0.8-1.1)	0.864	0.9 (0.8-0.9)	0.9 (0.7-1.1)	0.391
Hemoglobin (g/dL)	13.5 ± 1.5	13.6 ± 1.5	13.4 ± 1.7	0.857	13.2 ± 1.2	13.8 ± 1.7	0.148
HbA1c (%)	5.5 (5.1-6.0)	5.5 (5.3-6.1)	5.1 (5.0-5.4)	<b>0.031</b>	5.4 (5.2-5.7)	5.5 (5.1-6.2)	0.292
Serum Na (mmol/L)	140 (139-142)	140 (138-142)	140 (138-144)	0.909	140 (138-142)	140 (140-143)	0.200
Serum K (mmol/L)	4.4 ± 0.4	4.4 ± 0.4	4.5 ± 0.2	0.485	4.3 ± 0.3	4.5 ± 0.4	<b>0.025</b>
Serum Ca (mg/dL)	9.5 ± 0.5	9.5 ± 0.4	9.6 ± 0.4	0.710	9.3 ± 0.5	9.6 ± 0.5	0.076
Serum P (mg/dL)	3.5 (3.3-4.0)	3.7 (3.4-4.1)	3.5 (3.1-3.7)	0.529	3.7 (3.3-4.1)	3.5 (3.3-3.8)	0.440
Serum Cl (mmol/L)	103 (100-104)	103 (100-104)	102 (99-104)	0.977	103 (100-104)	103 (101-104)	0.883
Serum Mg (mg/dL)	2.1 (1.9-2.3)	2.1 (1.9-2.3)	2 (1.9-2.3)	0.988	2.1 (2.0-2.2)	2.0 (1.9-2.3)	0.234
Serum 25(OH)D3 (ng/mL)	27.7 ± 6.8	28.0 ± 6.9	27.0 ± 4.0	0.777	29.0 ± 7.7	26.7 ± 5.9	0.254
Serum iPTH (pg/mL)	35 (29.5-42.6)	25.3 (23.8-28.0)	24.9 (23.1-26.0)	0.819	35.0 (31.0-41.5)	34.0 (27.0-51.0)	0.655
Serum Albumin (g/dL)	4.3 (4.0-4.6)	4.3 (4.0-4.7)	4.3 (4.2-4.5)	0.775	4.4 (4.0-4.5)	4.3 (4.2-4.7)	0.484
Serum Uric acid (mg/dL)	4.6 (3.6-5.9)	4.4 (3.6-5.9)	5.0 (3.8-6.2)	0.389	4.3 (3.6-5.4)	5.0 (3.6-5.1)	0.205
AST (U/L)	19 (15-33)	20 (15-32)	13 (11-18)	<b>0.039</b>	16 (14.5-20.5)	24 (16-26)	0.053
ALT (U/L)	20 (16-29)	20 (15-28)	18 (12-24)	0.422	19 (13-26.5)	22 (18-34)	<b>0.037</b>
ALP (U/L)	70 (55-107)	76 (60-118)	58 (50-67)	0.085	66 (47.5-74.5)	97 (60-138)	<b>0.011</b>
Serum HCO <sub>3</sub> (mmol/L)	25.5 ± 2.7	25.7 ± 3.0	24.5 ± 1.6	0.665	25.6 ± 3.0	25.4 ± 2.5	0.971
Total cholesterol (mg/dL)	180 ± 49.6	181.3 ± 52.2	166.4 ± 31.4	0.441	167 ± 34.7	190 ± 57.2	0.110
Triglycerides (mg/dL)	92 (66-127)	89 (66-131)	118 (65-129)	0.422	91 (66.5-125)	93 (66-155)	0.835
LDL-C (mg/dL)	96 (77-121)	97 (82-122)	81 (71-122)	0.358	91 (79.5-112.5)	100 (76-128)	0.647
HDL-C (mg/dL)	54 ± 14	55 ± 13	53 ± 17	0.510	52.7 ± 13.4	54.9 ± 13.8	0.599
Serum Anion Gap (mmol/L)	12.3 ± 4.6	11.9 ± 4.6	13.0 ± 4.1	0.627	11.6 ± 5.0	12.7 ± 4.3	0.429

Mean ± SD or median [interquartile range], proportions where appropriate. NA: not applicable; HbA1C: glycated hemoglobin; 25(OH)D: 25hydroxy vitamin D; iPTH: intact parathyroid hormone; AST: aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase; ALP: alkaline phosphatase; HCO<sub>3</sub>: bicarbonate; LDL: low density lipoprotein; HDL: high density lipoprotein; AG: anion gap.

TABLE 3: Urinary analysis

	TOTAL (n=49)	No dRTA (n=41)	dRTA (n=8)	“p” value	Asymptomatic (n=21)	Symptomatic (n=28)	“p” value
Urine output (ml/24h)	1687 ± 677	1748 ± 679	1474 ± 658	0.371	1531.1 ± 594.7	1521.2 ± 702.3	0.310
Measured GFR (ml/min/1.73m <sup>2</sup> )	90.5 ± 30.5	93.9 ± 30.6	74.2 ± 29.1	0.125	97.6 ± 22.1	86.1 ± 32.9	0.069
Proteinuria (mg/24h)	141.3 ± 104.2	143.2 ± 106.8	142.4 ± 100.6	0.975	116.8 ± 58.4	151.8 ± 122.5	0.350
Urine citrate (mg/24h)	396 (271-626)	405 (297-629)	230 (136-566)	0.159	461 (308-691)	329 (257-542)	0.075
Urine HCO <sub>3</sub> (mmol/L)	0.7 ± 2.1	0.5 ± 1.6	2.0 ± 4.0	0.075	1.1 ± 3.9	0.3 ± 0.7	0.165
Urine Anion Gap (mmol/L)	40.0 ± 47.1	35.9 ± 44.9	62.7 ± 58.5	0.167	45 ± 46.7	29.7 ± 38.3	0.645
FE Na (%)	0.8 (0.6-1.2)	0.7 (0.5-1.1)	1.1 (0.9-1.7)	<b>0.041</b>	0.9 (0.6-1.2)	0.9 (0.5-1.0)	0.596
FE K (%)	7.1 (4.7-9.8)	6.9 (4.2-9.4)	7.2 (7-13)	0.286	7.3 (4.1-12.7)	6.9 (4.5-8.7)	0.748
FE Ca (%)	1.7 (1.2-2.4)	1.8 (1.3-2.3)	1.5 (0.9-2.9)	0.546	1.9 (1.6-3.2)	1.6 (1.0-2.0)	0.135
PRR (%)	87.6 (84.3-91.5)	87.6 (83.9-91.5)	88.9 (87.0-90.6)	0.591	87.4 (85.7-91.5)	88.4 (84-91.7)	0.818
FE Mg (%)	3.3 (2.6-5.2)	3.1 (2.5-5.2)	4.6 (3.4-5.7)	0.229	3.8 (2.6-5.7)	2.8 (2.5-4.7)	0.352
FE Uric Acid (%)	6.7 (5.0-8.8)	6.6 (4.9-8.7)	7.1 (5.8-10.4)	0.546	7.6 (6.2-8.8)	5.7 (4.7-8.3)	0.389
Urine pH (dipstick)	5.0 (5.0-6.0)	5.0 (5.0-5.5)	6.5 (6.0-6.5)	<b>&lt;0.001</b>	5.0 (5.0-5.5)	5.0 (5.0-6.0)	0.199
Urine pH 0h (potentiometry)	5.3 (5.1-5.8)	5.2 (5.0-5.5)	6.2 (5.8-6.5)	<b>&lt;0.001</b>	5.2 (5.1-5.4)	5.5 (5.0-5.9)	0.374
Urine NH <sub>4</sub> 0h	30.1 (20.8-41.4)	29.1 (20-36.6)	46.4 (30.5-53.6)	<b>0.016</b>	29.5 (23.4-38.6)	30.5 (19.9-44.9)	0.944
Urine TA 0h	21.3 (13.6-26.8)	21.6 (13.3-26.4)	19.0 (15.7-23.6)	0.968	22.4 (14.2-33.4)	18.9 (13.3-23.5)	0.164
PNA (gPtn/kg/24h)	1.3 (1.1-1.8)	1.3 (1.1-1.8)	1.2 (1.1-2.2)	0.203	1.4 (1.0-1.6)	1.3 (1.1-2.4)	0.455
NaCl intake (g/24h)	6.8 (5.7-11.8)	6.8 (5.8-11.8)	7.2 (3.4-8.6)	0.529	6.7 (5.7-10.4)	6.9 (5.4-11.8)	0.800

Mean ± SD or median [interquartile range], proportions where appropriate. FE: fractional excretion; PRR: phosphate reabsorption rate; PNA: protein nitrogen appearance; pH 0 h = pH before urinary acidification protocol; NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 0h = urine ammonium before urinary acidification protocol; TA 0 h = titratable acidity before urinary acidification protocol.

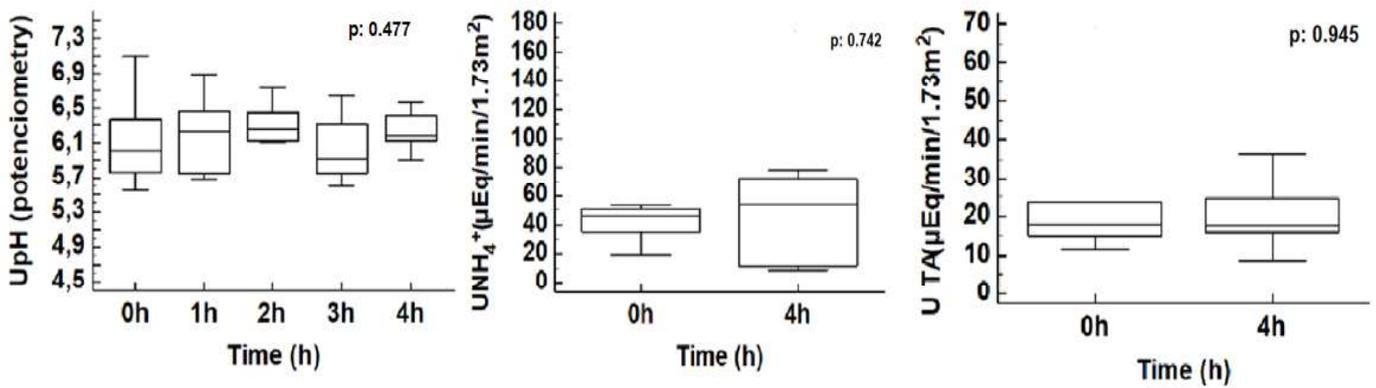


Figure 1: A- Urinary pH curve by potentiometry in the dRTA group / B- Urinary ammonium in the group with dRTA pre (0h) and post (4h) urinary acidification test / C- Urinary titratable acidity of the dRTA group pre (0h) and post (4h) urinary acidification test.

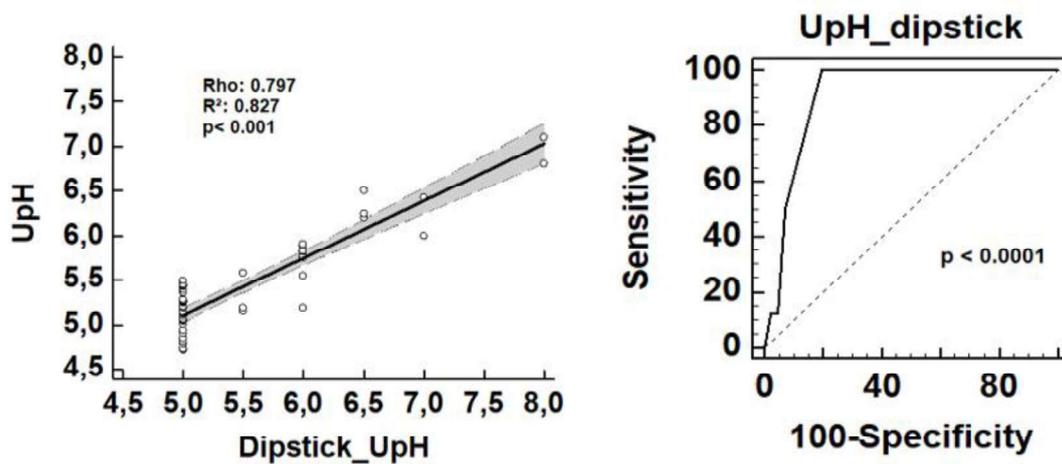


Figure 2: A- Linear correlation curve between dipstick and potentiometry UpH / B- pHu sensitivity ROC curve by dipstick  $< 5.5$  to rule out ATRd.