



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ  
ESCOLA DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE  
MESTRADO – 2014/2016**

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE SIMBIÓTICO SOBRE A TOXICIDADE  
URÊMICA E MEDIADORES INFLAMATÓRIOS EM PACIENTES RENAIIS  
CRÔNICOS EM ESTADIO 3 E 4**

ALUNA: CRISTINA TECHY ROTH STEFANSKI

ORIENTADOR: PROF<sup>a</sup> DRA. ANDRÉA NOVAIS MORENO AMARAL

CO-ORIENTADOR: PROF<sup>o</sup> DR. THYAGO PROENÇA DE MORAES

CURITIBA  
Setembro / 2016

CRISTINA TECHY ROTH STEFANSKI

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE SIMBIÓTICO SOBRE A TOXICIDADE  
URÊMICA E MEDIADORES INFLAMATÓRIOS EM PACIENTES RENAIIS  
CRÔNICOS EM ESTADIO 3 E 4**

Dissertação apresentada como requisito  
para grau de mestrado pelo Programa de  
Graduação em Ciências da Saúde,  
Escola de Medicina, Pontifícia  
Universidade Católica do Paraná.

Orientador: Prof<sup>ª</sup> Dra. Andréa Novais Moreno Amaral

Co-orientador: Prof<sup>º</sup> Dr. Thyago Proença de Moraes

CURITIBA  
Setembro / 2016

Dados da Catalogação na Publicação  
Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR  
Biblioteca Central

R845e  
2016 Roth-Stefanski, Cristina Techy  
Efeito da administração de simbiótico sobre a toxicidade urêmica e mediadores inflamatórios em pacientes renais crônicos em estadio 3 e 4 / Cristina Techy Roth-Stefanski ; orientadora: Andréa Novais Moreno Amaral ; Co-orientador: Thyago Proença de Moraes. – 2016.  
62 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, 2016  
Bibliografia: f. 48-56

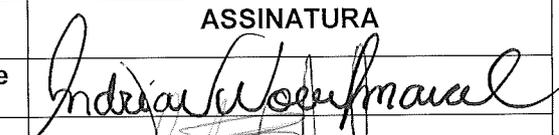
1. Insuficiência renal crônica. 2. Inflamação. 3. Uremia. I. Amaral, Andréa Novais Moreno. II. Moraes, Thyago Proença de. III. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

CDD 22. ed. – 616.614

**ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL DE MESTRADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ.**

Aos vinte dias do mês de setembro de 2016, realizou-se a sessão pública de defesa de dissertação, “**Efeito da administração de Simbiótico sobre a Toxicidade Urêmica e Mediadores Inflamatórios em Pacientes Renais Crônicos em estadio 3 e 4.**” apresentado por **Cristina Techy Roth Stefanski** para obtenção do título de mestre; Área de Concentração: Medicina e áreas afins.

A Banca Examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Profa. Dra. Andréa N Moreno Amaral - Presidente	
Profa. Dra. Cristina Baena (PUCPR)	
Prof. Dr. Mauricio Carvalho (UFPR)	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Profa. Dra. Andréa N Moreno Amaral	Conceito: <u>APROVADA</u>
Profa. Dra. Cristina Baena	Conceito: <u>Aprovada</u>
Prof. Dr. Mauricio Carvalho	Conceito: <u>APROVADA</u>

Parecer Final: APROVADA

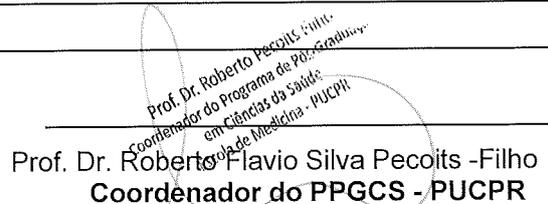
Observações da Banca Examinadora:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_



Profa. Dra. Andréa N Moreno Amaral  
Presidente da Banca Examinadora

  
Prof. Dr. Roberto Flavio Silva Pecoits -Filho  
Coordenador do PPGCS - PUCPR

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS:</b> .....	<b>1</b>
<b>LISTA DE TABELAS:</b> .....	<b>1</b>
<b>LISTA DE ABREVIÇÕES:</b> .....	<b>2</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>4</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>5</b>
<b>1 - INTRODUÇÃO</b> .....	<b>6</b>
1.1 DOENÇA RENAL CRÔNICA (DRC) .....	6
1.2 MICROFLORA INTESTINAL E FORMAÇÃO DE POTENCIAIS TOXINAS URÊMICAS .....	8
1.2.1 Fenóis.....	11
1.2.2 Indóis.....	11
1.3 USO DE PROBIÓTICOS E SIMBIÓTICOS NA DRC .....	14
<b>2 - JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>21</b>
<b>3 – OBJETIVOS</b> .....	<b>22</b>
3.1 – OBJETIVO PRIMÁRIO.....	22
3.2 – OBJETIVOS SECUNDÁRIOS .....	22
<b>4 – DESENVOLVIMENTO</b> .....	<b>23</b>
4.1 PARTICIPANTES.....	23
4.2 DELINEAMENTO .....	24
4.2.1 - Análise alimentar.....	25
4.2.2 Coleta de sangue periférico para obtenção do soro.....	26
4.2.3 Dosagens de rotina no HNSL.....	26
4.2.4 Dosagem de citocinas .....	26
4.2.5 Dosagem das toxinas urêmicas p-cresilsulfato e indoxil sulfato.....	26
4.2.6 Análise estatística .....	27
<b>5 - RESULTADOS</b> .....	<b>29</b>
5.1 – ARTIGO.....	29
<b>6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>44</b>
<b>7 – CONCLUSÕES</b> .....	<b>47</b>
<b>8 – REFERÊNCIAS</b> .....	<b>48</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>57</b>
<i>ANEXO 01 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA</i> .....	58
<i>ANEXO 02 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO</i> .....	61

## **LISTA DE FIGURAS:**

Figura 1. Efeito da DRC na microbiota (disbiose), estrutura e função da mucosa .....	9
Figura 2. Formação de p-cresilsulfato e indoxil sulfato a partir da fermentação de proteínas no cólon.....	13
Figura 3. Desenho do Estudo.....	25
Figura 4. Ingestão de fibras dos Grupos A e B nos tempos T0, T3 e T6.....	45
Figura 5. Ingestão protéica dos Grupos A e B nos tempos T0, T3 e T6.....	46
Figure 1 - Pilot clinical study design .....	40
Figure 2 - Flow diagram of the recruitment, randomization and the follow-up of study participants .....	41

## **LISTA DE TABELAS:**

Tabela 1. Classificação e descrição dos diferentes estadios da DRC.....	6
Tabela 2. Atual classificação de solutos de retenção urêmica .....	7
Tabela 3. Ensaio com probióticos em pacientes renais.....	17
Tabela 4. Ensaio com simbióticos em humanos.....	20
Table 1 - Baseline Characteristics of Participants .....	42
Table 2 - Change Scores for Primary and Secondary Outcome Measures from Baseline to Final Intervention .....	43

## LISTA DE ABREVIACOES:

AGCC: Ácidos graxos de cadeia curta

AGES: Produtos de glicação avançada

BMI: *Body Mass Index*

CKD: *Chronic Kidney Disease*

DC: Células dendríticas

DCV: Doença cardiovascular

DMA: Dimetilamina

DP: Diálise Peritoneal

DRC: Doença Renal Crônica

eGFR: estimated Glomerular Filtration Rate

FOS: Fruto-oligossacarídeos

GALT: Tecido linfóide associado ao intestino

GM-CSF: Fator estimulante de Colônia de granulócitos e macrófagos

GOS: Galacto-oligossacarídeos

HD: Hemodiálise

HNSL: Hospital Nossa Senhora da Luz

HPLC: Cromatografia líquida de alta performance

IFN- $\gamma$ : Interferon gama

IL-1 $\beta$ : Interleucina 1 beta

IL-2: Interleucina 2

IL-4: Interleucina 4

IL-5: Interleucina 5

IL-6: Interleucina 6

IL-8: Interleucina 8

IL-10: Interleucina 10

IL-12: Interleucina 12

IL-17: Interleucina 17

IMC: Índice de Massa Corporal

IN-OF: Inulina enriquecida com oligofrutose

IS: Indoxil Sulfato

LcS: *Lactobacillus casei* Shirota

MAMPs: Padrões moleculares associados a microorganismos

NDMA: Nitrodimetilamina

PCR: Proteína C reativa

pCS: *p*-cresilsulfato

PPRs: Receptores de reconhecimento padrão

PTH: Paratormônio

R24h: Recordatório de 24 horas

TFG: Taxa de Filtração Glomerular

TLR: Receptores *Toll-like*

TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral alfa

TGI: Trato gastrointestinal

UFC: Unidades formadoras de colônia

## RESUMO

**Introdução:** A perda progressiva da filtração glomerular e a inflamação crônica em doentes renais crônicos resultam no acúmulo de toxinas urêmicas geradas pelo metabolismo bacteriano no trato gastrointestinal (TGI). Assim, o objetivo desse estudo piloto foi avaliar o efeito da administração de simbiótico em marcadores de toxicidade urêmica e de perfil inflamatório de pacientes renais crônicos em tratamento conservador.

**Métodos:** Foi um estudo piloto, prospectivo, randomizado, placebo controlado, crossover, com duração de seis meses, em que se realizou a suplementação de uma formulação de simbióticos em pacientes renais crônicos nos estádios 3 e 4. Resultados foram comparados usando parâmetros bioquímicos, valores de toxinas urêmicas, como p-Cresilsulfato (pCS) e Indoxil Sulfato (IS) e citocinas inflamatórias.

**Resultados:** Dos 44 pacientes randomizados, 25 completaram o estudo (idade média de  $51 \pm 9,34$ , 64% mulheres, TFG média  $36 \pm 14,26$  mL/min/1,73m<sup>2</sup>, média de IMC  $28,5 \pm 5,75$  kg/m<sup>2</sup>). Após a análise de crossover verificou-se que não houve alterações significativas em nenhuma das dosagens plasmáticas com o tratamento, como IL-6 ( $p = 0,55$ ), pCS ( $p = 0,57$ ) and IS ( $p = 0,08$ ).

**Conclusão:** O tratamento com simbiótico durante três meses não foi capaz de alterar níveis plasmáticos de ureia, creatinina, toxinas urêmicas e citocinas em doentes renais crônicos em tratamento conservador nesta amostra.

**Palavras-chave:** Doença Renal Crônica, Simbióticos, Inflamação, Toxicidade urêmica.

## ABSTRACT

**Background & Aim:** Bacterial metabolism contributes to the generation of uremic toxins in patients with chronic kidney disease (CKD). Whether the use of symbiotics could reduce the intestinal production of uremic toxins is not clear. So, the aim of this pilot study was to evaluate the effect of symbiotic supplementation on uremic toxicity and inflammatory profile of CKD patients.

**Methods:** We performed a 6-month randomized, placebo controlled, crossover study on patients with CKD stages 3 and 4. The intervention was a symbiotic formulation composed of *Lactobacillus acidophilus* strains given orally three times a day for 3 months. Change in uremic toxins and serum inflammatory cytokines were the primary endpoint.

**Results:** Of the 44 patients randomized, 25 completed the study (mean age  $51 \pm 9.34$ , 64% female, mean eGFR  $36 \pm 14.26$  mL/min/1.73m<sup>2</sup>, mean BMI  $28.5 \pm 5.75$  kg/m<sup>2</sup>). At 3 months, there were no significant changes in any of the studied biomarkers including interleukin-6 ( $p = 0.55$ ), p-Cresylsulphate ( $p = 0.57$ ) and Indoxyl sulphate ( $p = 0.08$ ).

**Conclusion:** *Lactobacillus acidophilus* strains given as symbiotic were not able to reduce serum levels of uremic toxins and biomarkers of inflammation in CKD patients stage 3 and 4.

**Keywords:** Chronic Kidney Disease; Symbiotics; Inflammation; Uremic Toxicity.

## 1 - INTRODUÇÃO

### 1.1 DOENÇA RENAL CRÔNICA (DRC)

A Doença Renal Crônica (DRC) tem distribuição mundial, com taxa de crescimento anual de 7 a 8%. A prevalência de DRC nos estádios 3 a 5 é estimada em 7,2% em indivíduos com mais de 30 anos, traduzindo para a população global, de aproximadamente 6,8 bilhões de pessoas, isso representaria aproximadamente 490 milhões de pessoas com DRC nos estádios 3 a 5.

Essa doença é caracterizada pela perda progressiva da filtração glomerular, por meio da qual os rins perdem a sua capacidade de remover compostos potencialmente tóxicos da corrente sanguínea para a urina, resultando na sua acumulação no organismo. Conforme a doença progride, ocorre a redução da Taxa de Filtração Glomerular (TFG), e é a partir da TFG que ocorre a classificação dos estádios de prognóstico da DRC, essa classificação contempla seis categorias, conforme mostra a tabela 1 (Martínez-Castelao A, *et al.*, 2014).

**Tabela 1.** Classificação e descrição dos diferentes estádios da DRC

Estadio da DRC	TFG (ml/ min/1,73 m <sup>2</sup> )	Descrição
1	> 90	Função renal normal, mas achados anormais, urina ou anormalidades estruturais ou um traço genético indicando doença renal
2	60 – 89	Ligeira redução da função renal e outros achados (como no estadio 1). Indica doença renal
3a	45 – 59	Função renal moderadamente reduzida
3b	30 – 44	
4	15 – 29	Função renal severamente reduzida
5	< 15	Insuficiência renal muito grave ou em fase terminal

A síndrome urêmica é atribuída à progressiva retenção de uma gama de compostos que sob condições normais são excretados por rins saudáveis.

Esses compostos são denominados solutos de retenção urêmica, ou toxinas urêmicas, quando eles interagem negativamente com funções biológicas. O acúmulo de tais compostos tem um impacto negativo em muitas funções corporais, e resulta em uma gradual intoxicação endógena. Entre os efeitos tóxicos, o dano cardiovascular é o principal, pois é responsável pela alta morbidade e mortalidade, até mesmo em estádios iniciais da DRC (Vanholder *et al.*, 2008; Glorieux e Vanholder, 2011).

O sistema de classificação das toxinas que atualmente é mais aplicado é baseado nas características físico-químicas das moléculas que influenciam na remoção do soluto pela diálise. Os três maiores grupos são identificados como: pequenos compostos hidrossolúveis, moléculas médias e compostos ligados à proteínas (tabela 2) (Vanholder *et al.*, 2008).

**Tabela 2.** Atual classificação de solutos de retenção urêmica

Classificação	Características	Exemplos	Toxicidade
Pequenos compostos hidrossolúveis	Peso molecular < 500Da Facilmente removidos por qualquer estratégia dialítica	Ureia creatinina	Não necessariamente tóxico
Moléculas médias	Peso molecular > 500Da, removidos somente através de membranas com largos poros	$\beta$ 2-microglobulina Leptina	Grande variedade de impactos biológicos
Compostos ligados à proteína	Qualquer peso molecular, dificuldade de remoção com qualquer estratégia dialítica	Fenóis Indóis	Grande variedade de impactos biológicos

Adaptado de: VANHOLDER, R.; VAN LAECKE, S.; GLORIEUX, G. *Pediatr Nephrol*, v. 23, n. 8, p. 1211-21, Aug 2008.

A origem das toxinas urêmicas é múltipla, sendo a maioria originada do metabolismo celular endógeno, como as de origem da microflora intestinal (Wikoff *et al.*, 2009). Sendo que as mudanças induzidas pela DRC na composição e função da microbiota intestinal representam um estado disbiótico que tem conseqüências adversas como a geração dos componentes tóxicos e redução da produção de micronutrientes benéficos, podendo contribuir para a inflamação sistêmica, progressão da DRC e complicações cardiovasculares (Vaziri, 2016).

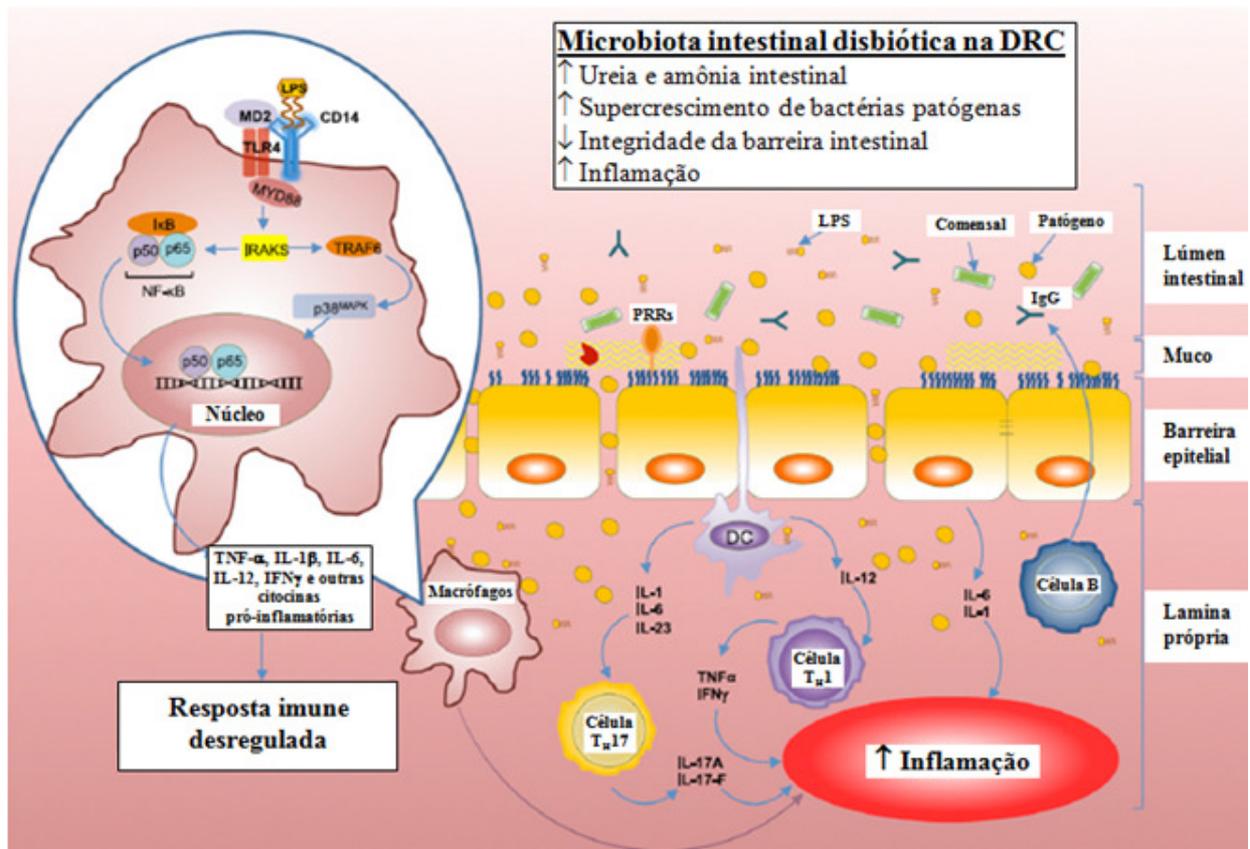
Sinais de inflamação crônica também são observados em pacientes portadores de doença renal, mesmo antes do tratamento dialítico, e há uma associação entre citocinas pró-inflamatórias e doença cardiovascular (DCV) (Pecoits-Filho *et al.*, 2002). A inflamação persistente é evidenciada por elevados níveis plasmáticos de proteína C-reativa (PCR), e várias citocinas pró-inflamatórias que agem como mediadores da indução de resposta inflamatória de fase aguda. A interleucina-6 (IL-6) é considerada a principal citocina que influencia mudanças nos níveis plasmáticos de PCR, e tanto IL-6 como PCR estão elevadas em pacientes com DRC, e predizem mortalidade de pacientes em diferentes fases da doença renal crônica (Pecoits-Filho *et al.*, 2002; Barreto *et al.*, 2010)

## 1.2 MICROFLORA INTESTINAL E FORMAÇÃO DE POTENCIAIS TOXINAS URÊMICAS

Além de servir como motor de processamento e entrada de nutrientes e para a eliminação de resíduos formados pela digestão, o intestino serve como uma barreira para impedir a entrada de micróbios e os seus produtos nocivos, bem como outros compostos nocivos para o ambiente interno (Vaziri, 2012).

A microflora intestinal humana é um ecossistema complexo, com contagens totais de  $10^{11}$ - $10^{12}$  unidades formadoras de colônia (UFC) por grama de fezes. Entre este grande número de organismos, encontra-se pelo menos 400 espécies de anaeróbios e muitos organismos facultativos, no qual várias espécies de Lactobacilos e Bifidobactérias. A microflora intestinal compreende uma sociedade altamente ativa de organismos, possuindo diversas enzimas que executam funções extremamente variadas, tanto benéficas como em alguns casos prejudiciais. A simbiose mantida entre essa população bacteriana desempenha um papel importante na manutenção não só a saúde intestinal, mas também a saúde geral do hospedeiro. Até 80% do sistema imune do organismo está localizado no trato gastrointestinal (TGI), o que indica uma enorme atividade biológica no intestino. O intestino profere oportunidade de: modular a resposta imune; prevenir ou tratar doenças que surgem neste órgão, e remover ou modificar as toxinas urêmicas em um regime terapêutico (Ranganathan *et al.*, 2010).

A DRC pode resultar em uma significativa alteração na microbiota intestinal (disbiose), e na estrutura e função da mucosa colônica, alterando a função de barreira intestinal, o que resulta na translocação de bactérias, endotoxinas e outras toxinas (Figura 1) (Pahl, M. and Vaziri, N., 2015). O comprometimento da função de barreira intestinal pode contribuir para a inflamação vigente, estresse oxidativo e toxicidade urêmica (Ritz, 2011). A uremia altera o meio bioquímico do TGI por vários mecanismos. Nesse contexto, a redução da TFG e o consequente aumento de ureia nos compartimentos de fluidos intra e extracelular, observado em pacientes com doença renal, resultam no seu grande afluxo para o TGI. Mudanças na composição do microbioma intestinal na DRC podem perturbar a relação simbiótica normal e levar à formação e absorção de pró-oxidantes, pró-inflamatórios e outros subprodutos nocivos que podem contribuir para a toxicidade urêmica (Vaziri, 2012).



**Figura 1.** Efeito da DRC na microbiota (disbiose), estrutura e função da mucosa

Adaptado de: Ramezani e Raj. J Am Soc Nephrol 25: 657–670, 2014.

Pacientes com DRC apresentam uma concentração de ureia mais alta e, conseqüentemente, aumento de amônia. Isso promove um aumento no pH que leva ao crescimento de bactérias aeróbias no TGI e a subseqüente produção de toxinas urêmicas. Por outro lado, bifidobactérias fermentam carboidratos e produzem ácidos acético e láctico, acidificando o intestino. Dessa forma, essas bactérias previnem o crescimento de microorganismos aeróbicos e normalizam a alteração do microbioma intestinal em pacientes com DRC (Miranda Alatraste *et al.*, 2014). Sendo assim, modificações dietéticas e intervenções medicamentosas podem significativamente impactar o meio bioquímico do TGI de pacientes com DRC avançada, o que exerce um papel decisivo no formato da flora microbiana (Vaziri, 2012).

Toxinas urêmicas produzidas no TGI incluem produtos de glicação avançada (AGES) que compreende a glicação de proteínas, peptídeos e aminoácidos devido ao excesso de glicose (Hegab *et al.*, 2012). Toxinas urêmicas também pode incluir fenóis, como por exemplo p-cresilsulfato (pCS), que se formam pela fermentação no TGI dos aminoácidos fenilalanina e tirosina (Bone *et al.*, 1976; Macfarlane e Macfarlane, 2012). Da mesma forma, ocorre a formação dos compostos fenólicos, indóis, como exemplo o indoxil sulfato (IS), que pode ser gerado pela microbiota do TGI (Macfarlane e Macfarlane, 2012) (Figura 2), e tanto o pCS como o IS são classificados como compostos ligados à proteínas, caracterizados como moléculas de difícil remoção por qualquer estratégia dialítica (Vanholder *et al.*, 2008). O impacto biológico dessas moléculas tem sido relatado por induzir respostas pró-inflamatórias, estimulação de leucócitos e disfunção endotelial (Charney *et al.*, 1993; Dou *et al.*, 2004; Schepers *et al.*, 2007). Assim o excesso de produção de moléculas pró-inflamatórias no TGI pode desempenhar um papel importante na manutenção de um estado inflamatório não regulado neste local (Macfarlane e Macfarlane, 2012). Se a disbiose do TGI inflamado segue (Vitetta *et al.*, 2012), a disseminação sistêmica dessas moléculas aumenta a probabilidade de sobrecarga de eliminação sanguínea das toxinas urêmicas (Hida *et al.*, 1996). Esta ligação entre a inflamação do TGI, disbiose, e toxinas urêmicas circulantes sugere íntima relação da disbiose do TGI *versus* rim, particularmente para o desenvolvimento de doença renal crônica (Vitetta e Gobe, 2013).

A fermentação protéica, portanto, gera um complexo conjunto de diferentes metabólitos, que além de sua origem comum, alguns destes compostos compartilham outras características como a ligação à proteínas (Meijers *et al.*, 2008).

### **1.2.1 Fenóis**

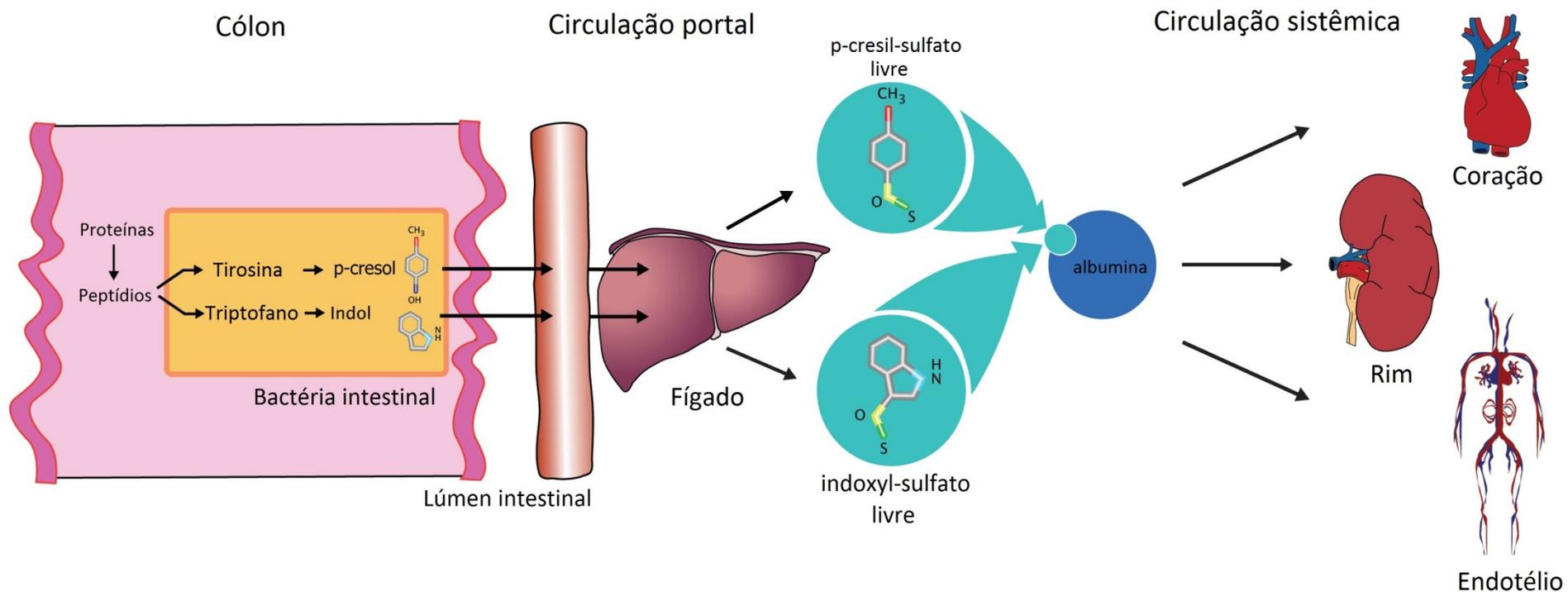
Compostos fenólicos, tais como ácido fenilacético, fenol, e *p*-cresol são gerados pela fermentação colônica dos aminoácidos tirosina e fenilalanina por uma ampla gama de bactérias intestinais anaeróbias facultativas (Evenepoel *et al.*, 2009). O *p*-cresol é o representante mais estudado dos compostos fenólicos, e pacientes com DRC apresentam níveis séricos elevados desse metabólito em cerca de dez vezes, sendo que esse aumento ocorre progressivamente durante o desenvolvimento da DRC, e está envolvido no processo de disfunção endotelial, processo este que tem um importante papel no desenvolvimento da doença cardiovascular, a principal causa de mortalidade em pacientes com DRC (Vanholder *et al.*, 1999; Dou *et al.*, 2004).

Apesar de ter um baixo peso molecular, o *p*-cresol faz parte do grupo de solutos urêmicos ligados à proteína, além de ser uma molécula parcialmente lipofílica. Em humanos, ele não é detectado no plasma normal e urêmico nessa forma, pois, durante a sua passagem pela mucosa intestinal uma sulfotransferase citosólica metaboliza *p*-cresol em *p*-cresilsulfato, ou seja, existe predominantemente como o conjugado *p*-cresilsulfato (*p*CS) (Bammens *et al.*, 2006; Glorieux e Vanholder, 2011).

### **1.2.2 Indóis**

O metabolismo bacteriano de triptofano no cólon resulta na produção de uma vasta gama de compostos indólicos. As bactérias intestinais, tais como *Escherichia coli* têm triptofanase que converte o triptofano em indol, que é quantitativamente o principal produto final. Indóis são absorvidos e metabolizados em indoxil sulfato no fígado (Evenepoel *et al.*, 2009). Indoxil sulfato (IS) é uma das toxinas do grupo dos compostos ligados à proteína, esse é o composto indol mais abundante no corpo de pacientes urêmicos, e tem sido associado ao dano endotelial, à inibição de regeneração e reparação endotelial, e à produção de radicais livres, induzindo ao estresse oxidativo.

Além do mais, indoxil sulfato é um potente agonista endógeno para o receptor hidrocarboneto aromático, um fator de transcrição envolvido na regulação de múltiplas vias celulares. Sua ativação prolongada por IS pode contribuir para a toxicidade celular observada em pacientes em diálise. Tem sido relacionado também à fibrose renal e à progressão da insuficiência renal (Glorieux e Vanholder, 2011). Em pacientes em hemodiálise, IS está associado com marcadores relacionados à aterosclerose (Raff *et al.*, 2008). Um estudo de coorte mostrou que IS está associado à doença cardiovascular e à mortalidade em DRC (Barreto *et al.*, 2009).



**Figura 2.** Formação de p-cresilsulfato e indoxil sulfato a partir da fermentação de proteínas no cólon  
 Adaptado de: Meijers e Evenepoel. *Nephrol Dial Transplant* 26: 759–761, 2011.

### 1.3 USO DE PROBIÓTICOS E SIMBIÓTICOS NA DRC

Os efeitos benéficos da microbiota intestinal são atribuídos aos probióticos que são definidos como “microorganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (FAO; WHO, 2001). Existem três mecanismos gerais pelos quais os probióticos parecem exercer seus efeitos benéficos: efeitos antimicrobianos, pelo aumento de moléculas antimicrobianas, pela inibição competitiva, limitando o crescimento de patógenos; aumento da integridade da barreira mucosa, estimulando a síntese de mucina para manter a integridade do epitélio intestinal, e melhorando a organização das “*tight junctions*”; e, efeito imunomodulador, reduzindo a secreção de citocinas pró-inflamatórias e aumentando as anti-inflamatórias (Patel e Dupont, 2015).

Um exemplo de probiótico são os Lactobacilos, espécies Gram-positivas, não patogênicas e membros desejáveis do TGI. Os efeitos de promoção da saúde dos lactobacilos têm sido largamente explorados e inclui a proteção contra infecção intestinal, aumento da biodisponibilidade de nutrientes, reduzindo os sintomas da intolerância à lactose e diminuindo a prevalência de alergia em pessoas suscetíveis, redução dos níveis de colesterol sérico e melhorias não específicas do sistema imune (Suvarna, 2005; Kim *et al.*, 2008).

Vários lactobacilos que atuam como bactérias probióticas estão sendo explorados como agentes terapêuticos biológicos inovadores (Sullivan e Nord, 2005; Reid *et al.*, 2006). Uma vez que nem todos os lactobacilos possuem a capacidade de conferir benefícios à saúde do hospedeiro, torna-se necessário selecionar e caracterizar numerosas estirpes, a fim de obter probióticos ideais. A colonização do TGI é desejável para qualquer probiótico, que depende de vários fatores, incluindo a capacidade da bactéria para tolerar o pH ácido do estômago e biliar e com a adesão de bactérias às células intestinais e muco (Van Belkum e Nieuwenhuis, 2007). A capacidade para tolerar o pH ácido e bile, atividade antimicrobiana e uma boa capacidade de adesão são propriedades principais desejáveis em potenciais probióticos (Dunne *et al.*, 2001). Vários efeitos probióticos são mediados através da regulação imune, principalmente através do estabelecimento e manutenção de um equilíbrio entre citocinas pró e anti-inflamatórias (Gaudana *et al.*, 2010).

Probióticos não apenas equilibram a microbiota intestinal a favor das bactérias que conferem benefício à saúde, mas também oferecem benefícios na prevenção ou melhora de uma série de desordens. A regulação da função do sistema imune está entre os mais documentados benefícios das bactérias probióticas. Resultados de muitos estudos conduzidos nesse sentido têm revelado que probióticos não estimulam o sistema imune apenas localmente, mas também afetam as respostas imunes inata e adaptativa sistematicamente (Delcenserie *et al.*, 2008). Assim, eles afetam a produção de citocinas inflamatórias de uma maneira específica. Sugere-se, portanto, que os probióticos atuem no sistema imune por seus padrões moleculares associados a microrganismos (MAMPs) interagindo com os receptores de reconhecimento padrão (PPRs), tais como receptores *toll-like* (TLR) nas células dendríticas (DC) quer no lúmen intestinal ou na região da cúpula do tecido linfóide associado ao intestino (GALT) (Delcenserie *et al.*, 2008).

O uso de probióticos como suplementação mostrou uma redução na incidência das manifestações sistêmicas características da artrite reumatóide, uma doença inflamatória auto-imune, de etiologia desconhecida. Além do mais, citocinas inflamatórias (IL-1b, IL-2, IL-6, IL-12, IL-17, IFN, TNF- $\alpha$ ) reduziram com o tratamento (Alipour *et al.*, 2014). Matsumoto e colaboradores observaram que o uso de *Lactobacillus casei* Shirota (LcS) induziu uma melhora na doença inflamatória intestinal crônica, associado à redução de citocinas pró inflamatórias, tais como IL-6 e em células mononucleares da lâmina própria isoladas de rato com colite crônica. Dessa forma, os autores concluem que o uso do probiótico LcS pode ser um potencial tratamento para a doença inflamatória intestinal (Matsumoto *et al.*, 2005).

Um dos requerimentos para o uso de probióticos como adjuvantes para remover ureia ou toxinas urêmicas é a capacidade dos microorganismos em usar metabólitos como substratos. Assim, probióticos ajudam o microbioma intestinal a diminuir a produção de toxinas urêmicas (Miranda Alatraste *et al.*, 2014). Estudos demonstram que a bacterioterapia (suplementação dietética com determinadas cepas probióticas) pode adiar a progressão da azotemia, prolongar o tempo de vida de ratos urêmicos e atenuar os níveis de ureia sanguínea em animais urêmicos e em pacientes em estádios 3 e 4 da DRC, sem causar reações adversas, via extração intestinal de resíduos tóxicos

(Ranganathan *et al.*, 2005; Ranganathan *et al.*, 2006; Ranganathan *et al.*, 2009; Ranganathan *et al.*, 2010).

Raganathan e colaboradores, em um estudo prospectivo, cego, controlado com placebo, demonstraram que alimentando ratos nefrectomizados (como modelo de insuficiência renal) durante 16 semanas com cepas de *Bacillus pasteurii* (dose de 10<sup>9</sup>UFC/dia) e *Lactobacillus sporogenes* (dose diária de 10<sup>8</sup>UFC), níveis sanguíneos de ureia foram reduzidos, diminuindo a progressão da azotemia, o que pode ser correlacionado ao aumento do tempo de vida dos ratos urêmicos (Ranganathan *et al.*, 2005).

Outros estudos em humanos, utilizando cepas e doses diferentes de probióticos, alcançaram resultados positivos como a redução de uréia, dimetilamina (DMA) e nitrodimetilamina (NDMA), indoxil sulfato (IS), endotoxinas, citocinas inflamatórias como IL-6 e IL-5, TNF- $\alpha$ , e até o aumento de IL-10 (citocina anti-inflamatória) (Tabela 1).

Um prebiótico, por sua vez, é uma fibra dietética, não digerível, fermentativa, que permite mudanças específicas e benéficas na composição e/ou na atividade da microflora gastrointestinal, através do estímulo do crescimento de certas bactérias intestinais. Apenas oligossacarídeos bifidogênicos (principalmente inulina, e seus produtos hidrolisados como oligofrutose e galacto-oligossacarídeos) preenchem todos os critérios para classificarem-se como prebióticos. Alguns dos efeitos de prebióticos na saúde são prevenção de diarreia ou obstipação, modulação do metabolismo da flora intestinal, prevenção de câncer, efeitos positivos no metabolismo lipídico, estímulo da absorção de minerais e propriedades imunomodulatórias (De Vrese e Schrezenmeir, 2008).

A produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) ocorre no cólon pela fermentação de fibras dietéticas, tais como prebióticos. Esses AGCC diminuem o pH local, estimulando a produção de mucina pelos colonócitos, e induz a produção de citocinas imunomodulatórias (Krumbeck *et al.*, 2016). Entre os AGCC, o butirato parece ser o mais potente na indução de efeitos imunomodulatórios, ele influencia na atividade de histona desacetilases que é responsável pela secreção das citocinas IL-12 e IL-6, e promove a atividade regulatória das células dendríticas, resultando na indução das células T reguladoras e células secretoras de IL-10 (Frei *et al.*, 2015).

**Tabela 3.** Ensaios com probióticos em pacientes renais

Estudo	População	Nº de pacientes	Tipo de probiótico	Dose (UFC)	Duração	Resultado
Ranganathan, N., et. al., 2009	Humanos DRC estágios 3 e 4	13	L. acidophilus S. termophilus B. longum	90 bilhões (9 x 10 <sup>10</sup> )	3 meses	↓ uréia e ác. úrico
Ranganathan, N., et. al., 2010	Humanos DRC estágios 3 e 4	46	L. acidophilus S. termophilus B. longum	90 bilhões (9 x 10 <sup>10</sup> )	3 meses	↓ uréia
Dunn S., et. al., 1998	Humanos tto dialítico	19	L. acidophilus	2 bilhões (2 x 10 <sup>9</sup> )	67 dias	↓ DMA e NDMA
Wang et al., 2015	Humanos tto dialítico (DP)	39	B. bifidum B. catenulatum B. longum L. plantarum	4 bilhões (4x10 <sup>9</sup> )	6 meses	↓ endotoxinas, TNF, IL-6 e IL-5 ↑ IL-10
Takayama et. al., 2003	Humanos tto dialítico (HD)	11	B. longum	3 bilhões (3 x 10 <sup>9</sup> )	5 semanas	↓ indoxil sulfato
Taki et. al., 2005	Humanos tto dialítico (HD)	27	B. longum	0 – 4 sem: 3 bilhões 4 – 9 sem: 6 bilhões 8 – 12 sem: 12 bilhões	12 semanas	↓ homocisteína e indoxil sulfato ↑ folato
Miranda-Alatriste et. al., 2014	Humanos DRC estágios 3 e 4	30	Lactobacillus casei shirota	16 x 10 <sup>9</sup>	2 meses	↓ 10% da uréia

DP: Diálise Peritoneal; HD: Hemodiálise; DRC: Doença Renal Crônica; L. acidophilus: Lactobacillus acidophilus; S. termophilus: Streptococcus thermophilus; B. longum: Bifidobacterium longum; B. bifidum: Bifidobacterium bifidum; B. catenulatum: Bifidobacterium catenulatum; L. plantarum: Lactobacillus plantarum; UFC: Unidades Formadoras de Colônias; DMA: dimetilamina; NDMA: nitrodimetilamina.

Um estudo randomizado, placebo controlado, cruzado, com 20 voluntários saudáveis, mostrou que a oferta de inulina enriquecida com oligofrutose (IN-OF) como prebiótico, durante quatro semanas, reduziu p-cresol e nitrogênio urinário.

Quando administrados em uma combinação sinérgica, prebióticos podem aumentar a sobrevivência de cepas probióticas, bem como estimular a atividade das bactérias endógenas do hospedeiro. A combinação de prebióticos e probióticos denomina-se simbióticos (Anderson *et al.*, 2004).

Um ensaio clínico controlado randomizado triplo-cego, conduzido com 70 participantes com idade entre 6 e 18 anos, investigou o efeito da suplementação com simbiótico sobre fatores inflamatórios em crianças e adolescentes com sobrepeso e obesidade (Kelishadi *et al.*, 2014). O grupo que recebeu a cápsula de simbiótico, cada uma contendo  $2 \times 10^8$  UFC com uma combinação de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium longum* e *Lactobacillus bulgaricus* adicionado com o prebiótico fruto-oligossacarídeo, apresentou uma redução significativa nos valores médios de TNF- $\alpha$  e IL-6, sugerindo a influência positiva da suplementação simbiótica sobre fatores inflamatórios.

Outros ensaios com humanos saudáveis ou pacientes renais, mostraram a redução de p-cresol e pCS com o uso de simbiótico com combinações diferentes de probióticos e prebióticos, em doses e duração do tratamento também variados (Tabela 2).

Rossi *et al.* (2012), em uma metanálise com 19 estudos que avaliaram o uso de pre, pro e simbióticos na redução de pCS e IS, concluíram que esses produtos possuem um grande potencial na redução de pCS e IS na população com DRC, que podem ser traduzidos em benefícios para o resultado clínico, tais como redução dos marcadores de doença cardiovascular e progressão da DRC (Rossi, M. *et al.*, 2012).

Na DRC um agravante importante é o acometimento do microbioma intestinal que se apresenta debilitado, principalmente em pacientes em fase avançada da doença. Quase dois terços dos indivíduos com uremia têm anormalidades na mucosa gastrointestinal e um desequilíbrio no ecossistema intestinal. A maioria dessas mudanças acontece no íleo e colón, onde o

microbioma tem um papel importante. O aumento de bactérias aeróbias, tais como *Escherichia coli*, resulta num desequilíbrio do microbioma intestinal. Essas bactérias produzem e liberam substâncias tóxicas, que ao se acumularem no organismo do paciente passam a ter perfil de toxinas, e ainda, como consequência desta alteração no microbioma intestinal, ocorre a redução das bactérias anaeróbias, tais como bifidobactérias e lactobacilos (Miranda Alatraste *et al.*, 2014).

Já que a flora intestinal é a maior fonte geradora de toxinas urêmicas, a administração de pré e probióticos poderia contribuir para o decréscimo de níveis plasmáticos de p-cresilsulfato (Evenepoel *et al.*, 2009). O novo conceito de diálise entérica é uma estratégia alternativa para extração de solutos na insuficiência renal, baseado no fato de que a parede intestinal funciona como uma membrana semipermeável. Dirigido pelo gradiente de concentração, solutos de elevada concentração na circulação sanguínea, difundem-se do plasma para o lúmen intestinal, e uma grande porção de solutos urêmicos são distribuídos por todo o intestino, onde os probióticos agem hidrolisando a ureia luminal e reciclando a amônia pela síntese de novas células microbianas (Ranganathan *et al.*, 2005; Ranganathan *et al.*, 2006; Bergen e Wu, 2009). Sendo assim, a administração oral de uma formulação de cepas probióticas pode estender a reno-proteção via extração intestinal de resíduos tóxicos em pacientes com DRC nos estádios 3 e 4 (Ranganathan *et al.*, 2010).

Por fim, vários estudos evidenciam os efeitos benéficos da utilização de pre, pro e simbióticos na DRC, auxiliando tanto na redução das toxinas urêmicas, como na modulação de citocinas inflamatórias, ambos responsáveis pelo aumento das complicações cardiovasculares e, conseqüentemente, da mortalidade dessa população.

**Tabela 4.** Ensaio com simbióticos em humanos

<b>Estudo</b>	<b>População</b>	<b>Nº de pacientes</b>	<b>Tipo de probiótico</b>	<b>Dose (UFC)</b>	<b>Duração</b>	<b>Resultado</b>
Nakabayashi et. al., 2011	Humanos tto dialítico (HD)	9	L. casei Shirota e B. breve + GOS	3 x 10 <sup>8</sup> (pro) + 5,0g (pré)	2 semanas	↓ p-cresol
De Peter, v. et. al., 2007	Humanos saudáveis	20	L. casei Shirota e B. breve Inulina com oligofrutose	13 x 10 <sup>9</sup> 2 x 10 <sup>9</sup> 20g	4 semanas	↓ p-cresol e nitrogênio urinário
Rossi et al., 2016	Humanos DRC estágios 3 e 4	31	9 diferentes cepas de Lactobacillus, Bifidobacterias e Streptococcus GOS e FOS	90 bilhões (9 x 10 <sup>10</sup> ) + 15g	6 semanas	↓ p-cresilsulfato

HD: hemodiálise; DRC: Doença Renal Crônica; L. casei Shirota: Lactobacillus casei Shirota; B. breve: Bifidobacterium breve; GOS: Galactooligosacarídeos; FOS: Frutooligosacarídeos, UFC: Unidades Formadoras de Colônias.

## 2 - JUSTIFICATIVA

Considerando que, mundialmente, o número de pacientes com DRC está aumentando, e que tal doença vem sendo reconhecida como um dos principais problemas de saúde pública global, ameaçando chegar a proporções epidêmicas na próxima década, buscam-se alternativas para amenizar esse processo (Lysaght, 2002; Alebiosu e Ayodele, 2005; Meguid El Nahas e Bello, 2005; Zhang e Rothenbacher, 2008; Ranganathan *et al.*, 2010). Assim a redução das toxinas urêmicas e citocinas inflamatórias, através das intervenções dietéticas, como por exemplo o uso de um simbiótico, manipulando a composição bacteriana da microbiota, representa uma estratégia terapêutica promissora na redução da disbiose e, conseqüentemente, na melhora da toxicidade urêmica e perfil inflamatório.

### **3 – OBJETIVOS**

#### **3.1 – OBJETIVO PRIMÁRIO**

Avaliar o efeito da administração de simbiótico sobre marcadores de toxicidade urêmica e de perfil inflamatório de pacientes renais crônicos em tratamento conservador.

#### **3.2 – OBJETIVOS SECUNDÁRIOS**

- Avaliar os parâmetros clínicos de controle da doença renal (dosagem de creatinina e ureia) antes e após a oferta de simbiótico.

- Avaliar o perfil de citocinas (dosagem de IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF) antes e após a oferta do simbiótico.

- Dosar as toxinas urêmicas *p*-cresilsulfato e indoxil sulfato no soro dos pacientes antes e após a oferta do simbiótico.

## 4 – DESENVOLVIMENTO

### 4.1 PARTICIPANTES

Foram abordados e convidados a participar do estudo 51 pacientes, homens e mulheres, com diagnóstico de Doença Renal Crônica, em estágio 3 e 4, com taxa de filtração glomerular entre 59 a 15mL/min/1.73 m<sup>2</sup>, atendidos no Ambulatório de Nefrologia situados no Hospital Nossa Senhora da Luz (HNSL), com idade entre 18 e 60 anos, e que aceitaram assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexo 02). Com diagnóstico de DRC há mais de 2 anos, estáveis e com registro de acompanhamento nutricional por no mínimo 03 meses.

Os pacientes com as seguintes características não foram incluídos no estudo: diagnóstico de câncer, doença inflamatória ativa, doença periodontal, que tivessem sido submetidos a qualquer procedimento cirúrgico ou que apresentassem ferida por qualquer motivo, quadro de infecção aguda, transfusão de sangue realizada com 1 mês de antecedência, infecções crônicas (hepatite B, hepatite C, vírus da imunodeficiência humana, osteomielite), doença imunológica ativa (lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatóide), terapia imunossupressora ou com antiinflamatório e antibiótico no prazo de 3 meses antes da data de inclusão no estudo, histórico de abuso de álcool ou drogas ilícitas, pacientes que apresentassem eventos cardiovasculares tais como infarto do miocárdio, angina instável, revascularização do miocárdio, acidente vascular cerebral ou ataque isquêmico transitório, dentro de 3 meses antes da data da inclusão no estudo, insuficiência cardíaca congestiva moderada a grave, PTH acima de 1000ng/L, perspectivas de transplante nos últimos 6 meses e participação em outro estudo com medicamento sob investigação inferior a 4 semanas antes da data de inclusão no estudo.

Dos 51 pacientes abordados, 6 não aceitaram participar, e um foi excluído devido a dificuldade na coleta de sangue. Os 44 restantes foram incluídos no mesmo após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 02). Inicialmente, o estudo teve um número amostral de 44 indivíduos, 22 para o grupo placebo e 22 para o grupo controle nos três

primeiros meses, e para os três meses restantes aqueles que fizeram parte do grupo de intervenção passaram para o grupo placebo e vice-versa. Dessa forma, nenhum paciente deixou de receber a cápsula com simbiótico.

Ao final da intervenção, 19 pacientes foram excluídos, sendo que nove não retornaram às consultas, seis deixaram de tomar as cápsulas, três progrediram para o estágio V da DRC, sendo encaminhados para Terapia Renal Substitutiva ou para ambulatório de transplante renal, e um paciente foi a óbito. Dessa forma, foram avaliados os dados de 25 pacientes que finalizaram o estudo.

#### 4.2 DELINEAMENTO

Este foi um estudo piloto, experimental, randomizado, placebo controlado, cruzado, de caráter quantitativo, no qual os pacientes foram separados em dois grupos: Grupo A que iniciou com a intervenção, e recebeu 03 cápsulas de simbiótico para administração diária por 90 dias, e o Grupo B que iniciou com placebo e recebeu 03 cápsulas contendo amido para administração diária por 90 dias. Após o prazo de 90 dias o Grupo A passou a receber as cápsulas com placebo e o Grupo B iniciou a intervenção com o simbiótico.

As cápsulas de simbiótico eram compostas por 100mg de cepas de *Lactobacillus acidophilus* ( $3,7 \times 10^9$  UFC) e 150mg de fruto-oligossacarídeos (FOS) por cápsula (Fornecido pela Farmácia Ativa de Manipulação). Foram ofertadas 3 cápsulas ao dia, e os participantes foram orientados a consumir uma cápsula pela manhã, antes do desjejum, uma antes do almoço e uma antes do jantar (totalizando a dose diária de  $11,1 \times 10^9$  UFC de *L. acidophilus* e 450mg de FOS). Durante o período de intervenção, foi avaliada a tolerabilidade do paciente, eles foram questionados quanto à distensão abdominal, flatulência, frequência de evacuação e consistência das fezes.

O período total da intervenção foi de 6 meses, sendo que o sangue do indivíduo foi coletado nos dias zero (T0) (anterior ao início da suplementação com simbiótico para o Grupo A, e com placebo para o Grupo B, após os três primeiros meses (T3), quando o Grupo A passou do tratamento para o placebo e o Grupo B iniciou o tratamento com simbiótico, e ao final dos seis meses (T6), quando ambos os grupos finalizaram o período de intervenção (Figura 1). Desses pacientes selecionados, foram coletados dados do prontuário



#### **4.2.2 Coleta de sangue periférico para obtenção do soro**

As coletas foram feitas na parte de tarde (agendadas para as quartas-feiras – ambulatório de rotina no HNSL), não necessariamente em jejum. Foram coletados a cada etapa do estudo 15 ml de sangue em tubo contendo citrato de sódio, e imediatamente após as coletas, os tubos foram encaminhados para o Laboratório Experimental Multiusuário 3 da Pós-Graduação em Ciências da Saúde da PUCPR, para obtenção do soro e o mesmo foi armazenado em freezer -80°C até o momento de uso.

#### **4.2.3 Dosagens de rotina no HNSL**

Os pacientes que aceitaram participar do estudo tiveram os exames de rotina avaliados na primeira consulta e em todos os períodos de retorno determinados (T3 e T6). Os resultados importantes para este estudo foram uréia, creatinina e albumina, dosados na Beckman Coulter equipamento Au680. Os valores de uréia foram obtidos por método cinético enzimático com uréase, creatinina por método enzimático com creatininase e albumina por método colorimétrico com verde de bromocresol.

#### **4.2.4 Dosagem de citocinas**

O nível sérico de IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF foi determinado pela técnica de ELISA, com a utilização kit comercial da Life Technologies (Human Cytokine Magnetic 10-Plex Panel) de acordo com as instruções do fabricante. A leitura foi feita em leitora de placas (Plataforma Luminex) e os resultados comparados às curvas padrões obtidas com concentrações conhecidas dos mediadores recombinantes.

#### **4.2.5 Dosagem das toxinas urêmicas p-cresilsulfato e indoxil sulfato**

Foi realizada através de HPLC em parceria com o Laboratório de Estresse Oxidativo liderado pela Prof<sup>a</sup>. Lia Sumie Nakao do Departamento de Patologia Básica da UFPR.

### *Preparação da amostra*

pCS e IS foram preparadas a partir de padrões diluídos separadamente em água ultrapura (Milli-Q) e injetadas em HPLC para identificação. Os padrões foram pipetados de acordo com as concentrações definidas no soro e o volume final de 100µL foi completado até 360µL com água ultrapura (Milli-Q). Após a diluição, as amostras foram aquecidas por 30 min até 95°C para desnaturação de proteínas e resfriado no gelo por 10 min. Elas foram centrifugadas em 14000xg, 4°C por 20 min e o sobrenadante foi transferido para tubos com filtro 30kDa (Amicon Ultra™ 0.5mL). Os tubos foram novamente centrifugados em 8400xg, 4°C por 30 min e o material filtrado transferido para um novo tubo, 10 µL foram injetados no HPLC para análise.

### *Análise por HPLC*

As toxinas foram separadas por uma coluna C8 (Phenomenex, Luna 5µm, 100A, 150x4.6mm) usando um gradiente de concentração eluído com 50mM de formato de amônio (Sigma-Aldrich) pH 3.0 e metanol (Sigma-Aldrich) variando entre 35% e 65% em 0.7 ml/min de fluxo. As toxinas foram detectadas por fluorescência, e durante a execução os comprimentos de onda foram comutadas da seguinte forma: IS  $\lambda_{exc}$  comprimento de onda = 280nm e 383nm  $\lambda_{emi}$  = 6.5 min (adaptado de Calaf *et al.*, 2011) e, pCS comprimento de onda  $\lambda_{exc}$  = 265nm e 290nm  $\lambda_{emi}$  = 6.51 a 10.0 min (Meert *et al.*, 2012).

#### **4.2.6 Análise estatística**

Variáveis contínuas foram expressas como média e desvio padrão, enquanto variáveis categóricas (ex.: gênero, presença de diabetes, estadios da DRC), foram expressas como frequências ou porcentagens. O teste t e por ANOVA para dados pareados, ou teste de Wilcoxon para dados não pareados foram usados para comparar as características clínicas e demográficas. Correlações foram realizadas usando teste de Pearson para dados paramétricos e Spearman's rho para dados não paramétricos. Essas análises foram realizadas usando o programa SPSS Statistics 20.0, e o nível de significância foi determinado pelo  $p < 0.05$ .

Mudanças do tempo T0 para T3 foram expressas como médias e desvio padrão. A análise de crossover foi realizada usando um comando específico

Stata, que permite a análise de experimentos cruzados e fornece valores de carryover, seqüência (valor que especifica a variável que contém a seqüência pela qual o tratamento foi administrado), período (especifica a variável que contém a informação do período) e os efeitos da intervenção (pkcross). Significância estatística foi definido por  $p < 0,05$ . Todas as análises foram realizadas usando STATA 13.0.

## 5 - RESULTADOS

### 5.1 – Artigo

#### **Pilot Study of Symbiotic Supplementation on Uremic Toxicity and Inflammatory Profile in Patients with Chronic Kidney Disease stages 3 and**

**4**

Roth-Stefanski, CT<sup>a</sup>; Dolenga, C<sup>b</sup>; Nakao, LS<sup>b</sup>; Pecoits-Filho, R<sup>a</sup>; de Moraes, TP<sup>a</sup>; Moreno-Amaral, AN<sup>a</sup>

<sup>a</sup> PPGCS / PUCPR

<sup>b</sup> Basic Pathology Department / UFPR

\*Corresponding author:

Andréa N. Moreno-Amaral

Pontifícia Universidade Católica do Paraná, PUCPR

Rua Imaculada Conceição, 1500, Curitiba, Paraná

CEP: 80215-901

Phone/Fax: (55)(41) 3271 2285

E-mail: [andrea.moreno@pucpr.br](mailto:andrea.moreno@pucpr.br)

## **ABSTRACT**

**Background & Aim:** Bacterial metabolism contributes to the generation of uremic toxins in patients with chronic kidney disease (CKD). Whether the use of symbiotics could reduce the intestinal production of uremic toxins is not clear. So, the aim of this pilot study was to evaluate the effect of symbiotic supplementation on uremic toxicity and inflammatory profile of CKD patients.

**Methods:** We performed a 6-month randomized, placebo controlled, crossover study on patients with CKD stages 3 and 4. The intervention was a symbiotic formulation composed of *Lactobacillus acidophilus* strains given orally three times a day for 3 months. Change in uremic toxins and serum inflammatory cytokines were the primary endpoint.

**Results:** Of the 44 patients randomized, 25 completed the study (mean age  $51 \pm 9.34$ , 64% female, mean eGFR  $36 \pm 14.26$  mL/min/1.73m<sup>2</sup>, mean BMI  $28.5 \pm 5.75$  kg/m<sup>2</sup>). At 3 months, there were no significant changes in any of the studied biomarkers including interleukin-6 ( $p = 0.55$ ), p-Cresylsulphate ( $p = 0.57$ ) and Indoxyl sulphate ( $p = 0.08$ ).

**Conclusion:** *Lactobacillus acidophilus* strains given as symbiotic were not able to reduce serum levels of uremic toxins and biomarkers of inflammation in CKD patients stage 3 and 4.

**Keywords:** Chronic Kidney Disease; Symbiotics; Inflammation; Uremic Toxicity.

## Introduction

Chronic kidney patients suffer from a progressive loss of glomerular filtration rate, resulting in the accumulation of uremic toxins in the body, such as p-Cresylsulfate (pCS) and Indoxyl Sulfate (IS), produced by bacterial metabolism of amino acids from the gastrointestinal tract (GIT) (Macfarlane and Macfarlane, 2012). The beneficial effect on the intestinal microbiota by probiotics, prebiotics, or a combination of both (termed symbiotics), has been shown previously. The combination of three strains, namely *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium longum* and *Streptococcus thermophilus*, significantly decreased blood levels of urea, endotoxin and some cytokines (IL-6, IL-5 and TNF- $\alpha$ ) in patients with CKD stages 3 and 4 (Ranganathan *et al.*, 2009). In addition, symbiotics also increased the levels of IL-10 and preserved residual renal function in patients on peritoneal dialysis (Wang *et al.*, 2015). It is not clear if different strains have different effects on the intestinal metabolism and local generation of uremic toxins.

Therefore, the major aim of this study was to evaluate whether a symbiotic composed only of strains of *Lactobacillus acidophilus* was able to reduce blood levels of classical uremic markers (urea and creatinine); uremic toxins (pCS and IS) and inflammatory mediators in CKD patients.

## Methods

### *PATIENTS*

Pre-dialysis patients on conservative treatment were recruited between September/2014 to June/2015 in a University Hospital (Curitiba, Brazil).

Inclusion criteria: (1) adults aged 18 to 60 years, (2) a glomerular filtration rate estimated according to the CKD-EPI formula between 59 to 15 mL/min/1.73 m<sup>2</sup>. Exclusion criteria: (1) diagnosis of cancer, active inflammatory disease, periodontal disease, acute infection, chronic infections, active immune disease, (2) blood transfusion with 1 month in advance, (3) immunosuppressive therapy or anti-inflammatory and antibiotic within 3 months before inclusion in the study, (4) history of alcohol abuse or illicit drugs, (5) cardiovascular events within three months prior to study entry and, (6) refusal to sign the informed consent form. The sample size was determined by previous studies on the same subject. Ethics committee of PUCPR approved this pilot study under registration number 746.114.

### *STUDY OUTLINE*

Pilot experimental study, placebo controlled, crossover, quantitative, in which the patients were randomized at the study center using the Random Allocation Software® version 2.0. Patients were randomized into two study arms: Group A, which received three capsules of Symbiotic and Group B, started with three capsules of Placebo, both for daily administration; one capsule in the morning, before breakfast, one before lunch and the last before dinner. After three months, the crossover was made, when Group A received the Placebo capsules and Group B the Symbiotic capsules, for more 3 months.

The symbiotic capsules were composed by 100mg of strains of *Lactobacillus acidophilus* ( $3.7 \times 10^9$  CFU) and 150mg of fructo-oligosaccharides (FOS) per capsule (provided by Ativa Manipulation Pharmacy), total daily dose of  $11,1 \times 10^9$  CFU and 450mg of FOS. During the intervention period, we evaluated the

tolerability of the patient; they were asked about the bloating, flatulence, and bowel movement frequency and also stool consistency.

The total time of the intervention was 6 months, and the blood samples were collected on days zero (T0) (prior to the beginning of supplementation with symbiotic for group A, and placebo for group B), after the first three months (T3) when the crossover started, and at six months (T6) when both groups completed the intervention period (Figure 1).

#### *BLOOD COLLECTION TO SERUM PREPARATION*

The samples were taken in the afternoon, not necessarily in fast. Were collected at each stage of the study 15 ml blood into a serum-separating tube, and immediately, the tubes were sent to the Experimental Laboratory Multi-User 3 (PUCPR) to obtain the serum and it was stored at -80°C until use.

#### *ROUTINE MEASUREMENT OF SERUM IN Hospital*

Patients who agreed to participate in the study had the routine tests assessed at the first visit and in all periods of their return (T3 and T6). The important results for this study were urea, creatinine and albumin, measured in Beckman Coulter Au680 equipment. The urea values were obtained by kinetic enzymatic method with urease, creatinine by an enzymatic method with creatininase and albumin by a colorimetric bromocresol green method.

#### *MEASUREMENT OF CYTOKINES*

The serum level of IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF was determined by Luminex Platform, using a commercial kit from Life Technologies (Human

Cytokine Magnetic 6-Plex Panel) according to the manufacturer's instructions. The reading was done on the plate reader (Luminex platform) and the results compared to standard curves obtained with known concentrations of recombinant mediators.

#### *HPLC CONDITIONS FOR SIMULTANEOUS ANALYSIS OF pCS AND IS BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY*

Bound and free pCS and IS were determined in serum as previously described (Borges et al., 2016).

#### *STATISTICAL ANALYSIS*

Continuous variables were expressed as mean  $\pm$  SD, while categorical variables (eg: gender, presence of diabetes and CKD stage) were expressed as frequencies or percentages. The  $X^2$ , t test or Wilcoxon were used, as appropriate, to compare demographic and clinical characteristics at baseline. Correlations at baseline were accomplished using Pearson Correlation for parametric data and Spearman's rho for nonparametric data. These analyses were performed using SPSS Statistics 20.0. Changes from baseline to 3 months were reported as means and standard deviation. The crossover analysis was performed using a specific Stata command (pkcross) that allows investigating the effect of the intervention as well as if the sequence (starting in one or other group) and the period (the first part of the study versus the second) played any role in the results. Finally, this statistical approach also helps to identify the occurrence of a carryover effect. Statistical significance was set at the level of  $p < 0.05$ . All analysis were performed using STATA 13.0.

## Results

As shown in the flow diagram (Figure 2), 51 patients were invited to participate, of these 6 refused and one was excluded due to the difficulty in collecting blood. Initially, the study had a sample size of 44 individuals, 22 for the Group A and 22 in the Group B in the first three months, and for the remaining three months those who took part in the Group A went to the placebo group (Period 2) and vice versa. At the end of the intervention, 19 patients were excluded, nine did not return to consultations, six stopped taking the capsules, three progressed to the CKD stage V, being referred for renal replacement therapy or kidney transplantation clinic and one patient died.

The mean age of participants was  $51 \pm 9.34$  years, and 64% were women. The mean of glomerular filtration rate was  $36 \pm 14.26$  mL/min/1.73 m<sup>2</sup>, and in Group A prevailed patients belonged to stage 4 (46.2%) and in Group B, 41.7% belonged to stage 3A. Regarding nutritional status, BMI of the sample mean ( $28.5 \pm 5.75$  kg/m<sup>2</sup>) showed overweight. In addition, six patients in Group A (46.2%) were diabetic, and Group B, seven (51.3%) had this comorbid (Table 1). No description data was significantly different between the groups. Adverse events were continuously reported during the study period to the first investigator. The symbiotic was well tolerated in both groups and the patients reported no adverse effects.

The crossover analysis showed that therapy with symbiotics had no significant association in the concentrations of urea, creatinine, uremic toxins (IS and pCS) and cytokines (IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF), not even the sequence of the groups had influence on the results, and also there was no carryover (Table 2).

## Discussion

This study showed that intervention with symbiotic (composed by 3 capsules/day with a total daily dose of  $11.1 \times 10^9$  CFU of *Lactobacillus acidophilus* and 450 mg of FOS) for a period of three months was not able to influence the significant change of urea, creatinine, uremic toxins and cytokines concentrations in stable CKD patients stage 3 and 4.

In contrast to Raganathan and collaborators in two different studies in patients with CKD stages 3 and 4, prospective, double-blind, randomized, crossover, placebo-controlled study found a significant decrease in blood urea levels in two trials when administered for 3 months, capsules containing *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium longum* and *Streptococcus thermophilus* ( $1.5 \times 10^{10}$ CFU), in two capsules three times a day, totaling a daily dose of  $9 \times 10^{10}$ UFC (Ranganathan et al, 2009; Ranganathan et al., 2010).

Recently, Rossi *et al.* (2016) in a study called SYNERGY using symbiotic composed of nine different types of strains of *Lactobacillus*, *Bifidobacteria* and *Streptococcus* (90 billion CFU), and 15g of FOS and GOS during six weeks in a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover study, observed pCS decrease in 31 patients with CKD stages 3 and 4 associated with increased relative abundance of the species *Bifidobacterium spp.* analyzed by fecal samples. This result support the hypothesis that the species of bifidobacteria regulates the growth of bacterial species with high enzymatic ability to produce IS and pCS (Gibson and Wang, 1994). Nevertheless, the authors also found no reduction of inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, 1L-10 and TNF- $\alpha$ ) after the intervention with the symbiotic. On the other hand, in a randomized, double-blind, placebo-controlled study Wang and colleagues using probiotic capsules

( $4 \times 10^9$  CFU with four types of strains of lactobacilli and bifidobacteria) for six months showed a significant reduction in the endotoxin value and TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-5 suggesting the positive influence of probiotic supplementation on inflammatory factors, in addition to increasing the level IL-10 and to preserve kidney function in the treated group (Wang *et al.*, 2015). Possibly the composition of the probiotic or symbiotic, with different strains, can have a direct influence on the expected outcome.

Our study presents some limitations, including: (a) patients were the only responsible for the control of drug intake; (b) two patients reported the use of antibiotics during the study period. However, in contrast to the SINERGY study, the sensitivity analysis excluding these 2 patients did not change our findings (Rossi *et al.*, 2016); (c) even with our statistical approach take into account the possibility of a carryover effect, the lack of a wash-out period is another limitation. Nevertheless, our study has the important strength of being a randomized placebo-controlled crossover trial that reduce inter-individual variations of the intestinal microbiota (patients are their own controls) and the fact of being the first to analyze the independent impact of the *Lactobacillus acidophilus*.

In conclusion *Lactobacillus acidophilus* strains given as a symbiotic to CKD patients stage 3 and 4 was not able to reduce serum levels of uremic toxins and biomarkers of inflammation. New studies are necessary to better understand what are the ideal strains to compose a symbiotic in the setting of CKD patients.

## Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge Elaine Doff Dotta for assistance in cytokines measurement using the Luminex Platform, and Ativa Manipulation Pharmacy for providing the symbiotic and placebo supplements.

## Conflict of Interest Statement

All other authors declare no significant competing financial, professional or personal interests that might have influenced the performance or presentation of the work described in this manuscript.

## References

BORGES, N. A. et al. Protein-Bound Uremic Toxins from Gut Microbiota and Inflammatory Markers in Chronic Kidney Disease. **Journal of Renal Nutrition**, v. 26, n. 6, p. 396-400, 2016.

CALAF, R. et al. Determination of uremic solutes in biological fluids of chronic kidney disease patients by HPLC assay. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 879, n. 23, p. 2281-6, Aug 1 2011. ISSN 1873-376X (Electronic) 1570-0232 (Linking).  
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21727042> >.

GIBSON, G. R.; WANG, X. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. **J Appl Bacteriol**, v. 77, n. 4, p. 412-20, Oct 1994. ISSN 0021-8847 (Print) 0021-8847 (Linking).  
Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7989269>>.

MACFARLANE, G. T.; MACFARLANE, S. Bacteria, colonic fermentation, and gastrointestinal health. **J AOAC Int**, v. 95, n. 1, p. 50-60, Jan-Feb 2012. ISSN 1060-3271 (Print) 35 1060-3271 (Linking).  
Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22468341>>.

MEERT, N. et al. Novel method for simultaneous determination of p-cresylsulphate and p-cresylglucuronide: clinical data and pathophysiological implications. **Nephrol Dial Transplant**, v. 27, n. 6, p. 2388-96, Jun 2012. ISSN 1460-2385 (Electronic) 0931-0509 (Linking).  
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22167586> >.

RANGANATHAN, N. et al. Probiotic dietary supplementation in patients with stage 3 and 4 chronic kidney disease: a 6-month pilot scale trial in Canada. **Curr Med Res Opin**, v. 25, n. 8, p. 1919-30, Aug 2009. ISSN 1473-4877 (Electronic) 0300-7995 (Linking).  
Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19558344>>.

RANGANATHAN, N. et al. Pilot study of probiotic dietary supplementation for promoting healthy kidney function in patients with chronic kidney disease. **Adv Ther**, v. 27, n. 9, p. 634-47, Sep 2010. ISSN 1865-8652 (Electronic) 0741-238X (Linking).  
Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20721651>>.

ROSSI, M. et al. Synbiotics Easing Renal Failure by Improving Gut Microbiology (SYNERGY): A Randomized Trial. **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 11, n. 2, p. 223-31, Feb 5 2016. ISSN 1555-905X (Electronic) 1555-9041 (Linking).  
Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26772193>>.

WANG, I. K. et al. The effect of probiotics on serum levels of cytokine and endotoxin in peritoneal dialysis patients: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **Benef Microbes**, v. 6, n. 4, p. 423-30, 2015. ISSN 1876-2891 (Electronic) 1876-2883 (Linking).  
Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25609654>>.

Figure 1 - Pilot clinical study design

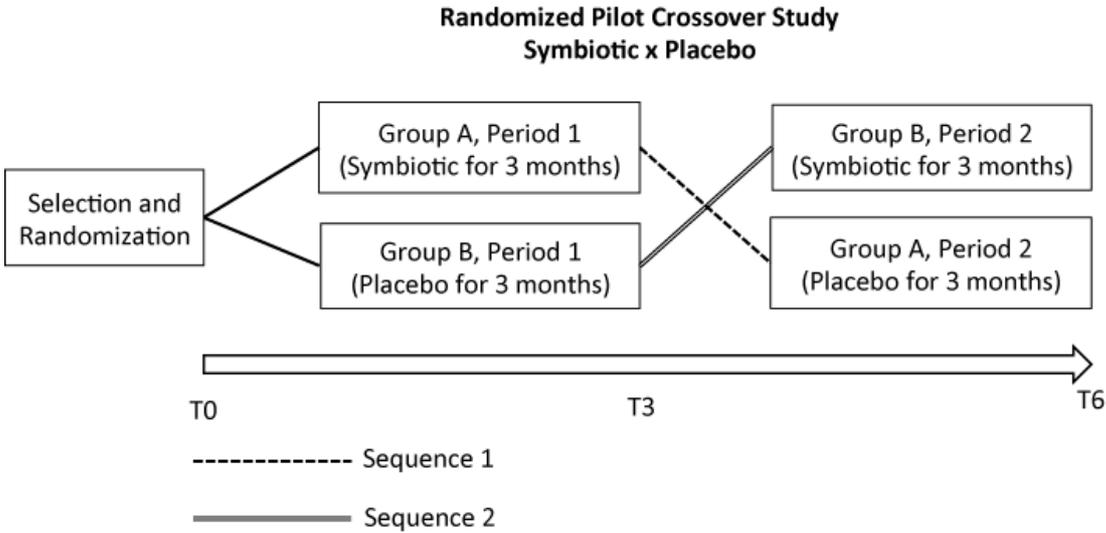


Figure 2 - Flow diagram of the recruitment, randomization and the follow-up of study participants

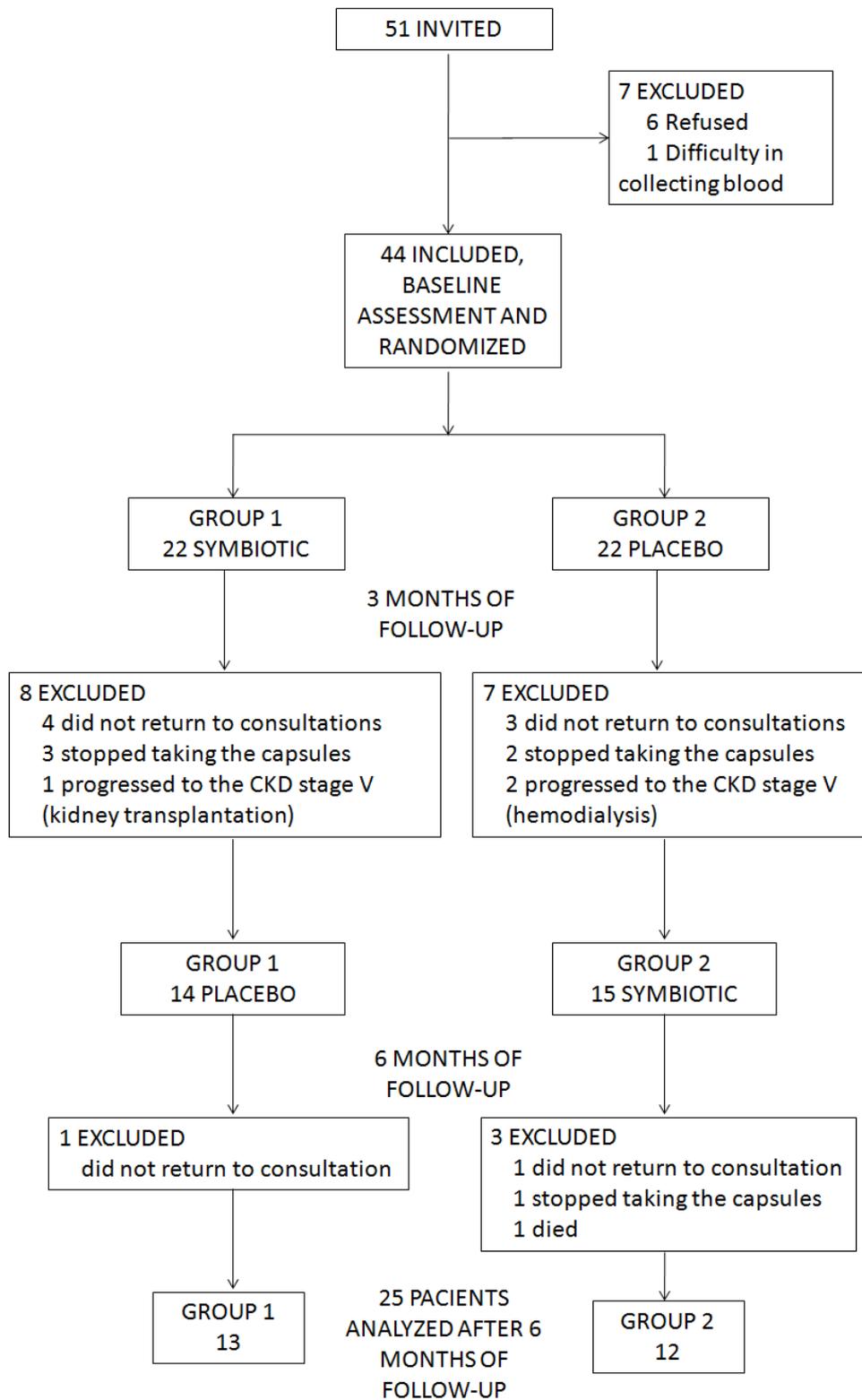


Table 1 - Baseline Characteristics of Participants

<b>Characteristics</b>	<b>Group 1 (n = 13)</b>	<b>Group 2 (n = 12)</b>	<b>P value</b>
Age (years)	50.5 ± 9.3	51.7 ± 9.7	0.75
Gender, n <sup>o</sup> (%)			
Man	4 (30.8%)	5 (41.7%)	0.68
eGFR(mL/min/1,73m <sup>2</sup> )	33.8 ± 14.6	38.5 ± 14	0.42
CKD stages, n <sup>o</sup> (%)			0.54
3A	4 (30.8%)	5 (41.7%)	
3B	3 (23.1%)	4 (33.3%)	
4	6 (46.2%)	3 (25%)	
BMI (Kg/m <sup>2</sup> )	27.8 ± 4,4	29.2 ± 7	0.56
Diabetes, n <sup>o</sup> (%)			
Yes	6 (46.2%)	7 (51.3%)	0.69

eGFR: estimated Glomerular Filtration Rate; CKD: Chronic Kidney Disease; BMI: Body Mass Index.

Table 2 - Change Scores for Primary and Secondary Outcome Measures from Baseline to Final Intervention

Outcomes	Mean (SD)									
	Baseline		Period 1 (Changes at T3)		Period 2 (changes at T6)		p value			
	Group A (n=13)	Group B (n=12)	Group A (n=13)	Group B (n=12)	Group A (n=13)	Group B (n=12)	Sequence	Intervention	Carryover	Period
<b>IL-4 (pg/ml)</b>	3.22 (0.45)	3.58 (1.11)	-0.16(0.39)	-0.25(0.63)	0.24(0.45)	0.17(0.40)	0.55	0.92	0.55	<0.01
<b>IL-5 (pg/ml)</b>	1.76 (1.06)	1.49 (0.18)	-0.13(0.54)	-0.19(0.14)	-0.05(0.19)	0.75(2.88)	0.27	0.43	0.25	0.32
<b>IL-6 (pg/ml)</b>	4.22 (2.13)	5.36 (6.50)	-0.24 (1.76)	-1.44(1.54)	-0.18(2.00)	0.67(2.12)	0.33	0.55	0.38	0.48
<b>IL-8 (pg/ml)</b>	29.50 (11.15)	28.81 (18.31)	- 2.39(16.10)	-5.63 (11.58)	-3.92 (13.61)	5.84(8.53)	0.15	0.18	0.37	0.30
<b>IL-10 (pg/ml)</b>	8.49 (1.31)	8.61 (1.07)	0.29(1.47)	0.04(1.83)	2.10(7.50)	1.76(3.02)	0.81	0.97	0.81	0.17
<b>GM-CSF (pg/ml)</b>	8.26 (0.03)	8.33 (0.13)	0.00(0.04)	-0.00(0.05)	-0.00(0.04)	0.12(0.26)	0.11	0.15	0.14	0.15
<b>pCS (µM)</b>	76.38 (99.80)	57.50 (40.50)	- 6.33(46.50)	8.23(48.40)	11.20(32.40)	4.48(66.40)	0.60	0.57	0.78	0.71
<b>IS (µM)</b>	21.15 (19.40)	9.08 (3.82)	-1.21(8.37)	3.62(7.59)	-1.87(5.23)	1.96(11.38)	0.84	0.08	0.84	0.63
<b>Urea (mg/dL)</b>	74.69 (34.14)	64.67 (20.97)	3.61(23.26)	4.58(17.34)	-1.38(17.27)	- 8.67(16.57)	0.53	0.48	0.56	0.13
<b>Creatinine (mg/dL)</b>	2.00 (1.08)	1.92 (0.79)	0.13(0.29)	0.16(0.43)	0.07(0.54)	-0.02(0.29)	0.81	0.46	0.77	0.15
<b>Albumine (g/dL)</b>	3.92 (0.76)	3.75 (0.75)	-0.01(0.69)	0.07(0.28)	0.05(0.26)	0.03(0.32)	0.57	0.83	0.68	0.96

SD: Standard Deviation; IL-4: Interleukin 4; IL-5: Interleukin 5; IL-6: Interleukin 6; IL-8: Interleukin 8; IL-10: Interleukin 10; GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; pCS: p-Cresylsulfate; IS: Indoxyl Sulfate.

## 6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

A idéia de que alimentos poderiam prevenir doenças e serem usados como tratamento surgiu há milênios, Hipócrates já dizia: “Que o teu remédio *seja* o teu *alimento* e o teu *alimento seja* o teu remédio”. Nesse cenário, muitos estudos têm demonstrado vários benefícios dos pre, pro e simbióticos à saúde humana, estudos mais consolidados mostram a influência benéfica desses componentes nas doenças intestinais e na imunidade, e recentemente, outros ensaios demonstram algum possível benefício no diabetes, obesidade, em alergias, na encefalopatia hepática, doença renal e até no estado psicológico (Zhang, Q. *et. al.*, 2016, Kobylak *et al.*, 2016, Patel, R.; DuPont. H.L., 2015; Liu, Q. *et. al.*, 2004; Islam, 2016).

Entretanto, o presente estudo, que investigou a influência de um simbiótico composto por  $11,1 \times 10^9$  UFC de *L. acidophilus* e 450mg de FOS, durante 90 dias, mostrou que a intervenção não foi capaz de influenciar na mudança significativa de ureia, creatinina, toxinas urêmicas e citocinas em pacientes renais crônicos em tratamento conservador nessa amostra estudada.

A dose de probiótico utilizada nesse ensaio está adequada quanto a dose fisiológica recomendada para beneficiar o hospedeiro, que é de  $10^{9-10}$  UFC/dia (Raizel *et. al.*, 2011). Além disso, outros estudos citados utilizaram doses similares à desse ensaio. Entretanto, a recomendação dietética para o efeito benéfico dos prebióticos é de 5 a 20 g/dia (Saad, 2006), constatando então, que a quantidade utilizada nesse estudo ficou muito abaixo da dose recomendada. O tempo de administração do simbiótico também foi similar ao tempo utilizado nos estudos citados. Além disso, o simbiótico foi bem tolerado, e os pacientes não relataram efeitos adversos. Um fator limitante para a confiabilidade dos resultados pode ser em relação ao controle da ingestão das cápsulas, que foi controlada apenas pelo relato dos pacientes. Quanto ao uso de antibiótico durante a intervenção, apenas dois pacientes fizeram uso do medicamento durante o tratamento, e mesmo realizando a análise sem os dois participantes não houve diferença significativa nos resultados.

Quanto às análises dos recordatórios de 24h, observou-se que não houve diferença significativa na ingestão de fibra que pudesse justificar qualquer efeito adverso, houve apenas a redução da ingestão de fibra no grupo A de T0 para T3 (Figura 4). A ingestão protéica diminuiu significativamente apenas no período em que o grupo A ingeriu as cápsulas de simbiótico (Figura 5), o que poderia ter causado uma redução na produção das toxinas nesse intervalo de tempo, mascarando um possível benefício do simbiótico. Entretanto, mesmo com a redução da ingestão protéica, não houve diferença significativa nos resultados das toxinas urêmicas.

Figura 4. Ingestão de fibras dos Grupos A e B nos tempos T0, T3 e T6

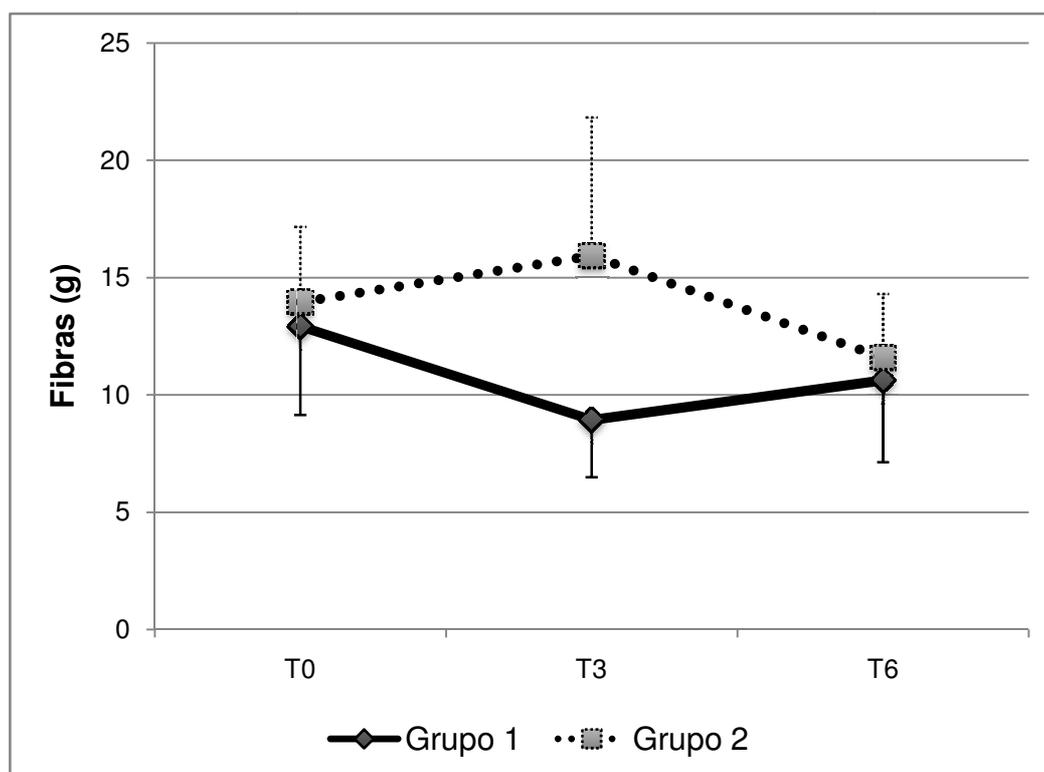
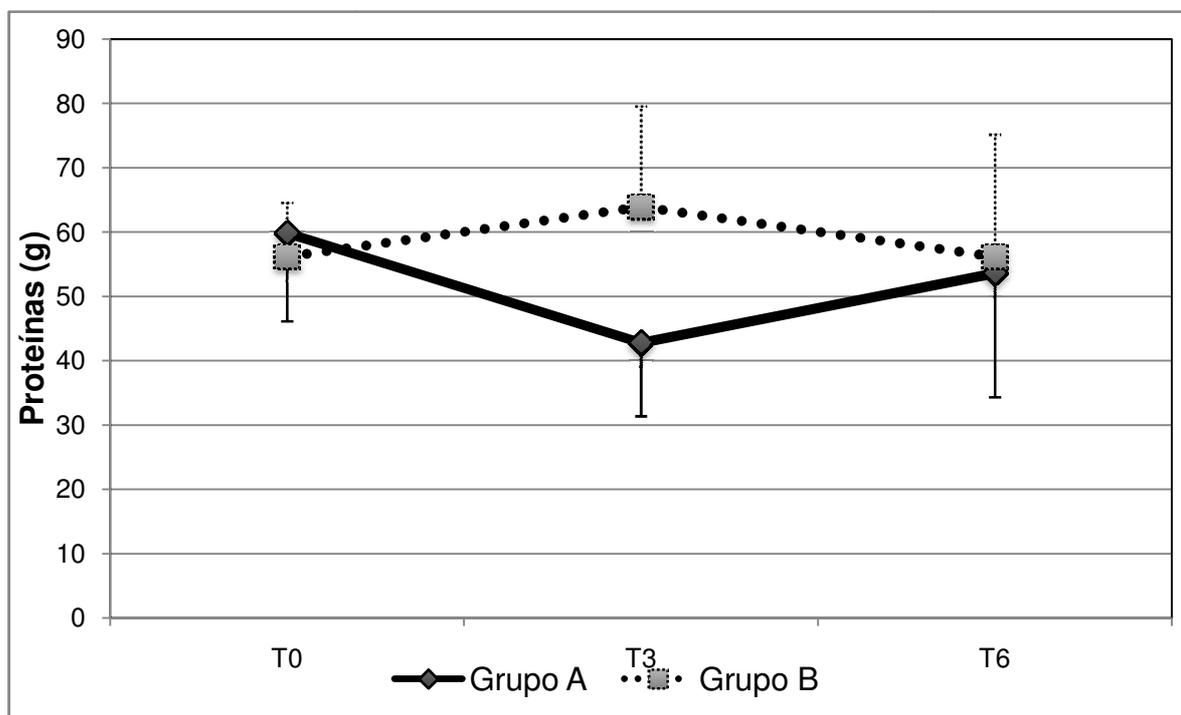


Figura 5. Ingestão protéica dos Grupos A e B nos tempos T0, T3 e T6



Concentrações de IS e pCS são geralmente derivadas do metabolismo protéico de bactérias intestinais, e a espécie das bifidobactérias regula o crescimento de espécies bacterianas com alta capacidade enzimática de produzir IS e pCS (Gibson e Wang, 1994). Dessa forma, é possível observar em vários ensaios, a habilidade das formulações de probióticos ou simbióticos compostos por bifidobactérias, em reduzir os níveis de pCS e IS, e isso parece ser dependente do seu efeito bifidogênico. Assim, pode-se dizer que talvez o efeito esperado em relação às toxinas urêmicas nesse estudo não foi alcançado devido à composição do simbiótico, que não levou em sua formulação espécies de bifidobactérias, apenas lactobacilos.

Portanto, mais estudos com diferentes cepas, principalmente bifidobactérias, maior quantidade de prebióticos, controle rígido da ingestão das cápsulas, e um número maior de participantes são necessários para evidenciar os possíveis benefícios do simbiótico na doença renal crônica e suas complicações.

## 7 – CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados no artigo, não é possível afirmar que o uso de um simbiótico com uma dose diária de  $11,1 \times 10^9$  UFC de *L. acidophilus* e 450mg de FOS, durante 90 dias, seja capaz de reduzir creatinina, ureia, toxinas urêmicas e melhorar o perfil inflamatório nessa amostra de pacientes estudados. São necessários mais estudos em larga escala, randomizados, placebo-controlados e com ingestão controlada das cápsulas para evidenciar os possíveis benefícios do simbiótico. Além disso, o uso de diferentes cepas como bifidobactérias, e uma quantidade maior de prebióticos poderia gerar resultados benéficos para a população de doentes renais.

## 8 – REFERÊNCIAS

ALEBIOSU, C. O.; AYODELE, O. E. The global burden of chronic kidney disease and the way forward. **Ethn Dis**, v. 15, n. 3, p. 418-23, Summer 2005. ISSN 1049-510X (Print)  
1049-510X (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16108301> >.

ALIPOUR, B. et al. Effects of Lactobacillus casei supplementation on disease activity and inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis patients: a randomized double-blind clinical trial. **Int J Rheum Dis**, Mar 27 2014. ISSN 1756-185X (Electronic)  
1756-1841 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24673738> >.

ANDERSON, A. D. et al. Randomised clinical trial of synbiotic therapy in elective surgical patients. **Gut**, v. 53, n. 2, p. 241-5, Feb 2004. ISSN 0017-5749 (Print)  
0017-5749 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14724157> >.

BAMMENS, B. et al. Free serum concentrations of the protein-bound retention solute p-cresol predict mortality in hemodialysis patients. **Kidney Int**, v. 69, n. 6, p. 1081-7, Mar 2006. ISSN 0085-2538 (Print)  
0085-2538 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16421516> >.

BARRETO, D. V. et al. Plasma interleukin-6 is independently associated with mortality in both hemodialysis and pre-dialysis patients with chronic kidney disease. **Kidney Int**, v. 77, n. 6, p. 550-6, Mar 2010. ISSN 1523-1755 (Electronic)  
0085-2538 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20016471> >.

BARRETO, F. C. et al. Serum indoxyl sulfate is associated with vascular disease and mortality in chronic kidney disease patients. **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 4, n. 10, p. 1551-8, Oct 2009. ISSN 1555-905X (Electronic)  
1555-9041 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19696217> >.

BERGEN, W. G.; WU, G. Intestinal nitrogen recycling and utilization in health and disease. **J Nutr**, v. 139, n. 5, p. 821-5, May 2009. ISSN 1541-6100 (Electronic)  
0022-3166 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19282369> >.

BONE, E.; TAMM, A.; HILL, M. The production of urinary phenols by gut bacteria and their possible role in the causation of large bowel cancer. **Am J Clin Nutr**, v. 29, n. 12, p. 1448-54, Dec 1976. ISSN 0002-9165 (Print)

0002-9165 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/826152> >.

CHARNEY, D. I.; WALTON, D. F.; CHEUNG, A. K. Atherosclerosis in chronic renal failure. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v. 2, n. 6, p. 876-82, Nov 1993. ISSN 1062-4821 (Print)

1062-4821 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7922227> >.

DE PRETER, V. et al. Effects of Lactobacillus casei Shirota, Bifidobacterium breve, and oligofructose-enriched inulin on colonic nitrogen-protein metabolism in healthy humans. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 292, n. 1, p. G358-68, Jan 2007. ISSN 0193-1857 (Print)

0193-1857 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16990449> >.

DE VRESE, M.; SCHREZENMEIR, J. Probiotics, prebiotics, and synbiotics. **Adv Biochem Eng Biotechnol**, v. 111, p. 1-66, 2008. ISSN 1616-8542 (Electronic)

0724-6145 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18461293> >.

DELGENTERIE, V. et al. Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract. **Curr Issues Mol Biol**, v. 10, n. 1-2, p. 37-54, 2008. ISSN 1467-3037 (Print)

1467-3037 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18525105> >.

DOU, L. et al. The uremic solutes p-cresol and indoxyl sulfate inhibit endothelial proliferation and wound repair. **Kidney Int**, v. 65, n. 2, p. 442-51, Feb 2004. ISSN 0085-2538 (Print)

0085-2538 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14717914> >.

DUNN, s. R. Et al. Effect of oral administration of freeze-dried *lactobacillus acidophilus* on small bowel bacterial overgrowth in patients with end stage kidney disease: reducing uremic toxins and improving nutrition. **International Dairy Journal**, v. 8, n. 5-6, p. 545-553, 1998.

DUNNE, C. et al. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. **Am J Clin Nutr**, v. 73, n. 2 Suppl, p. 386S-392S, Feb 2001. ISSN 0002-9165 (Print)

0002-9165 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11157346> >.

EVENEPOEL, P. et al. Uremic toxins originating from colonic microbial metabolism. **Kidney Int Suppl**, n. 114, p. S12-9, Dec 2009. ISSN 0098-6577 (Print)

0098-6577 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19946322> >.

FAO; WHO. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Córdoba: 34 p. 2001.

FREI, R.; AKDIS, M.; O'MAHONY, L. Prebiotics, probiotics, synbiotics, and the immune system: experimental data and clinical evidence. **Curr Opin Gastroenterol**, v. 31, n. 2, p. 153-8, Mar 2015. ISSN 1531-7056 (Electronic) 0267-1379 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25594887> >.

GAUDANA, S. B.; DHANANI, A. S.; BAGCHI, T. Probiotic attributes of Lactobacillus strains isolated from food and of human origin. **Br J Nutr**, v. 103, n. 11, p. 1620-8, Jun 2010. ISSN 1475-2662 (Electronic) 0007-1145 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20070917> >.

GIBSON, G. R.; WANG, X. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. **J Appl Bacteriol**, v. 77, n. 4, p. 412-20, Oct 1994. ISSN 0021-8847 (Print) 0021-8847 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7989269>>.

GLORIEUX, G.; VANHOLDER, R. New uremic toxins - which solutes should be removed? **Contrib Nephrol**, v. 168, p. 117-28, 2011. ISSN 1662-2782 (Electronic) 0302-5144 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20938131> >.

HEGAB, Z. et al. Role of advanced glycation end products in cardiovascular disease. **World J Cardiol**, v. 4, n. 4, p. 90-102, Apr 26 2012. ISSN 1949-8462 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22558488> >.

HIDA, M. et al. Inhibition of the accumulation of uremic toxins in the blood and their precursors in the feces after oral administration of Lebenin, a lactic acid bacteria preparation, to uremic patients undergoing hemodialysis. **Nephron**, v. 74, n. 2, p. 349-55, 1996. ISSN 0028-2766 (Print) 0028-2766 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8893154> >.

ISLAM, S. U. Clinical Uses of Probiotics. **Medicine (Baltimore)**, v. 95, n. 5, p. e2658, Feb 2016. ISSN 1536-5964 (Electronic) 0025-7974 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26844491> >.

KELISHADI, R. et al. A randomized triple-masked controlled trial on the effects of synbiotics on inflammation markers in overweight children. **J Pediatr (Rio J)**, v. 90, n. 2, p. 161-8, Mar-Apr 2014. ISSN 1678-4782 (Electronic) 0021-7557 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24184299> >.

KIM, Y. et al. Inhibition of Escherichia coli O157:H7 attachment by interactions between lactic acid bacteria and intestinal epithelial cells. **J Microbiol Biotechnol**, v. 18, n. 7, p. 1278-85, Jul 2008. ISSN 1017-7825 (Print) 1017-7825 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18667857> >.

KOBYLIAK, N. et al. Probiotics in prevention and treatment of obesity: a critical view. **Nutr Metab (Lond)**, v. 13, p. 14, 2016. ISSN 1743-7075 (Electronic) 1743-7075 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26900391> >.

KRUMBECK, J. A. et al. Prebiotics and synbiotics: dietary strategies for improving gut health. **Curr Opin Gastroenterol**, v. 32, n. 2, p. 110-9, Mar 2016. ISSN 1531-7056 (Electronic) 0267-1379 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26825589> >.

LIU, Q. et al. Synbiotic modulation of gut flora: effect on minimal hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. **Hepatology**, v. 39, n. 5, p. 1441-9, May 2004. ISSN 0270-9139 (Print) 0270-9139 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15122774> >.

LYSAGHT, M. J. Maintenance dialysis population dynamics: current trends and long-term implications. **J Am Soc Nephrol**, v. 13 Suppl 1, p. S37-40, Jan 2002. ISSN 1046-6673 (Print) 1046-6673 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11792760> >.

MACFARLANE, G. T.; MACFARLANE, S. Bacteria, colonic fermentation, and gastrointestinal health. **J AOAC Int**, v. 95, n. 1, p. 50-60, Jan-Feb 2012. ISSN 1060-3271 (Print) 1060-3271 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22468341> >.

MARTÍNEZ-CASTELAO A, et al. Documento de consenso para la detección y manejo de la enfermedad renal crónica. Semergen. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semerg.2014.09.001>

MATSUMOTO, S. et al. Probiotic Lactobacillus-induced improvement in murine chronic inflammatory bowel disease is associated with the down-regulation of

pro-inflammatory cytokines in lamina propria mononuclear cells. **Clin Exp Immunol**, v. 140, n. 3, p. 417-26, Jun 2005. ISSN 0009-9104 (Print) 0009-9104 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15932502> >.

MEGUID EL NAHAS, A.; BELLO, A. K. Chronic kidney disease: the global challenge. **Lancet**, v. 365, n. 9456, p. 331-40, Jan 22-28 2005. ISSN 1474-547X (Electronic) 0140-6736 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15664230> >.

MEIJERS, B. K. et al. Free p-cresol is associated with cardiovascular disease in hemodialysis patients. **Kidney Int**, v. 73, n. 10, p. 1174-80, May 2008. ISSN 1523-1755 (Electronic) 0085-2538 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18305466> >.

MEIJERS, B. K.; EVENEPOEL, P. The gut-kidney axis: indoxyl sulfate, p-cresyl sulfate and CKD progression. **Nephrol Dial Transplant**, v. 26, n. 3, p. 759-61, Mar 2011. ISSN 1460-2385 (Electronic) 0931-0509 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21343587> >.

MIRANDA ALATRISTE, P. V. et al. Effect of probiotics on human blood urea levels in patients with chronic renal failure. **Nutr Hosp**, v. 29, n. 3, p. 582-90, Mar 2014. ISSN 1699-5198 (Electronic) 0212-1611 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24559003> >.

NAKABAYASHI, I. et al. Effects of synbiotic treatment on serum level of p-cresol in haemodialysis patients: a preliminary study. **Nephrol Dial Transplant**, v. 26, n. 3, p. 1094-8, Mar 2011. ISSN 1460-2385 (Electronic) 0931-0509 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20929916> >.

PAHL, M. V.; VAZIRI, N. D. The Chronic Kidney Disease - Colonic Axis. **Semin Dial**, v. 28, n. 5, p. 459-63, Sep-Oct 2015. ISSN 1525-139X (Electronic) 0894-0959 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25855516> >.

PATEL, R.; DUPONT, H. L. New approaches for bacteriotherapy: prebiotics, new-generation probiotics, and synbiotics. **Clin Infect Dis**, v. 60 Suppl 2, p. S108-21, May 15 2015. ISSN 1537-6591 (Electronic) 1058-4838 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25922396> >.

PECOITS-FILHO, R.; LINDHOLM, B.; STENVINKEL, P. The malnutrition, inflammation, and atherosclerosis (MIA) syndrome -- the heart of the matter.

**Nephrol Dial Transplant**, v. 17 Suppl 11, p. 28-31, 2002. ISSN 0931-0509 (Print)

0931-0509 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12386254> >.

RAFF, A. C.; MEYER, T. W.; HOSTETTER, T. H. New insights into uremic toxicity. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v. 17, n. 6, p. 560-5, Nov 2008. ISSN 1062-4821 (Print)

1062-4821 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18941347> >.

RAIZEL, R. et al. Efeitos do consumo de probióticos, prebióticos e simbióticos para o organismo humano. **Ciência & Saúde**, v. 4, n. 2, p. 66-74, 2011. ISSN 1983-652X.

RAMEZANI, A.; RAJ, D. S. The gut microbiome, kidney disease, and targeted interventions. **J Am Soc Nephrol**, v. 25, n. 4, p. 657-70, Apr 2014. ISSN 1533-3450 (Electronic)

1046-6673 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24231662> >.

RANGANATHAN, N. et al. Probiotic dietary supplementation in patients with stage 3 and 4 chronic kidney disease: a 6-month pilot scale trial in Canada. **Curr Med Res Opin**, v. 25, n. 8, p. 1919-30, Aug 2009. ISSN 1473-4877 (Electronic)

0300-7995 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19558344> >.

RANGANATHAN, N. et al. Probiotic amelioration of azotemia in 5/6th nephrectomized Sprague-Dawley rats. **ScientificWorldJournal**, v. 5, p. 652-60, Aug 24 2005. ISSN 1537-744X (Electronic)

1537-744X (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16127597> >.

RANGANATHAN, N. et al. In vitro and in vivo assessment of inraintestinal bacteriotherapy in chronic kidney disease. **ASAIO J**, v. 52, n. 1, p. 70-9, Jan-Feb 2006. ISSN 1058-2916 (Print)

1058-2916 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16436893> >.

RANGANATHAN, N. et al. Pilot study of probiotic dietary supplementation for promoting healthy kidney function in patients with chronic kidney disease. **Adv Ther**, v. 27, n. 9, p. 634-47, Sep 2010. ISSN 1865-8652 (Electronic)

0741-238X (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20721651> >.

REID, G.; KIM, S. O.; KOHLER, G. A. Selecting, testing and understanding probiotic microorganisms. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 46, n. 2, p. 149-57, Mar 2006. ISSN 0928-8244 (Print)

0928-8244 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16487295> >.

RITZ, E. Intestinal-renal syndrome: mirage or reality? **Blood Purif**, v. 31, n. 1-3, p. 70-6, 2011. ISSN 1421-9735 (Electronic)  
0253-5068 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21228570> >.

ROSSI, M. et al. Pre-, pro-, and synbiotics: do they have a role in reducing uremic toxins? A systematic review and meta-analysis. **Int J Nephrol**, v. 2012, p. 673631, 2012. ISSN 2090-2158 (Electronic). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23316359> >.

ROSSI, M. et al. Synbiotics Easing Renal Failure by Improving Gut Microbiology (SYNERGY): A Randomized Trial. **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 11, n. 2, p. 223-31, Feb 5 2016. ISSN 1555-905X (Electronic)  
1555-9041 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26772193> >.

SAAD, Susana Marta Isay. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, São Paulo , v. 42, n. 1, p. 1-16, Mar. 2006 . Available from <  
[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-93322006000100002&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322006000100002&lng=en&nrm=iso)>.

SCHEPERS, E. et al. P-cresylsulphate, the main in vivo metabolite of p-cresol, activates leucocyte free radical production. **Nephrol Dial Transplant**, v. 22, n. 2, p. 592-6, Feb 2007. ISSN 0931-0509 (Print)  
0931-0509 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17040995> >.

SIMENHOFF, M. L. et al. Biomodulation of the toxic and nutritional effects of small bowel bacterial overgrowth in end-stage kidney disease using freeze-dried *Lactobacillus acidophilus*. **Miner Electrolyte Metab**, v. 22, n. 1-3, p. 92-6, 1996. ISSN 0378-0392 (Print)  
0378-0392 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8676836> >.

SULLIVAN, A.; NORD, C. E. Probiotics and gastrointestinal diseases. **J Intern Med**, v. 257, n. 1, p. 78-92, Jan 2005. ISSN 0954-6820 (Print)  
0954-6820 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15606379> >.

SUVARNA, V. C. B., V.U. . Probiotics in human health: a current assessment. **Current Science** n. 88, p. 1744–1748, 2005.

TAKI, K.; TAKAYAMA, F.; NIWA, T. Beneficial effects of Bifidobacteria in a gastroresistant seamless capsule on hyperhomocysteinemia in hemodialysis

patients. **J Ren Nutr**, v. 15, n. 1, p. 77-80, Jan 2005. ISSN 1532-8503 (Electronic)  
1051-2276 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15648012> >.

TAKAYAMA, F.; TAKI, K.; NIWA, T. Bifidobacterium in gastro-resistant seamless capsule reduces serum levels of indoxyl sulfate in patients on hemodialysis. **Am J Kidney Dis**, v. 41, n. 3 Suppl 1, p. S142-5, Mar 2003. ISSN 1523-6838 (Electronic)  
0272-6386 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12612972> >.

VAN BELKUM, A.; NIEUWENHUIS, E. E. Life in commercial probiotics. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 50, n. 3, p. 281-3, Aug 2007. ISSN 0928-8244 (Print)  
0928-8244 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17651124> >.

VANHOLDER, R.; DE SMET, R.; LESAFFER, G. p-cresol: a toxin revealing many neglected but relevant aspects of uraemic toxicity. **Nephrol Dial Transplant**, v. 14, n. 12, p. 2813-5, Dec 1999. ISSN 0931-0509 (Print)  
0931-0509 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10570076> >.

VANHOLDER, R.; VAN LAECKE, S.; GLORIEUX, G. What is new in uremic toxicity? **Pediatr Nephrol**, v. 23, n. 8, p. 1211-21, Aug 2008. ISSN 0931-041X (Print)  
0931-041X (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18324423> >.

VAZIRI, N. D. CKD impairs barrier function and alters microbial flora of the intestine: a major link to inflammation and uremic toxicity. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v. 21, n. 6, p. 587-92, Nov 2012. ISSN 1473-6543 (Electronic)  
1062-4821 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23010760> >.

VAZIRI, N. D. Effect of Synbiotic Therapy on Gut-Derived Uremic Toxins and the Intestinal Microbiome in Patients with CKD. **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 11, n. 2, p. 199-201, Feb 5 2016. ISSN 1555-905X (Electronic)  
1555-9041 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26772192> >.

VITETTA, L. et al. A review of the pharmacobiotic regulation of gastrointestinal inflammation by probiotics, commensal bacteria and prebiotics. **Inflammopharmacology**, v. 20, n. 5, p. 251-66, Oct 2012. ISSN 1568-5608 (Electronic)  
0925-4692 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22427210> >.

VITETTA, L.; GOBE, G. Uremia and chronic kidney disease: the role of the gut microflora and therapies with pro- and prebiotics. **Mol Nutr Food Res**, v. 57, n. 5, p. 824-32, May 2013. ISSN 1613-4133 (Electronic) 1613-4125 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23450842>>.

WANG, I. K. et al. The effect of probiotics on serum levels of cytokine and endotoxin in peritoneal dialysis patients: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **Benef Microbes**, v. 6, n. 4, p. 423-30, 2015. ISSN 1876-2891 (Electronic) 1876-2883 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25609654>>.

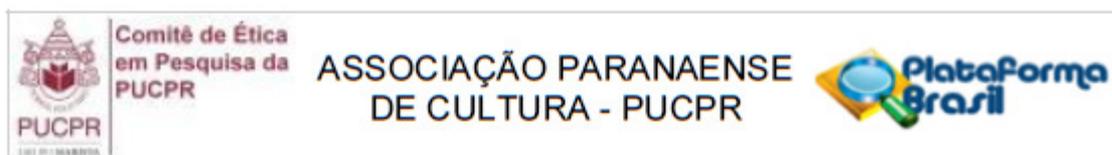
WIKOFF, W. R. et al. Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 10, p. 3698-703, Mar 10 2009. ISSN 1091-6490 (Electronic) 0027-8424 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19234110>>.

ZHANG, Q. L.; ROTHENBACHER, D. Prevalence of chronic kidney disease in population-based studies: systematic review. **BMC Public Health**, v. 8, p. 117, 2008. ISSN 1471-2458 (Electronic) 1471-2458 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18405348>>.

ZHANG, Q.; WU, Y.; FEI, X. Effect of probiotics on glucose metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis of randomized controlled trials. **Medicina (Kaunas)**, v. 52, n. 1, p. 28-34, 2016. ISSN 1648-9144 (Electronic) 1010-660X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26987497>>.

## **ANEXOS**

## ANEXO 01 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE SIMBIÓTICO SOBRE A TOXICIDADE URÊMICA E MEDIADORES INFLAMATÓRIOS EM PACIENTES RENAI CRÔNICOS EM ESTÁGIO 3 E 4

**Pesquisador:** Andrea Novais Moreno

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 32870614.0.0000.0020

**Instituição Proponente:** Associação Paranaense de Cultura - PUCPR

**Patrocinador Principal:** MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 746.114

**Data da Relatoria:** 06/08/2014

#### Apresentação do Projeto:

Estudo experimental, randomizado, placebo controlado, cruzado, de caráter quantitativo cuja amostra será composta por Pacientes renais crônicos em tratamento conservador.

#### Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar o efeito da administração de simbiótico sobre a toxicidade urêmica (p-cresilsulfato e indoxil sulfato) e o perfil inflamatório (dosagem de IL-6 e PCR) de pacientes renais crônicos em tratamento conservador.

Objetivo Secundário:

Avaliar os parâmetros clínicos de controle da doença renal (dosagem da relação albumina/creatinina e ureia) antes e após a oferta de simbiótico.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A ingestão de simbióticos pode causar distensão abdominal, flatulência e a produção de gases devido à morte dos patógenos no ambiente intestinal e a fermentação dos carboidratos não digeríveis (prebióticos).

**Endereço:** Rua Imaculada Conceição 1155  
**Bairro:** Prado Velho **CEP:** 80.215-901  
**UF:** PR **Município:** CURITIBA  
**Telefone:** (41)3271-2292 **Fax:** (41)3271-2292 **E-mail:** nep@puopr.br



Comitê de Ética  
em Pesquisa da  
PUCPR

ASSOCIAÇÃO PARANAENSE  
DE CULTURA - PUCPR



Continuação do Parecer: 746.114

**Benefícios:**

A ingestão de probióticos é responsável por modular a flora intestinal, colonizando o trato gastrointestinal e produzindo compostos antimicrobianos preservando a integridade intestinal, protegendo assim, contra infecção intestinal. Aumenta a biodisponibilidade de nutrientes, reduzindo os sintomas da intolerância à lactose e diminuindo a prevalência de alergia em pessoas suscetíveis, reduz os níveis de colesterol sérico e promove melhorias não específicas do sistema imune. Outro efeito bastante descrito em pacientes renais, em tratamento conservador, é a redução de níveis sanguíneos de uréia, e algumas toxinas urêmicas como indoxil sulfato. A associação de probióticos com prebióticos (fibra dietética, não digerível, fermentativa, que estimula o crescimento e aumenta a sobrevivência de bactérias probióticas no intestino) denomina-se simbióticos. E, inúmeros efeitos são propostos em decorrência do consumo de simbióticos, dentre os quais, destacam-se: a redução de citocinas pró-inflamatórias, a melhora do sistema imune, redução das infecções intestinais, aumento da massa magra e redução da massa gorda. Além de benefícios descritos em pacientes renais com a redução de toxinas urêmicas como p-cresol. Tendo em vista que o estudo será cruzado, isto é, que após três meses, os pacientes que receberam placebo passarão a receber o simbiótico e vice versa, ressalta-se que ambos os grupos receberão o simbiótico, garantindo assim o benefício a todos os componentes da amostra.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Projeto de pesquisa relevante, metodologicamente adequado.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

TCUD Adequado com datas bem definidas.

TCLE claro, objetivo, preserva o sujeito de pesquisa.

**Recomendações:**

nenhuma

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Projeto de pesquisa aprovado.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155

Bairro: Prado Velho

CEP: 80.215-901

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3271-2292

Fax: (41)3271-2292

E-mail: nep@pucpr.br



Comitê de Ética  
em Pesquisa da  
PUCPR

ASSOCIAÇÃO PARANAENSE  
DE CULTURA - PUCPR



Continuação do Parecer: 746.114

CURITIBA, 11 de Agosto de 2014

---

Assinado por:  
NAIM AKEL FILHO  
(Coordenador)

Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155  
Bairro: Prado Velho CEP: 80.215-901  
UF: PR Município: CURITIBA  
Telefone: (41)3271-2292 Fax: (41)3271-2292 E-mail: nep@pucpr.br

## ANEXO 02 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, \_\_\_\_\_  
(nome completo), \_\_\_\_\_ (nacionalidade), \_\_\_\_\_ anos,  
\_\_\_\_\_ (estado civil), \_\_\_\_\_ (profissão), portador do  
RG \_\_\_\_\_, aceito participar do estudo denominado:  
Efeito da Administração de Simbiótico sobre a Toxicidade Urêmica e Mediadores  
Inflamatórios em pacientes renais crônicos em estadio 3 e 4, cujos objetivos e  
justificativas são: avaliar o efeito da oferta de simbiótico sobre a redução de  
compostos tóxicos e mediadores inflamatórios acumulados no sangue devido a  
doença renal em pacientes renais crônicos em tratamento conservador. Estou  
ciente de que o consumo das cápsulas contendo o simbiótico auxilia na proteção  
contra infecção intestinal e melhora a freqüência de evacuação.

A minha participação no referido estudo será no sentido de consentir com a  
coleta de dados do prontuário, fornecer dados reais referentes a alimentação,  
submeter-se a coleta de sangue na freqüência necessária para as análises  
estabelecidas e aceitar participar do tratamento, ingerindo obrigatoriamente a  
quantidade estabelecida de cápsulas de simbiótico ou cápsulas sem efeito  
(placebo) durante o período do estudo, compreendido em 6 meses, mesmo  
sabendo que a ingestão dessas cápsulas de pode causar distensão abdominal e  
flatulência. O estudo será dividido em duas etapas de mesma duração (três  
meses cada etapa): na primeira, um grupo receberá o tratamento com simbiótico,  
e o outro, apenas a cápsula sem efeito. Na segunda etapa, o grupo que recebeu  
o simbiótico receberá a cápsula sem efeito, e o grupo que não recebeu o  
simbiótico, passará a receber, sendo que, ao final das duas etapas, todos os  
participantes receberão a mesma dosagem de simbiótico.

Estou ciente de que minha privacidade será respeitada, ou seja, meu nome  
ou qualquer outro dado ou elemento que possa, de qualquer forma, me  
identificar, será mantido em sigilo.

Também fui informado de que posso me recusar a participar do estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar, e de, por desejar sair da pesquisa, não sofrerei qualquer prejuízo à assistência que venho recebendo.

---

\_\_\_\_\_  
Espaço para rubrica pesquisador

---

\_\_\_\_\_  
paciente

Os pesquisadores envolvidos com o referido projeto são Cristina Techy Roth, mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Escola de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, e Andrea Moreno Amaral (orientadora), e com eles poderei manter contato pelos telefones (41) 99753498 (Cristina); (041) 88289718 (Andrea).

É assegurada a assistência durante toda pesquisa, bem como me é garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas conseqüências, enfim, tudo o que eu queira saber antes, durante e depois da minha participação.

Enfim, tendo sido orientado quanto ao teor de todo o aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo do já referido estudo, manifesto meu livre consentimento em participar, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, por minha participação.

No entanto, caso eu tenha qualquer despesa decorrente da participação na pesquisa, haverá ressarcimento na forma seguinte de dinheiro. De igual maneira, caso ocorra algum dano decorrente da minha participação no estudo, serei devidamente indenizado, conforme determina a lei.

Em caso de reclamação ou qualquer tipo de denúncia sobre este estudo devo ligar para o CEP PUCPR (41) 3271-2292 ou mandar um *email* para [nep@pucpr.br](mailto:nep@pucpr.br)

Curitiba, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2014.

---

Nome e assinatura do sujeito da pesquisa

---

Nome(s) e assinatura(s) do(s) pesquisador(es) responsável(responsáveis)