

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

EFEITO DO CONSUMO DE PROBIÓTICOS EM FATORES ASSOCIADOS
COM PROGRESSÃO DA DOENÇA RENAL CRÔNICA E RISCO
CARDIOVASCULAR

THAÍS RODRIGUES MOREIRA

PORTO ALEGRE

2018

**EFEITO DO CONSUMO DE PROBIÓTICOS EM FATORES ASSOCIADOS
COM PROGRESSÃO DA DOENÇA RENAL CRÔNICA E RISCO
CARDIOVASCULAR**

THAÍS RODRIGUES MOREIRA

Orientador: Prof. Dr. Francisco José
Veríssimo Veronese.

Co-Orientadora: Prof^ª. Dra. Cristina
Karohl.

Tese apresentada como requisito
parcial para obtenção do título de
Doutor em Medicina: Ciências
Médicas, da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Programa de Pós-
Graduação em Medicina: Ciências
Médicas.

PORTO ALEGRE

2018

*Dedico esta tese a minha família.
Especialmente aos meus pais e ao meu esposo,
pelo exemplo diário de perseverança e
por sempre acreditarem em meu potencial.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Amilto e Vera, toda minha gratidão pelo incentivo e por toda dedicação em minha formação pessoal e acadêmica.

Ao meu esposo, Rodrigo, pelas palavras de motivação, pelo companheirismo e amor em todos os momentos.

À minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Cristina Karohl, por compartilhar seus conhecimentos e ideias, pela presença constante, pela dedicação incansável, pelas palavras de incentivo e paciência, pelo exemplo de excelente professora e por acreditar no potencial dos probióticos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Francisco Veríssimo Veronese, pelo grande exemplo de pesquisador e professor, pela oportunidade de cursar do doutorado, por toda ajuda e pelo grande crescimento proporcionado.

As colegas do Laboratório de Biologia Molecular aplicado a Nefrologia, do Centro de Pesquisa Experimental, em especial à Djuli Hermes e Milena Artifon pelo tempo, dedicação e parceria.

A todos os participantes do estudo pela disposição.

Ao Serviço de Nefrologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo suporte.

Ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos, do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo auxílio financeiro.

Ao Laboratório Daudt por acreditar no potencial inovador deste estudo e pela doação dos suplementos probióticos.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, por conceder a oportunidade para realização do doutorado.

RESUMO

Introdução: O trato gastrointestinal humano é composto por uma comunidade microbiana diversificada que atua no controle da saúde. Estudos recentes demonstraram que o equilíbrio da microbiota intestinal é afetado na doença renal crônica (DRC), ocasionando o quadro de disbiose intestinal. Estes estudos sugeriram uma associação da disbiose intestinal com complicações metabólicas como acúmulo de toxinas urêmicas, progressão da DRC, inflamação e risco cardiovascular. Diante disso, medidas com o objetivo de restaurar o equilíbrio da microbiota intestinal são sugeridas, tais como a ingestão oral de probióticos, mas poucos estudos têm abordado o efeito destes suplementos na progressão da DRC e no risco cardiovascular destes pacientes.

Objetivo: Avaliar o efeito do consumo de probióticos em fatores associados com progressão da DRC e risco cardiovascular de pacientes com DRC.

Material e métodos: Trata-se de um estudo clínico controlado por placebo registrado no *Clinical Trials* NCT03400228. O estudo incluiu 30 pacientes adultos com DRC nos estágios 3 a 5 não em diálise, com função renal estável e proteinúria igual ou superior a 500 mg. A coleta de dados ocorreu entre novembro de 2015 até dezembro de 2017. O protocolo do estudo constou de período de *washout* de 4 semanas e randomização dos pacientes para o grupo de intervenção (GI, suplemento com probiótico) ou para o grupo controle (GC, maltodextrina). Foi realizada avaliação basal e após 24 semanas de consumo de probiótico ou placebo. Todos os pacientes receberam a orientação de consumir 2 sachês por dia do probiótico ou do placebo (maltodextrina). Foram avaliadas variáveis demográficas, clínicas, nutricionais, hábito intestinal e exames laboratoriais com amostras sanguíneas e urinárias.

Resultados: Dos 30 pacientes incluídos, 20 completaram as 24 semanas do estudo, sendo 10 no grupo intervenção e 10 no grupo placebo. Após o uso de probiótico houve aumento na taxa de filtração glomerular estimada ($p < 0,001$) e diminuição nos níveis séricos de creatinina ($p < 0,001$), ureia ($p = 0,015$), proteína C reativa ($p = 0,03$), hormônio da paratireóide ($p = 0,03$) e potássio ($p = 0,012$), em comparação ao grupo placebo. Os efeitos positivos do probiótico na taxa de filtração glomerular estimada e na diminuição dos níveis séricos de creatinina e ureia permaneceram após análise de regressão multivariada. Não houveram diferenças significativas nos parâmetros urinários entre os grupos. Sintomas de constipação ($p < 0,001$) e consistência fecal ($p = 0,016$) apresentaram melhora no grupo intervenção versus placebo.

Conclusão: A suplementação de probióticos melhorou os marcadores de função renal e reduziu inflamação, além de auxiliar na melhora dos sintomas de constipação intestinal em pacientes com DRC.

Palavras-chave: Doença Renal Crônica, Microbiota intestinal, Disbiose intestinal, Probióticos, Progressão da Doença Renal, Risco Cardiovascular.

ABSTRACT

Introduction: The human gastrointestinal tract is colonized by a diversified microbial community that acts in control of health. Recent studies have shown that intestinal microbiota balance is affected in chronic kidney disease (CKD) leading to intestinal dysbiosis. These studies have suggested association of intestinal dysbiosis with several metabolic disorders such as accumulation of uremic toxins, progression of CKD, inflammation and cardiovascular risk. Therefore, interventional measurement that improve intestinal microbiota balance are suggested such as supplementation of probiotics, however few studies evaluated the effect of these supplements on the progression of CKD and cardiovascular risk in CKD patients.

Aim: The purpose of the study was to evaluate the effects of probiotic supplementation on the factors associated with progression of CKD and cardiovascular risk in patients with CKD.

Desing and Methods: This was a randomized, double-blind, placebo-controlled study. Thirty patients with CKD stages 3 to 5 not on dialysis, with stable renal function and protein-creatinine ratio > 0.50 were included. Data collection was between November 2015 and December 2017. Study protocol was 4-week washout period, patients randomized to intervention group (IG, probiotic supplement) or control group (CG, maltodextrin), and follow for 24 weeks. Renal function, C-reactive protein (CRP), bone and mineral metabolism, nutritional, and lipid profile markers and intestinal habit were measured at baseline and 24 weeks of study.

Results: From 30 patients included in this study, 20 completed the 24 study weeks, 10 in the TG and 10 in PG. After probiotic supplementation, there was increase in estimated glomerular filtration rate ($p<0.001$) and decrease in serum creatinine

($p < 0.001$), urea ($p = 0.015$), C-reactive protein ($p = 0.030$), parathyroid hormone ($p = 0.03$), and potassium ($p = 0.012$) levels compared to CG. The beneficial effects of probiotics on estimated glomerular filtration rate and serum creatinine, urea, and C-reactive protein remained after multivariate linear regression. There were no significant differences in the urinary parameters between the two groups. Symptoms of constipation ($p < 0.001$) and stool consistency ($p = 0.016$) improved in IG compared to CG.

Conclusion: Probiotic supplementation improved markers of renal function and reduced inflammation. In addition, it improved the symptoms of intestinal constipation in patients with CKD.

Keywords: Chronic Kidney Disease; Gut Microbiota; Dysbiosis; Probiotics; Kidney Disease Progression; Cardiovascular Risk.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

DCV – Doença cardiovascular

DM – Diabetes Mellitus

DP – Diálise Peritoneal

DRC – Doença renal crônica

IL – Interleucina

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

SD – *Sprague-Dawley*

TGI – Trato Gastrointestinal

UTO – Unidades Taxonômicas Operacionais

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estratégia de busca de referências bibliográficas.....	16
Tabela 2: Estudos clínicos que avaliaram o uso de probióticos em pacientes com doença renal crônica	27

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Marco conceitual esquemático	31
---	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 MICROBIOTA INTESTINAL	17
2.2 DISBIOSE INTESTINAL	19
2.3 DISBIOSE INTESTINAL NA DOENÇA RENAL CRÔNICA	20
2.4 EFEITOS DOS PROBIÓTICOS NA DOENÇA RENAL CRÔNICA	24
3. MAPA CONCEITUAL	31
4. OBJETIVOS	32
4.1 OBJETIVO PRIMÁRIO	32
4.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS	32
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DA LITERATURA	33
6. ARTIGO EM INGLÊS	43
7. CONCLUSÕES	82
8. PERSPECTIVAS FUTURAS	83
9. ANEXO 1: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	84
ANEXO 2: CONSORT	88

1. INTRODUÇÃO

Os probióticos são definidos como microorganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas podem apresentar benefícios à saúde do hospedeiro (1). Para ser considerado probiótico, o microorganismo deverá apresentar as seguintes características: ser semelhante aos microorganismos humanos, ser resistente ao suco gástrico e à bile, ter capacidade de adesão ao epitélio, ter capacidade de agregação e resistência a lisozima, ser resistente às condições de processamento e armazenamento e ter concentração adequada no momento do consumo (2,3).

A regulamentação brasileira sobre alimentos funcionais e probióticos foi publicada em 2002, pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da Resolução da Diretoria Colegiada nº 2, onde a alegação funcional dos probióticos definida foi “Microorganismo que contribui para o equilíbrio da flora intestinal. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis” (4). Dentre os microorganismos atestados com potencial probiótico pela ANVISA, destacam-se os gêneros de *Lactobacillus* e de *Bifidobacterium* de diversas espécies, sendo também estes os microorganismos mais utilizados em estudos científicos (5).

Os benefícios atribuídos ao consumo regular de probióticos na manutenção ou na reconstituição do equilíbrio da microbiota intestinal têm despertado interesse de pesquisadores em nível mundial. O uso de probióticos mostrou auxiliar na colonização da microbiota intestinal, apresentar efeito imunomodulador (6), regular hábito intestinal com melhora da constipação (7) ou da diarreia (8), reduzir os sintomas de intolerância à lactose (9), além de contribuir no controle dos níveis séricos de colesterol e glicose (10,11).

Deste modo, os benefícios dos probióticos têm chamado a atenção para o potencial do manejo terapêutico da microbiota intestinal. Uma microbiota intestinal em equilíbrio resulta no desempenho normal de importantes funções fisiológicas do hospedeiro. Diversas patologias podem potencialmente afetar o equilíbrio da microbiota intestinal, gerando a chamada disbiose, e esta por sua vez parece estar associada ao agravamento de diversas funções do organismo podendo refletir no agravamento das condições clínicas dos pacientes (12).

Recentes achados sugerem que o equilíbrio da microbiota intestinal é afetado na doença renal crônica (DRC) e poderia contribuir para alterações de metabólitos urêmicos com consequente aumento da creatinina sérica e progressão da DRC (13,14). Até o momento, poucos são os estudos que avaliaram a suplementação de bactérias probióticas em pacientes renais crônicos. Estes estudos avaliando a suplementação de probióticos em pacientes com DRC mostraram uma diminuição do acúmulo de toxinas urêmicas, de marcadores de inflamação e do risco de dislipidemia (15-20).

Considerando que pacientes com DRC apresentam uma tendência para o desenvolvimento de disbiose intestinal, que é sugerido ser de origem multifatorial, tanto secundária às diversas alterações oriundas da perda de função renal e uremia, como pelo uso de múltiplos fármacos e restrições dietéticas (14,21), parece razoável especular que estes pacientes possam se beneficiar de medidas que auxiliem na colonização e no reequilíbrio da microbiota intestinal. Este estudo foi executado com pacientes renais crônicos nos estágios 3 a 5 da DRC e o objetivo foi avaliar o efeito do consumo de probióticos em fatores associados com progressão da DRC e risco cardiovascular.

A estrutura da apresentação da tese segue as normas do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, da Faculdade de Medicina, da Universidade

Federal do Rio Grande do Sul. Esta tese originou um artigo a ser submetido ao *The American Journal of Clinical Nutrition*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

A revisão da literatura para o desenvolvimento desta tese objetivou rastrear todos os estudos que avaliaram o uso de suplementos probióticos (fator em estudo) nos fatores de progressão da DRC e nos parâmetros de uremia. Para tal, utilizou-se as seguintes palavras-chave: “*Chronic Kidney Disease*”, “*Probiotic*”, “*Microbiota*”, “*Chronic Kidney Disease*” and “*Probiotic*” and “*Microbiota*”.

A estratégia de busca da pesquisa em humanos envolveu as seguintes bases de dados: *Medical Literature Analysis and Retrieval System Online* (MEDLINE) através do PubMed, Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS), Embase e Cochrane.

Quanto ao termo “*Chronic Kidney Disease*” até a data de 29 de setembro de 2017 foram encontrados 142015 publicações no PubMed, 3276 na LILACS, 6552 na Embase e 6588 na Cochrane. O resultado da busca com a combinação dos termos “*Chronic Kidney Disease*” and “*Probiotic*” and “*Microbiota*” foi de 29 publicações no PubMed, 46 na LILACS, 4 na Embase e 4 na Cochrane.

Na tabela 1 encontra-se a estratégia de busca das referências bibliográficas nas bases de dados consultadas até a data de 29 de setembro de 2017.

Tabela 1: Estratégia de busca de referências bibliográficas.

PALAVRAS-CHAVE	PUBMED	LILACS	EMBASE	COCHRANE
“ <i>Chronic Kidney Disease</i> ”	142015	3276	6552	6588
“ <i>Probiotic</i> ”	19167	384	15324	2467

“ <i>Microbiota</i> ”	29881	940	21678	1355
“ <i>Chronic Kidney Disease</i> ” and “ <i>Microbiota</i> ”	159	40	7	9
“ <i>Chronic Kidney Disease</i> ” and “ <i>Probiotic</i> ” and “ <i>Microbiota</i> ”	29	46	4	4

Microbiota intestinal

A superfície corporal humana é composta pelas mucosas pulmonar, oral, vaginal e trato gastrointestinal (TGI), e nelas estão presentes aproximadamente 1014 microrganismos, de diferentes tipos, que formam a microbiota. No entanto, a microbiota intestinal detém cerca de 99% dos microrganismos presentes em toda a microbiota. O trato gastrointestinal, especialmente o intestino grosso, é colonizado por trilhões de micróbios. Esta colonização intestinal inicia-se no momento do nascimento e sua configuração modifica-se com o tempo de forma dinâmica, influenciada por diversos fatores como idade, sexo, etnia, dieta, estilo de vida, região geográfica e genética do hospedeiro (22).

A microbiota intestinal em condições saudáveis constitui-se de diferentes espécies de bactérias, sendo *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* as mais prevalentes representando 80% da microbiota, enquanto que a *Escherichia*, *Bacteroides*, *Eubacteria* e *Clostridium* são 20% restantes de bactérias do microbioma intestinal. As principais

características destas bactérias, independentemente do tipo, são sobreviver ao pH ácido do estômago e dos sais biliares presentes no intestino, atingir os locais de ação e não ocasionar nenhum risco ao hospedeiro (23).

A composição da microbiota intestinal apresenta grande impacto na saúde geral, além de exercer diversas funções imunológicas do TGI. Por isso, o equilíbrio do microbioma intestinal é relacionado ao equilíbrio da saúde humana (14). Dentre as influências da microbiota, destacam-se o impacto no estado nutricional, no metabolismo dos carboidratos e proteínas, na degradação de polissacarídeos de plantas não digestíveis, na síntese de vitaminas, na biotransformação de ácidos biliares conjugados, na degradação do oxalato da dieta, e até mesmo no sistema imunológico (24,25).

A perda do equilíbrio da comunidade bacteriana intestinal com alterações quantitativas e qualitativas da composição e atividades metabólicas da microbiota intestinal, muitas vezes associada a um aumento de bactérias patogênicas, é uma condição conhecida como disbiose e pode resultar em efeitos negativos a saúde (26). A disbiose parece estar associada a um maior risco de translocação bacteriana como também a um aumento da fermentação de carboidratos e proteínas, a um desequilíbrio na formação de proteases e ácidos graxos de cadeia curta e na produção aumentada de endotoxinas, sendo sugerido que estas influenciam no desenvolvimento de inflamação, desordens metabólicas e comprometimento do sistema imunológico (27).

Diversos estudos vêm documentando a relação entre a disbiose intestinal e o desenvolvimento de diversas patologias tanto relacionadas ao trato gastrointestinal como de doenças extra-intestinal como obesidade, resistência à insulina e diabetes mellitus (DM), asma, alergias, doença cardiovascular e até mesmo câncer (28-30). Por estas razões, a microbiota intestinal é o microbioma mais investigado e serve de modelo para a compreensão das interações e patologias do hospedeiro-microbiota (31).

2.2. Disbiose intestinal

A disbiose intestinal pode ocorrer por diversos fatores, como exposição a antibióticos, ingestão de bebidas alcoólicas, inatividade física, estresse, predisposição genética, ingestão de alimentos e bebidas com aditivos, determinados componentes dietéticos, algumas patologias e suas possíveis interações (32,33). Cabe salientar que a qualidade da dieta influencia fortemente no desenvolvimento de disbiose, uma dieta rica em lipídios e carboidratos simples reduz espécies bacterianas benéficas e aumenta o crescimento de bactérias potencialmente patogênicas, além de contribuir para a obesidade (34).

Além disto, a microbiota saudável contribui para a regulação da homeostase energética e, na presença de disbiose, podem ocorrer alterações da homeostase relacionadas ao aumento da secreção de toxinas e incretinas, que influenciam no desenvolvimento de resistência à insulina, DM, dislipidemia e obesidade (18). Foi sugerido que este aumento de toxinas também pode contribuir com inflamação e progressão da aterosclerose através do surgimento de lesão endotelial, alteração dos monócitos, macrófagos e células musculares lisas (35).

A disbiose intestinal também tem sido associada com o desenvolvimento de outras patologias, tais como doença cardiovascular (DCV), doença inflamatória intestinal, síndrome do intestino irritável, esteatose hepática e câncer (36-38). A presença de disbiose pode causar modificações na absorção e no armazenamento de nutrientes, especialmente lipídios. Assim como interagir com os “*toll-like receptors*”, que estimulam as células hepáticas a produzir citocinas pró-inflamatórias e participam na patogênese da esteatose hepática (39).

Além destas patologias, a disbiose também é relacionada a DRC, pois a presença de uremia, a dieta restrita em proteínas e fibras e o tratamento farmacológico podem alterar a microbiota intestinal ocasionando acúmulo de toxinas urêmicas. Por sua vez, este acúmulo de toxinas colabora com o desenvolvimento de disbiose (40).

2.3. Disbiose intestinal na doença renal crônica

Apesar do reconhecimento que o intestino, especificamente o microbioma intestinal, possa ser fonte de diversas toxinas urêmicas (41), ainda são poucos os estudos avaliando a flora intestinal na doença renal crônica e a presença de disbiose. Hida e colaboradores (42) avaliaram a flora intestinal de 20 pacientes renais crônicos em hemodiálise e compararam a 20 indivíduos controles saudáveis e observaram diferenças qualitativas e quantitativas entre os grupos. O número de bactérias aeróbicas tais como as enterobactérias (*Escherichia coli* e *Klebsiella*) e os enterococos foram observadas ser aproximadamente 100 vezes maior nos pacientes em HD comparado ao grupo controle.

Em relação as bactérias anaeróbicas, o número de bifidobactérias foi menor enquanto que o de *Clostridium perfringens* significativamente maior nos pacientes em HD. Mais recentemente, Wang e colaboradores (43) avaliaram a flora intestinal de 29 pacientes em diálise peritoneal (DP) e compararam a 41 indivíduos saudáveis usando método de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real. Todas as espécies de bifidobactérias e a bactéria *Klebsiella pneumoniae* foram menos detectadas nos pacientes em DP.

Recentemente, Jiang e colaboradores (44) avaliaram a composição da microbiota fecal de 52 pacientes com DRC estágio não em diálise e compararam com 60 controles saudáveis também usando PCR em tempo real. A quantificação absoluta de bactérias foi

significativamente menor em pacientes com DRC ($p < 0.01$). *Escherichia coli*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides fragilis*, *Enterococcus* spp., *Clostridium coccoides*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia* spp e *Prevotella* foram observadas estarem diminuídas nos pacientes com DRC estágio 5 comparado ao grupo controle.

Um interessante estudo publicado por Vaziri e colaboradores (45) avaliou fezes de 24 pacientes em HD e de 12 indivíduos saudáveis usando análise de filogenética. Eles observaram diferenças em 190 unidades taxonômicas operacionais (UTO) de bactérias entre os grupos de pacientes e controles. Para avaliar o efeito da uremia de outros fatores que poderiam interferir sobre a microbiota intestinal, como dieta, fármacos e comorbidades, eles estudaram um modelo de ratos submetidos a nefrectomia 5/6 por 8 semanas. Eles também observaram uma diferença significativa em 175 UTO de bactérias entre os ratos urêmicos e controles, sugerindo que a uremia altera a composição do microbioma intestinal. Posteriormente, avaliando este mesmo grupo de pacientes e controles, foi demonstrado que pacientes com DRC em HD apresentavam uma expansão significativa de famílias de bactérias produtoras de urease, uricase e enzimas formadores de indoles e p-cresol, e redução de famílias de bactérias protetoras que produzem enzimas formadoras de butirato. Esses dados sugerem que pacientes renais crônicos apresentam uma microbiota intestinal com bactérias que podem contribuir para a toxicidade urêmica e estado pró inflamatório (46).

Vários são os fatores que potencialmente podem causar disbiose intestinal na DRC incluindo a própria perda de função renal e as complicações associadas como acidose metabólica, retenção de toxinas urêmicas, sobrecarga de volume com consequente edema intestinal, assim como o próprio tratamento dietético, farmacológico e presença de comorbidades, fatores que parecem influenciar no equilíbrio da mucosa intestinal (47). Em geral, várias são as modificações dietéticas recomendadas aos

pacientes com DRC com o objetivo de retardar a progressão da perda de função renal e prevenir complicações como hiperfosfatemia e hipercalemia (48). Nos estágios 3 a 5 da DRC, a restrição proteica é preconizada para prevenir progressão da perda de função renal, por outro lado, esta conduta pode ser associada a menor absorção de proteínas e aumento do risco de desnutrição (48). Adicionalmente, a restrição de potássio é importante nos estágios mais avançados da DRC, e a diminuição do consumo de fibras dietéticas, ricas em potássio, resulta no retardo do trânsito intestinal (48). Além disto, a restrição de líquidos nos pacientes em terapia renal substitutiva, polifarmácia, alteração do estilo de vida e a própria uremia predispõe a lentificação do trânsito intestinal contribuindo para constipação e alterações metabólicas (14).

O impacto das alterações da microbiota intestinal observado na DRC parece estar associado com efeitos deletérios aos pacientes e vem progressivamente sendo avaliado pela comunidade científica. É cada vez mais conhecido o fato de que a microbiota intestinal é fonte importante de geração de toxinas urêmicas como, por exemplo, amônia, indóis, fenóis e aminas. Estes metabólitos, normalmente removidos por via renal, acumulam nos pacientes com DRC pela queda da filtração glomerular e por possível aumento na geração intestinal (14,21). Algumas toxinas urêmicas, como o sulfato de p-cresol e de indoxil, são ligadas às proteínas e são depuradas pelos rins, principalmente por secreção tubular, e acumulam na DRC. Estas toxinas são geradas a partir de aminoácidos da dieta pela microbiota intestinal (49). O p-cresol origina da tirosina, enquanto que o indoxil do triptofano. As toxinas urêmicas são associadas com diversas complicações na DRC como mostrado em estudos experimentais e humanos (50). Em modelos animais, diversas alterações foram demonstradas como resistência à insulina, senescência celular prematura, disfunção endotelial, calcificação vascular, aterogênese, hipertrofia cardíaca, ativação do sistema renina-angiotensina, supressão da

proteína klotho, e fibrose intersticial renal (51-57). Em estudos clínicos de pacientes com DRC, o aumento destas toxinas foi associado com progressão da doença renal, inflamação, doença cardiovascular e mortalidade (58-60). Meijers e colaboradores observaram uma correlação positiva entre p-cresol e DCV em pacientes com DRC (61). Similarmente, níveis elevados de indoxil sulfato foi associado com níveis aumentados de interleucina (IL) 6, doença arterial coronariana, lesão vascular e progressão da DRC (58,62-64). Recentemente, Barreto e colaboradores (65) verificaram associação entre os níveis de indoxil sulfato e alterações na histomorfometria óssea de pacientes com DRC pré-dialíticos, e sugeriram que o indoxil sulfato poderia contribuir para o aumento da secreção de paratormônio, seja por aumento da resistência óssea ao paratormônio ou por inibição do calcitriol.

Além da influência da microbiota intestinal nas toxinas urêmicas, a disbiose intestinal poderia contribuir para alterações no intestino favorecendo edema e isquemia intestinal, assim como defeitos na barreira epitelial e aumento da permeabilidade do cólon (66). Em um modelo animal de ratos *Sprague-Dawley* (SD) submetidos a nefrectomia 5/6 (ratos com DRC) ou cirurgia simulada foram seguidos por 8 semanas e os cólons foram removidos para avaliação dos constituintes do complexo das junções de oclusão (*tight junctions*). O grupo de ratos com DRC apresentaram marcada redução na expressão de proteínas da cludina-1, ocludina e ZO-1 na mucosa colônica quando comparado ao grupo controle, sugerindo que a uremia resulta na depleção de proteínas chaves das junções de oclusão da mucosa colônica e poderia, desta forma, ser responsável pelas alterações de função da barreira intestinal (67). Estas alterações de barreira poderiam ser causa de translocação bacteriana e de endotoxinas do intestino (68) assim contribuindo para o estado inflamatório observado em pacientes com DRC, o qual por sua vez pode contribuir para desnutrição e progressão da DRC e DCV (69).

2.4. Efeitos dos probióticos na doença renal crônica

Atualmente medidas de intervenção que objetivam a redução do acúmulo de toxinas, via reequilíbrio do ambiente intestinal, têm se tornado um campo atrativo e de baixo risco na DRC (70). Opções de intervenções incluem dieta com aumento no consumo de fibras e baixa proteína, uso de adsorventes como o AST-120 e o hidrocloreto de sevelamer, e uso de suplementos de prébióticos, simbióticos ou probióticos (71).

Uma potencial intervenção é a administração oral de probióticos que atuam como reconstituintes da microbiota intestinal. Numerosos estudos têm avaliado os efeitos dos probióticos em outras patologias, mas estudos em DRC ainda são limitados. Alguns trabalhos de suplementação de probióticos em pacientes portadores de DRC mostraram aumento de bactérias benéficas no intestino, maior atividade da mucosa intestinal, além de diminuição do acúmulo de toxinas urêmicas, de marcadores inflamatórios e do risco de dislipidemia (15-20,67).

Os primeiros estudos avaliando o efeito do uso de probióticos nas toxinas urêmicas foram realizados em pacientes com DRC em tratamento de hemodiálise em 1996. Simenhoff e colaboradores (72) acompanharam 8 pacientes em hemodiálise que utilizaram *Lactobacillus acidophilus* e observaram diminuição dos níveis séricos da toxina dimetilamina ($p < 0,001$) e do carcinogênico nitrosodimetilamina ($p = 0,01$). Similarmente, outro estudo analisou o impacto de uma combinação de bactérias probióticas incluindo *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium infantis* e *Enterococcus faecalis* em 20 pacientes em hemodiálise (HD) e compararam com grupo controle saudável. Os autores observaram diminuição dos níveis de p-cresol sulfato ($p < 0,005$) em amostras fecais nos pacientes usando este probiótico (42). Takayama e

colaboradores usando o probiótico contendo *Bifidobacterium longum* em 22 pacientes em HD por um período de 5 semanas, demonstraram diminuição significativa dos níveis de indoxil sulfato, outra importante toxina urêmica (73). De forma similar, Taki e colaboradores (15) utilizaram probiótico contendo a mesma bactéria, *Bifidobacterium longum*, em pacientes com DRC em HD por um período de 12 semanas e também verificaram diminuição dos níveis de indoxil sulfato, homocisteína e triglicerídeos. No entanto, em recente estudo duplo cego, cruzado e controlado por placebo, que incluiu 22 pacientes em HD com intervenção probiótica de uma formulação composta de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium longum* ou placebo por 8 semanas, os pacientes após a suplementação apresentaram apenas uma tendência na redução do indoxil glucuronido e da proteína C reativa. A falta de significância foi atribuída ao número pequeno de pacientes incluídos no estudo (74). Recentemente, Borges e colaboradores (20) avaliaram o consumo regular de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium longum* em uma amostra maior de pacientes (46 pacientes em HD) durante 3 meses. Após o uso de probióticos, os pacientes apresentaram redução significativa dos níveis de indoxil sulfato ($p=0,02$), porém foi observado aumento nos níveis de potássio ($p=0,02$) e ureia ($p=0,02$).

O efeito do uso de probióticos também foi avaliado em pacientes com DRC em diálise peritoneal (DP). Wang e colaboradores (19) realizaram um estudo duplo-cego controlado por placebo que incluiu 39 pacientes em DP. A intervenção foi de 6 meses e consistiu na ingestão da combinação de três tipos de culturas probióticas que incluiu *Bifidobacterium bifidum* A218, *Bifidobacterium catenulatum* A302, *Bifidobacterium longum* A101 e *Lactobacillus plantarum* A87. Houve diminuição nos níveis de fator de

necrose tumoral alfa ($p < 0,05$), de interleucina 5 e 6 ($p < 0,05$), além de preservação da função renal residual ($p < 0,05$) após a suplementação comparado a placebo.

Os achados de redução de toxinas urêmicas e de fatores inflamatórios em estudos de pacientes renais crônicos em HD e DP certamente despertam interesse sobre a aplicabilidade dos probióticos em pacientes nos estágios mais precoces da DRC, ainda em tratamento conservador. Ando e colaboradores (75) avaliaram o consumo de *Bifidobacterium longum* em 27 pacientes com DRC nos estágios 3 a 5. Após 6 meses de intervenção, foi observada redução da progressão da DRC em pacientes que tinham níveis basais de creatinina a partir 4,0 mg/dl ($p < 0,005$) ou níveis de fósforo sérico a partir de 4,0 mg/dl ($p < 0,005$).

Nesta linha de pesquisa, em um modelo animal, Ranganathan e colaboradores (76) estudaram 6 grupos de ratos submetidos a nefrectomia 5/6 que receberam diferentes espécies de cultura probiótica por um período de 16 semanas e compararam a um grupo placebo. Ao final da intervenção, os ratos com DRC que consumiram *Bacillus pasteurii*, Sporolac® ou Kibow cocktail apresentaram menor concentração sérica de ureia nitrogenada e de creatinina. Além disso, ratos alimentados com *Bacillus pasteurii* e Sporolac® apresentaram maior sobrevida comparados com o grupo controle e com os outros probióticos. Após esses achados interessantes com os modelos animais, o mesmo grupo de pesquisadores estudaram os efeitos dos probióticos em pacientes com DRC. No primeiro estudo, foi avaliada a combinação de culturas probióticas (*Lactobacillus acidophilus* KB31, *Streptococcus thermophilus* KB27 e *Bifidobacterium longum* KB35) em 13 pacientes nos estágios 3 a 4 de DRC. Houve diminuição de ácido úrico ($p = 0,050$) e do balanço nitrogenado de ureia ($p = 0,002$) após a intervenção de 3 meses, em comparação ao grupo placebo (16). Posteriormente, em um estudo multicêntrico que incluiu 46 pacientes com DRC estágios 3 e 4 e usando a mesma combinação de culturas

probióticas, esses autores observaram que os pacientes que usaram a combinação dos probióticos apresentaram uma redução maior dos níveis séricos de ureia comparado ao grupo placebo (17). Do mesmo modo, Alatríste e colaboradores (18) avaliaram 30 pacientes com DRC nos estágios 3 a 4 que receberam diferentes concentrações do probiótico *Lactobacillus casei shirota* por um período de 8 semanas. O grupo que recebeu uma concentração maior deste probiótico apresentou uma diminuição significativa nos níveis de ureia ($p=0,003$), sugerindo efeito dose-dependente na ação do probiótico.

Apesar do crescente interesse nas alterações da microbiota intestinal e seu possível impacto na saúde dos pacientes com DRC, como mostram os dados apresentados na Tabela 2, ainda são poucos os estudos avaliando o uso de probióticos nesta população, e a maioria deles incluiu uma amostra pequena de pacientes.

Tabela 2 – Estudos clínicos com suplementação de probióticos em pacientes renais.

Autor/ Ano	Delineamento	Número amostral/ Estágio	Intervenção/ Duração	Principais achados da intervenção com probióticos
Simenhoff et al., 1996 (72)	Estudo observacional, em único centro	n=8 HD	<i>Lactobacillus acidophilus</i> 10 ⁹ UFC 1 cápsula/dia Período: 30 a 182 dias	↓ Níveis de Dimetilamina ($p<0,001$) ↓ Níveis de Nitrosodimetilamina ($p=0,010$)
Hida et al., 1996 (42)	Estudo observacional, em único centro	n=20 HD	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	↓ Níveis de p-cresol fecal ($p<0,05$)

			10 ⁸ UFC 2 cápsulas/dia Período: 1 mês	
Ando et al., 2003 (75)	Estudo observacional, em único centro	n=27 DRC em diferentes estágios	<i>Bifidobacterium longum</i> UFC não especificada 1 cápsula/dia Período: 6 meses	Redução da progressão da DRC em pacientes com níveis basais de 4,0mg/dl de creatinina sérica ou de 4,0mg/dL de fósforo sérico (p<0,05)
Takayama et al., 2003 (73)	Estudo clínico não randomizado, controlado por placebo, em único centro	n=22 HD	<i>Bifidobacterium longum</i> (JCM008) 10 ⁹ UFC 3 cápsulas/dia Período: 5 semanas	↓ Níveis de indoxil sulfato (p<0,005)
Taki et al., 2005 (15)	Estudo clínico não randomizado, controlado por placebo, em único centro	n=27 HD	<i>Bifidobacterium longum</i> 10 ⁹ UFC 1 cápsula/dia Período: 3 meses	↓ Níveis de indoxil sulfato (p<0,01) ↓ Níveis de triglicerídeos (p<0,05) ↓ Níveis de homocisteína (p<0,05)
Ranganathan et al., 2009 (76)	Estudo clínico randomizado, duplo cego, com <i>crossover</i> e controlado por placebo, em único centro	n=13 DRC 3-4	<i>Lactobacillus acidophilus</i> KB31, <i>Streptococcus thermophilus</i> KB27, <i>Bifidobacterium longum</i> KB35 10 ¹⁰ UFC	↓ Balanço nitrogenado de ureia (p=0,002) ↓ Níveis de ácido úrico (p=0,050) ↓ Níveis de proteína C reativa (p=0,244) ↑ Escore de qualidade de vida (p<0,05)

			6 cápsulas/dia Período: 3 meses de intervenção + 3 meses de placebo	
Ranganathan et al., 2010 (17)	Estudo clínico randomizado, duplo cego, com <i>crossover</i> e controlado por placebo, multicêntrico	n=46 DRC 3-4	<i>Lactobacillus acidophilus</i> KB27, <i>Streptococcus thermophilus</i> KB19, <i>Bifidobacterium longum</i> KB31 10 ¹⁰ UFC 6 cápsulas/dia Período: 3 meses de intervenção + 3 meses de placebo	↓ Balanço nitrogenado de ureia (p<0,05) ↓ Níveis de ácido úrico (NS) ↓ Níveis de creatinina sérica (NS) ↑ Escore de qualidade de vida (p<0,05)
Alatraste et al., 2014 (18)	Estudo clínico randomizado, controlado por placebo, em um único centro	n=30 DRC 3-4	<i>Lactobacillus casei shirota</i> 10 ⁹ UFC 80 mL leite fermentado /dia Período: 2 meses	↓ Níveis de ureia sérica (p=0,003) ↓ Níveis de creatinina sérica (NS) ↓ TFG estimada (NS)
Natarajan et al., 2014 (74)	Estudo clínico randomizado, duplo cego, com <i>crossover</i> e controlado	n=22 HD	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Bifidobacterium</i>	↓ Níveis de glóbulos vermelhos (NS) ↓ Níveis de proteína C reativa (NS) ↓ Níveis de indoxil

	por placeb, em um único centro		<i>longum</i> 10 ¹⁰ UFC 2 cápsulas /dia Período: 4 meses	sulfato (p=0,058)
Wang et al., 2015 (19)	Estudo clínico randomizado, duplo cego, controlado por placebo, em um único centro	n=39 DP	<i>Bifidobacterium bifidum</i> A218, <i>Bifidobacterium catenulatum</i> A302, <i>Bifidobacterium longum</i> A101, <i>Lactobacillus plantarum</i> A87 10 ⁹ UFC 1 cápsula /dia Período: 6 meses	↓ Níveis de fator de necrose tumoral alfa (p<0,05) ↓ Níveis de interleucina 5 (p<0,05) ↓ Níveis de interleucina 6 (p<0,05) Preservação da função renal residual (p<0,05)
Borges et al., 2017 (20)	Estudo clínico randomizado, duplo cego, controlado por placebo, em um único centro	n=46 HD	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> 10 ⁹ UFC 3 cápsulas /dia Período: 3 meses	↑ Níveis de ureia sérica (p=0,02) ↑ Níveis de potássio sérico (p=0,02) ↓ Níveis de indoxil sulfato (p=0,02)

3. MAPA CONCEITUAL

A microbiota intestinal equilibrada contribui para a manutenção do metabolismo de nutrientes, do sistema imunológico e da excreção de toxinas e metabólitos. No entanto, pacientes com DRC apresentam uma tendência para o desenvolvimento de disbiose intestinal. A disbiose parece ser de origem multifatorial, tanto secundário às diversas alterações oriundas da perda da função renal e consequente uremia, como pelo uso de múltiplos fármacos e modificação da dieta.

Neste contexto, parece razoável especular que pacientes com DRC podem se beneficiar de medidas tais como a suplementação com probióticos, que auxiliem na colonização e no reequilíbrio da microbiota intestinal. No entanto, poucos são os estudos que investigaram a influência do consumo diário de probióticos na microbiota dos pacientes com DRC. Assim, o uso de probióticos pode ser uma medida adicional efetiva e de baixo risco no tratamento da DRC, e mais estudos são claramente necessários para melhor compreensão de sua utilidade (figura 1).

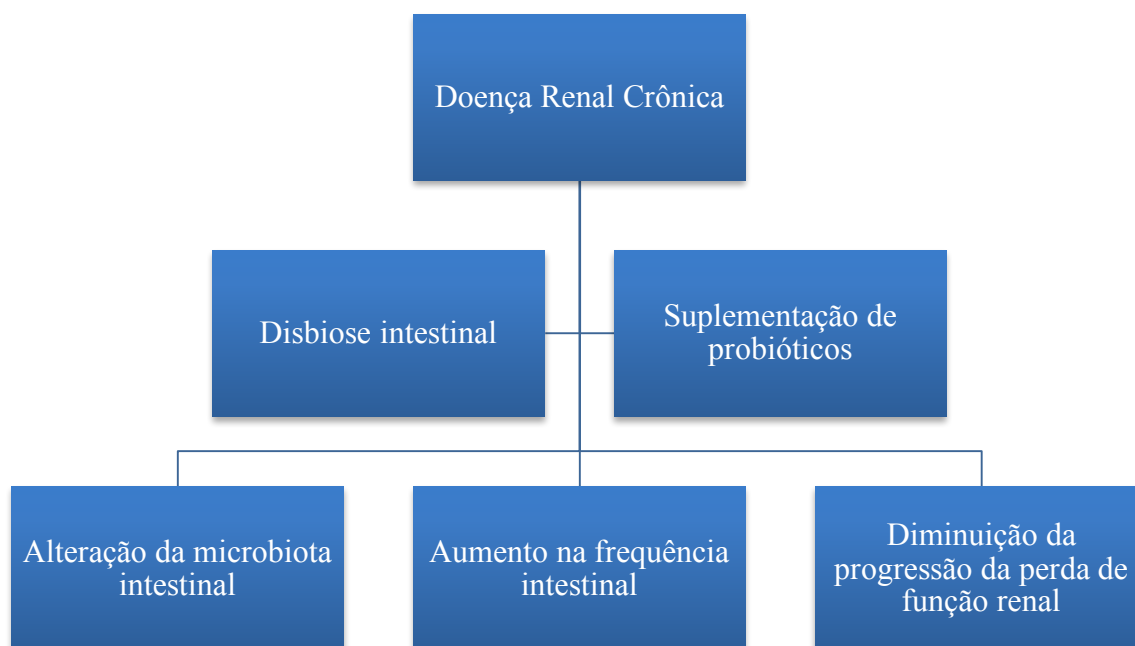


Figura 1 – Marco conceitual esquemático.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO PRIMÁRIO

Avaliar o efeito do consumo de probióticos sobre a proteinúria, função renal e estado inflamatório em pacientes com DRC estágios 3 a 5.

4.2. OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

1. Avaliar o impacto nos parâmetros do metabolismo mineral e ósseo da DRC.
2. Avaliar o efeito do uso de probióticos nos lipídios séricos.
3. Avaliar o impacto do uso de probióticos no hábito intestinal.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DA LITERATURA

1. Food and Agriculture Organization/World Health Organization. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk and live lactic acid bacteria. Cordoba, Argentina: Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report. 2001;1–56.
2. Food and Agriculture Organization: Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Canada: Food and Agriculture Organization. 2002:1–11.
3. Guarner F, Khan AG, Garisch J, Eliakim R, Gangl A, Thomson A, Krabshuis J, Lemair T, Kaufmann P, de Paula JA, Fedorak R, Shanahan F, Sanders ME, Szajewska H, Ramakrishna BS, Karakan T, Kim N; World Gastroenterology Organization. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines: probiotics and prebiotics October 2011. *J Clin Gastroenterol*. 2012;46(6):468-81.
4. Brasil. Resolução RDC nº.2, de 07 de janeiro de 2002. Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF.
5. Brasil. Resolução RDC nº.323, de 10 de novembro de 2003. Regulamento Técnico de registro, alteração e revalidação de registro dos medicamentos probióticos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF.
6. Hegazy AN, West NR, Stubbington MJT, Wendt E, Suijker KIM, Datsi A, This S, Danne C, Champion S, Duncan SH, Owens BM3, Uhlig HH, McMichael A; Oxford IBD Cohort Investigators, Bergthaler A, Teichmann SA, Keshav S, Powrie F. Circulating and Tissue-Resident CD4+ T Cells With Reactivity to Intestinal Microbiota Are Abundant in Healthy

Individuals and Function Is Altered During Inflammation. *Gastroenterology*. 2017;153(5):1320-337.e16.

7. Favretto DC, Pontin B, Moreira TR. Effect of the consumption of a cheese enriched with probiotic organisms (*bifidobacterium lactis* BI-07) in improving symptoms of constipation. *Arq Gastroenterol*. 2013;50(3):196–201.

8. Miller LE, Ouwehand AC. Probiotic supplementation decreases intestinal transit time: Meta-analysis of randomized controlled trials. *World J Gastroenterol*. 2013; 19(29):4718–725.

9. Almeida CC, Lorena SL, Pavan CR, Akasaka HM, Mesquita MA. Beneficial effects of long-term consumption of a probiotic combination of *Lactobacillus casei* Shirota and *Bifidobacterium breve* Yakult may persist after suspension of therapy in lactose-intolerant patients. *Nutr Clin Pract*. 2012;27(2):247-51.

10. Cho YA, Kim J. Effect of Probiotics on Blood Lipid Concentrations: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Medicine*. 2015;94(43): e1714.

11. Rajkumar H, Kumar M, Das N, Kumar SN, Challa HR, Nagpal R. Effect of Probiotic *Lactobacillus salivarius* UBL S22 and Prebiotic Fructo-oligosaccharide on Serum Lipids, Inflammatory Markers, Insulin Sensitivity, and Gut Bacteria in Healthy Young Volunteers: A Randomized Controlled Single-Blind Pilot Study. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2015;20(3):289-98.

12. Mahmoodpoor F, Rahbar Saadat Y, Barzegari A, Ardalan M, Zununi Vahed S. The impact of gut microbiota on kidney function and pathogenesis. *Biomed Pharmacother*. 2017;93:412-19.

13. Vitetta L, Linnane AW, Gobe GC. From the gastrointestinal tract (GIT) to the kidneys: live bacterial cultures (probiotics) mediating reductions of uremic toxin levels via free radical signaling. *Toxins*. 2013;5(11):2042–57.

14. Evenepoel P, Meijers BK, Bammens BR, Verbeke K. Uremic toxins originating from colonic microbial metabolism. *Kidney Int Suppl.* 2009;(114):S12–19.
15. Taki K, Takayama F, Niwa T. Beneficial effects of Bifidobacteria in a gastroresistant seamless capsule on hyperhomocysteinemia in hemodialysis patients. *J Ren Nutr.* 2005;15(1):77-80.
16. Ranganathan N, Friedman EA, Tam P, Rao V, Ranganathan P, Dheer R. 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.* 2009;25(8):1919-30.
17. Ranganathan N, Ranganathan P, Friedman EA, Joseph A, Delano B, Goldfarb DS, Tam P, Rao AV, Anteyi E, Musso CG. Pilot study of probiotic dietary supplementation for promoting healthy kidney function in patients with chronic kidney disease. *Adv Ther.* 2010;27(9):634-47.
18. Alatríste P, Arronte R, Espinosa C, Cuevas M. Effect of probiotics on human blood urea levels in patients with chronic renal failure. *Nutr Hosp.* 2014; 29(3):582–90.
19. Wang IK, Wu YY, Yang YF, Ting IW, Lin CC, Yen TH, Chen JH, Wang CH, Huang CC, Lin HC. The effect of probiotics on serum levels of cytokine and endotoxin in peritoneal dialysis patients: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Benef Microbes.* 2015;6(4):423-30.
20. Borges NA, Carmo FL, Stockler-Pinto MB, de Brito JS, Dolenga CJ, Ferreira DC, Nakao LS, Rosado A, Fouque D, Mafra D. Probiotic Supplementation in Chronic Kidney Disease: A Double-blind, Randomized, Placebo-controlled Trial. *J Ren Nutr.* 2018;28(1):28-36.
21. Poesen R, Meijers B, Evenepoel P. The colon: an overlooked site for therapeutics in dialysis patients. *Semin Dial.* 2013;26(3):323–32.

22. Hooper LV, Littman DR, Macpherson AJ. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*. 2012;336:1268–73.
23. Bäumlér AJ, Sperandio V. Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. *Nature*. 2016;535:85–93.
24. Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(31):11070–5.
25. Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu Rev Nutr*. 2002;22:283–307.
26. Podolsky SH. Metchnikoff and the microbiome. *Lancet*. 2012;380:1810–11.
27. Xiao S, Zhao L. Gut microbiota-based translational biomarkers to prevent metabolic syndrome via nutritional modulation. *FEMS Microbiol Ecol*. 2014;87(2):303–14.
28. Moreno-Indias I, Cardona F, Tinahones FJ, Queipo-Ortuño MI. Impact of the gut microbiota on the development of obesity and type 2 diabetes mellitus. *Front Microbiol*. 2014;29(5):190.
29. Tilg H, Moschen AR. Microbiota and diabetes: an evolving relationship. *Gut*. 2014;63(9):1513–21.
30. Frosali S, Pagliari D, Gambassi G, Landolfi R, Pandolfi F, Cianci R. How the Intricate Interaction among Toll-Like Receptors, Microbiota, and Intestinal Immunity Can Influence Gastrointestinal Pathology. *J Immunol Res*. 2015;2015:489821.
31. D'Angelo C, Reale M, Costantini E. Microbiota and Probiotics in Health and HIV Infection. *Nutrients*. 2017;9(6).
32. Bevins CL, Salzman NH. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nat Rev Microbiol*. 2011;9(5):356–68.
33. Sommer F, Bäckhed F. The gut microbiota--masters of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol*. 2013;11(4):227–38.

34. Daniel H, Moghaddas Gholami A, Berry D, Desmarchelier C, Hahne H, Loh G, Mondot, Lepage P, Rothballer M, Walker A, Böhm C, Wenning M, Wagner M, Blaut M, Schmitt-Kopplin P, Kuster B, Haller D, Clavel T. High-fat diet alters gut microbiota physiology in mice. *ISME J.* 2014;8(2):295–308.
35. Rice JB, Stoll LL, Li WG, Denning GM, Weydert J, Charipar E, Richenbacher WE, Miller FJ Jr, Weintraub NL. Low-level endotoxin induces potent inflammatory activation of human blood vessels: inhibition by statins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(9):1576–82.
36. Duboc H, Rajca S, Rainteau D, Benarous D, Maubert MA, Quervain E, Thomas G, Barbu V, Humbert L, Despras G, Bridonneau C, Dumetz F, Grill JP, Masliah J, Beaugerie L, Cosnes J, Chazouillères O, Poupon R, Wolf C, Mallet JM, Langella P, Trugnan G, Sokol H, Seksik P. Connecting dysbiosis, bile-acid dysmetabolism and gut inflammation in inflammatory bowel diseases. *Gut.* 2013;62(4):531–39.
37. Ley RE. Obesity and the human microbiome. *Curr Opin Gastroenterol.* 2010; 26(1):5–11.
38. Kirk J, Dunker KS. Dietary counseling: the ingredient for successfully addressing the use of herbal supplements and probiotics in chronic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2014; 21(4):377–84.
39. Miura K, Ohnishi H. Role of gut microbiota and Toll-like receptors in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2014;20(23):7381–91.
40. Koppe L, Mafra D, Fouque D. Probiotics and chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2015;88(5):958-66.
41. Meyer TW, Hostetter TH. Uremic solutes from colon microbes. *Kidney Int.* 2012;81(10):949-54.
42. Hida M, Aiba Y, Sawamura S, Suzuki N, Satoh T, Koga Y. 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*.1996;74:349-55.

43. Wang IK, Wu YY, Yang YF, Ting IW, Lin CC, Yen TH, Chen JH, Wang CH, Huang CC, Lin HC. The effect of probiotics on serum levels of cytokine and endotoxin in peritoneal dialysis patients: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Benef Microbes*. 2015;6(4):423-30.

44. Jiang S, Xie S, Lv D, Wang P, He H, Zhang T, Zhou Y, Lin Q, Zhou H, Jiang J, Nie J, Hou F, Chen Y. Alteration of the gut microbiota in Chinese population with chronic kidney disease. *Sci Rep*. 2017;7(1):2870.

45. Vaziri ND, Wong J, Pahl M, Piceno YM, Yuan J, DeSantis TZ, Ni Z, Nguyen TH, Andersen GL. Chronic kidney disease alters intestinal microbial flora. *Kidney Int*. 2013;83(2):308-15.

46. Wong J, Piceno YM, DeSantis TZ, Pahl M, Andersen GL, Vaziri ND. Expansion of urease- and uricase-containing, indole- and p-cresol-forming and contraction of short-chain fatty acid-producing intestinal microbiota in ESRD. *Am J Nephrol*. 2014;39:230-37.

47. Mafra D, Fouque D. Gut microbiota and inflammation in chronic kidney disease patients. *Clin Kidney J*. 2015;8(3):332-4.

48. National Kidney Foundation. K/DOQI Clinical Practice Guidelines. *Am J Kidney Dis*. 2001; 37(1):S1–S104.

49. Liabeuf S, Drüeke TB, Massy ZA. Protein-bound uremic toxins: new insight from clinical studies. *Toxins*. 2011;3(7):911–19.

50. Vanholder R, Schepers E, Pletinck A, Nagler EV, Glorieux G. The uremic toxicity of indoxyl sulfate and p-cresyl sulfate: a systematic review. *J Am Soc Nephrol*. 2014;25:1897-07.

51. Koppe L, Pillon NJ, Vella RE, Croze ML, Pelletier CC, Chambert S, Massy Z, Glorieux G, Vanholder R, Dugenet Y, Soula HA, Fouque D, Soulage CO. p-Cresyl sulphate promotes insulin resistance associated with CKD. *J Am Soc Nephrol.* 2013; 24:88–99.
52. Adijiang A, Shimizu H, Higuchi Y, Nishijima F, Niwa T. Indoxyl sulphate reduces klotho expression and promotes senescence in the kidneys of hypertensive rats. *J Ren Nutr.* 2011;21:105–9.
53. Adijiang A, Niwa T. An oral sorbent, AST-120, increases Klotho expression and inhibits cell senescence in the kidney of uremic rats. *Am J Nephrol.* 2010;31:160–64.
54. Sun CY, Chang SC, Wu MS. Uremic toxins induce kidney fibrosis by activating intrarenal renin-angiotensin-aldosterone system associated epithelial-to-mesenchymal transition. *PLoS One.* 2012; 7: e34026
55. Meijers BK, Van KS, Verbeke K, Dehaen W, Vanrenterghem Y, Hoylaerts MF, Evenepoel P. The uremic retention solute p-cresyl sulphate and markers of endothelial damage. *Am J Kidney Dis.* 2009; 54:891–901.
56. Six I, Gross P, Remond MC, Chillon JM, Poirot S, Drueke TB, Massy ZA. Deleterious vascular effects of indoxyl sulphate and reversal by oral adsorbent AST-120. *Atherosclerosis.* 2015;243:248–56.
57. Niwa T, Shimizu H. Indoxyl sulphate induces nephrovascular senescence. *J Ren Nutr.* 2012;22:102–6.
58. Barreto FC, Barreto DV, Liabeuf S, Meert N, Glorieux G, Temmar M, Choukroun G, Vanholder R, Massy ZA. Serum indoxyl sulphate is associated with vascular disease and mortality in chronic kidney disease patients. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009;4:1551–58.
59. Liabeuf S, Barreto DV, Barreto FC, Meert N, Glorieux G, Schepers E, Temmar M, Choukroun G, Vanholder R, Massy ZA, on behalf of the European Uraemic Toxin Work Group (EUTox). Free p-cresylsulphate is a predictor of mortality in patients at different stages

- of chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;25:1183–91.
60. Niewczas MA, Sirich TL, Mathew AV, Skupien J, Mohny RP, Warram JH, Smiles A, Huang X, Walker W, Byun J, Karoly ED, Kensicki EM, Berry GT, Bonventre JV, Pennathur S, Meyer TW, Krolewski AS. Uremic solutes and risk of end-stage renal disease in type 2 diabetes: metabolomic study. *Kidney Int*. 2014;85:1214–24.
61. Meijers BK, Claes K, Bammens B, de Loor H, Viaene L, Verbeke K, Kuypers D, Vanrenterghem Y, Evenepoel P. p-Cresol and cardiovascular risk in mild-to-moderate kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010;5(7):1182-9.
62. Mozar A, Louvet L, Morlière P, Godin C, Boudot C, Kamel S, Drüeke TB, Massy ZA. Uremic toxin indoxyl sulfate inhibits human vascular smooth muscle cell proliferation. *Ther Apher Dial*. 2011;15(2):135–39.
63. Chiu CA, Lu LF, Yu TH, Hung WC, Chung FM, Tsai IT, Yang CY, Hsu CC, Lu YC, Wang CP, Lee YJ. Increased levels of total P-Cresyl sulphate and indoxyl sulphate are associated with coronary artery disease in patients with diabetic nephropathy. *Rev Diabet Stud*. 2010;7:275–84.
64. Wu IW, Hsu KH, Lee CC, Sun CY, Hsu HJ, Tsai CJ, Tzen CY, Wang YC, Lin CY, Wu MS. P-Cresyl sulphate and indoxyl sulphate predict progression of chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;26:938–47.
65. Barreto FC, Barreto DV, Canziani ME, Tomiyama C, Higa A, Mozar A, Glorieux G, Vanholder R, Massy Z, de Carvalho AB. Association between indoxyl sulfate and bone histomorphometry in pre-dialysis chronic kidney disease patients. *J Bras Nefrol*. 2014;36(3):289–96.
66. Anders HJ, Andersen K, Stecher B. The intestinal microbiota, a leaky gut, and abnormal immunity in kidney disease. *Kidney Int*. 2013;83(6):1010-6.

67. Vaziri ND, Goshtasbi N, Yuan J, Jellbauer S, Moradi H, Raffatellu M, Kalantar-Zadeh K. Uremic plasma impairs barrier function and depletes the tight junction protein constituents of intestinal epithelium. *Am J Nephrol*. 2012;36:438-43.
68. Wang F, Zhang P, Jiang H, Cheng S. Gut bacterial translocation contributes to microinflammation in experimental uremia. *Dig Dis Sci*. 2012;57(11):2856-62.
69. McIntyre CW, Harrison LE, Eldehni MT, Jefferies HJ, Szeto CC, John SG, Sigrist MK, Burton JO, Hothi D, Korsheed S, Owen PJ, Lai KB, Li PK. Circulating endotoxemia: a novel factor in systemic inflammation and cardiovascular disease in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011;6(1):133-41.
70. Lassenius MI, Pietiläinen KH, Kaartinen K, Pussinen PJ, Syrjänen J, Forsblom C, Pörsti I, Rissanen A, Kaprio J, Mustonen J, Groop PH, Lehto M; FinnDiane Study Group. Bacterial endotoxin activity in human serum is associated with dyslipidemia, insulin resistance, obesity, and chronic inflammation. *Diabetes Care*. 2011;34(8):1809-15.
71. Evenepoel P, Poesen R, Meijers B. The gut-kidney axis. *Pediatr Nephrol*. 2017;32:2005-14.
72. Simenhoff ML, Dunn SR, Zollner GP, Fitzpatrick ME, Emery SM, Sandine WE, Ayres JW. 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*. 1996 22(1-3):92-6.
73. 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*. 2003;41(3):S142-5.
74. Natarajan R, Pechenyak B, Vyas U, Ranganathan P, Weinberg A, Liang P, Mallappallil MC, Norin AJ, Friedman EA, Saggi SJ. Randomized controlled trial of strain-specific probiotic formulation (Renadyl) in dialysis patients. *Biomed Res Int*. 2014;2014:568-71.

75. Ando Y, Miyata Y, Tanba K, Saito O, Muto S, Kurosu M, Homma S, Kusano E, Asano Y. Effect of oral intake of an enteric capsule preparation containing *Bifidobacterium longum* on the progression of chronic renal failure. *Nihon Jinzo Gakkai Shi*. 2003;45(8):759-64.
76. Ranganathan N, Patel B, Ranganathan P, Marczely J, Dheer R, Chordia T, Dunn SR, Friedman EA Probiotic amelioration of azotemia in 5/6th nephrectomized Sprague-Dawley rats. *Scientific World Journal*. 2005;5:652–60.

6. ARTIGO ORIGINAL NA LÍNGUA INGLESA

Suplementação de probiótico em marcadores de função renal e inflamação de pacientes com doença renal crônica

(Formatado para submissão à revista *The American Journal of Clinical Nutrition*)

Probiotic supplementation in renal function and inflammation markers in chronic kidney disease patients

Thaís R Moreira, Djuli M Hermes, Milena Artifon, Francisco V Veronose, Cristina Karohl

Graduate Program in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil (TRM, MA, FVV, CK).

Division of Nephrology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil (TRM, DMH, FVV, CK).

Conflict of interest statement: The authors declare no conflicts of interest.

Corresponding author: Cristina Karohl MD, PhD

Address: Division of Nephrology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Ramiro Barcelos Street 2350. Zipcode 90040-003. Porto Alegre/RS, Brazil.

Phone: 55 51 3359-8295

E-mail: ckarohl@hcpa.ufrgs.br

Sources of Support: Research Support Fund of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA). Probiotic supplements were donated by Laboratório Daudt/Brazil.

Short running: Probiotic in chronic kidney disease

Abbreviations:

IECA – Angiotensin converting enzyme inhibitor

ARB – Angiotensin II receptor blocker

CPR – Creatinine Protein Ratio

PCR – Protein Creatinine Ratio

eGFR – Estimate glomerular filtration rate

IG – Intervention group

CG – Control group

PTH – Intact parathyroid hormone

25 (OH) D – 25-hidroxivitamina D

HDL – High Density Lipoprotein

LDL – Low Density Lipoprotein

Clinical Trial Registry number and site: The number of registry is NCT03400228 in Clinical Trials.

ABSTRACT

Background: Chronic kidney disease (CKD) has been associated with an imbalance in the intestinal microbiota that can lead to metabolic complications such as accumulation of uremic toxins and inflammation. Supplementation with probiotics may restore intestinal microbiota balance in CKD, but few studies have addressed the effect of these supplements on the progression of CKD and cardiovascular risk.

Objective: To evaluate the effect of probiotic supplementation on renal function and inflammatory markers in patients with CKD.

Design: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical study included 30 patients with CKD stages 3 to 5, with stable renal function and creatinine protein index ≥ 0.5 . Patients were randomized to receive probiotic supplement (Intervention Group, IG) or placebo (Control Group, CG). Protocol of the study involved washout period for 4 weeks and after intervention or placebo for 24 weeks. Markers of renal function, C-reactive protein (CRP), markers of bone and mineral metabolism, lipid profile and intestinal habit were assessed at baseline and at the end of 24 weeks of the study.

Result: Of the total of 30 patients, 20 completed the 24 study weeks, 10 in the IG and 10 CG. In the GI, it was observed a significant increase in the estimated glomerular filtration rate ($p < 0.001$) and a significant decrease in serum creatinine levels ($p < 0.001$), urea ($p = 0.015$) and C-reactive protein ($p = 0.030$) compared to control group. There were no significant differences in levels of proteinuria, markers of mineral and bone metabolism, as well as lipid profile between groups. Symptoms of constipation ($p < 0.001$) and fecal consistency ($p = 0.016$) showed significant improvement in IG compared to CG.

Conclusions: Probiotic supplementation was associated with improvement in renal function with decrease in urea and creatinine levels and reduction in inflammation suggesting that

probiotics may be an additional alternative in the management of patients with CKD stages 3 to 4. The beneficial effects of probiotics on the progression of CKD and its complications should be evaluated in studies involving a larger number of patients for a longer period.

Keywords: Chronic Kidney Disease, Gut Microbiota, Probiotic Supplementation, Probiotics, Inflammatory Markers, Mineral Metabolism.

INTRODUCTION

Chronic kidney disease (CKD) is considered a public health problem with estimated prevalence ranging from 7% to 15% worldwide [1-3]. CKD is characterized by being progressive and associated with several complications resulting from loss of renal function. Preventive and therapeutic measures are implemented with the objectives of delaying the progression of CKD and avoiding possible complications [4]. Thus, nephroprotection measures are recommended at all stages of treatment including adequate control of blood pressure and proteinuria levels, both independently associated with a more rapid decline in renal function [5]. In addition, prevention and management of risk factors for cardiovascular disease (CVD), anemia, metabolic acidosis and changes in bone and mineral metabolism are recommended and may also influence the progression of CKD [6].

Recently, the intestinal microbiota has attracted the attention of the nephrological community. Normally, the intestinal microbiota is composed of a variety of beneficial as well as pathogenic microorganisms that in equilibrium carry out innumerable metabolic activities, such as impact on nutritional status, carbohydrate and protein metabolism, synthesis of vitamins, in the degradation of dietary oxalate, and even in the immune system (7,8). However, in situations of imbalance, a condition known as dysbiosis, modifications occur in composition of the intestinal microbiota increasing pathogenic bacteria which impacts on intestinal metabolism and health in general [9]. Studies show that intestinal dysbiosis is present in patients with CKD and several factors are associated uremia and dietary and multiple drug approaches that can affect the intestinal microbiota balance [10,11]. In addition, intestinal microbiota is a source of uremic toxin generation which might influence the progression of CKD [12-14], inflammation and CVD [15].

Management of the intestinal environment through probiotic supplementation to restore the intestinal microbiota has become a potential therapeutic intervention [16]. Studies with patients on hemodialysis have addressed the supplementation of probiotics showing reduction of uremic toxins and inflammatory markers [10,11]. However, studies in the early stages of CKD are scarce and little is known whether probiotics can impact on proteinuria and progression of CKD [17]. If the probiotic can induce benefits to this patient population with minimal side effects, this approach may be an interesting adjuvant therapy. In this context, the objective of this study was to evaluate the effect of probiotic consumption on renal function and inflammatory markers in patients with CKD stages 3 to 5.

SUBJECTS AND METHODS

This is a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical study that included 30 adult patients with CKD in stages 3 to 5 not yet on renal replacement therapy, conducted from November 2015 to December 2017. Inclusion criteria were estimated glomerular filtration rate (eGFR) ≤ 59 ml / min / 1.73m² measured according to the Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) [18] equation, age ≥ 18 years, stable renal function, protein/creatinine ratio (PCR) ≥ 0.50 and who agreed to participate in the study. The exclusion criteria were acute illness; use of antibiotics, corticosteroids and immunosuppressants in the last 3 months; active infection; inflammatory bowel or malabsorption diseases; acute or chronic diarrhea; previous bowel surgery; pregnancy and renal replacement therapy or renal transplantation. Patients using supplements or foods containing prebiotics, probiotics or symbiotics were also excluded.

This study was approved by the HCPA Research Ethics Committee (42127714.8.0000.5327) and obtained registration in the Clinical Trials platform

(NCT03400228) and was performed according to the norms established by the Declaration of Helsinki. All participants agreed to participate in the study by signing the informed consent form. The Research Ethics Committee is registered in the Brazilian Human Research Protection Committee of the National Ministry of Health under Institutional Review Board number 00000921.

Protocol

Patients were recruited on outpatient nephrology clinics of HCPA according to the inclusion criteria. All included patients underwent an initial 4-week washout period and subsequently randomized for intervention group (IG) or control group (CG). The randomization phase was performed by external researcher to guarantee blindness. Clinical, laboratory and intestinal assessment were performed at baseline and after 24 weeks of follow-up. To assess adherence of the intervention, patients were asked to bring their envelopes in each monthly visit.

Intervention

IG received a probiotic supplement and CG received placebo. The probiotic supplement used was a combination of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* at the concentration of 2×10^9 colony forming units (CFU), manufactured by Chr Hansen, Denmark. Maltodextrin, a carbohydrate-based food supplement in powder form, is tasteless and similar in appearance to the probiotic supplement and was used as placebo. Patients on each group were instructed to consume 2 sachets of 1 gram diluted in 100 ml of cold water every morning for 24 weeks.

Clinical and laboratory parameters

The following data were collected from each participant through the electronic medical record and by interview: age, sex, ethnicity, systolic and diastolic blood pressure, history of systemic arterial hypertension, diabetes mellitus (DM), and previous cardiovascular events, use of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor or angiotensin receptor blocker (ARB), and physical activity.

Serum and urinary laboratory parameters were evaluated at baseline and after 24 weeks. The laboratory parameters evaluated were creatinine, urea, potassium, calcium, phosphorus, alkaline phosphatase, glucose, total cholesterol, high density lipoprotein (HDL) cholesterol and serum triglycerides (Spectrophotometric, Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland); low-density lipoprotein cholesterol (LDL) [Friedewald equation (19)], intact parathyroid hormone measured by chemiluminescence (Global Siemens Headquarters, Muenchen, Germany), 25-hydroxyvitamin D [25 (OH) D] measured by immunoassayon (LIAISON® auto-analyzer DiaSorinInc, Northwest, MN, USA). C-reactive protein was measured by spectrophotometric (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland). The estimated GFR was calculated by the Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration equation [18]. CKD stages were classified according to Kidney Disease: Improving Global Outcomes [4].

First morning urine sample was collected to measure PCR. Urine of 24 hours was collected for the measurement of total protein, creatinine, urea, calcium, and phosphorus by spectrophotometric (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland) and sodium by ion-selective indirect (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland).

Anthropometric parameters included body weight and height for calculating the body mass index according to the classification of adults (World Health Organization,WHO) and

the elderly (Lipschitz) [20,21]. Body fat distribution was determined by waist circumference (WHO) [22] and waist-to-height ratio [23]. Nutritional status was evaluated using the global subjective assessment adapted to the CKD patient [24].

Bowel habit was determined using the Rome III criteria and the Bristol Scale. Rome III criteria are applied to define chronic functional constipation, characterized by two or more of the following in 25% of bowel movements: bowel movement, granular or hard stools, incomplete evacuation sensation, sensation of anorectal obstruction, use of manual maneuvers for evacuation, and less than three evacuations per week [25]. Bristol Scale was used to help in the description of stool bulk consistency and change of consistency as recommended by Ogawa et al [26,27].

Statistical Analysis

The sample calculation for the study was based on the reduction of indoxyl sulphate from the study by Rossi et al [28] in patients with CKD. The estimated sample size was 24 patients for 80% power, 10% predicted patient loss and 5% significance. Normality of study variables was verified by the Shapiro-WilkKolmogorov-Smirnov test. Results were expressed as mean and standard deviation or median and interquartile according to variable distribution. Qualitative data were expressed as number and percentage. Student's t-test, Mann-Whitney test and Fisher's exact test were used to evaluate the difference between the groups at baseline. To evaluate the difference between probiotic versus placebo, Generalized Estimating Equation (GEE) model was used in combination with a covariance analysis to control for baseline values, considering the delta of the variations to verify differences before and after the use of probiotic or placebo. Multiple linear regression analysis was performed for delta of biochemical parameters, adjusted for group randomization, baseline glomerular filtration rate,

baseline creatinine protein index, antihypertensive use, DM diagnosis, and age. The level of significance was set at $p < 0.05$. Statistical analyzes were performed in the Statistical Package software for the Social Sciences, version 18.0 (Chicago, IL).

RESULTS

Demographic and clinical characteristics

A total of 289 patients were enrolled in this trial, of whom 47 patients presented inclusion and exclusion criteria, and 30 patients accepted to participate in study. Ten patients were dropped out of the study and twenty patients remained for final analysis (10 in the IG and 10 in the CG (**Figure 1**). **Table 1** showed the baseline clinical and demographic characteristics. All patients had history of hypertension, and 16 (80%) were taking ACE inhibitors or ARB. There were no differences between groups at baseline for all assessed demographic and clinical variables ($P > 0.05$).

Figure 1

Table 1

Biochemical parameters of renal function, proteinuria, inflammatory, metabolic and anthropometric at baseline are summarized in **Table 2 and 3**. Although C-reactive protein levels [2.6 (1 to 7.3) vs. 4.2 (1.5 to 22.7), $P = 0.247$] and PCR [0,9 (0,4 to 1.6) vs. 1.8 (0.9 to 2.5), $P = 0.143$] were lower in the IG compared to CG, there were no statistical differences between groups.

Table 2

Table 3

Table 4 shows the effects of probiotic supplementation on biochemical, proteinuria, inflammatory and metabolic parameters. Serum creatinine levels decreased significantly (3.4 ± 0.3 vs. 3.1 ± 0.3 ; $P < 0.001$) and eGFR increased significantly (17.9 ± 2.2 vs. 19.6 ± 2.3 ; $P < 0.001$) in the IG after 24 weeks of probiotic supplementation. In contrast, creatinine and urea serum levels increased in CG (3.5 ± 0.3 vs. 4.2 ± 0.5 ; $P < 0.001$ and 132.9 ± 13.8 vs. 154.3 ± 13.0 ; $P < 0.001$, respectively) and eGFR decreased (17.7 ± 2.9 vs. 15.1 ± 2.8 ; $P < 0.001$) after 24 weeks with placebo. Significant differences between IG and CG were observed for serum creatinine and urea levels as well as for eGFR after 24 weeks of follow-up.

Similarly, levels of the inflammatory marker, C-reactive protein, showed an opposite pattern between groups after probiotic or placebo interventions. C-reactive protein decreased significantly in IG (4.5 ± 1.4 vs. 2.4 ± 0.7 ; $P = 0.008$) and increased in CG (15.4 ± 7.5 vs. 28.3 ± 12.0 ; $P = 0.013$), and a significant statistically difference between groups was observed ($P = 0.004$). In addition, serum potassium levels reduced in the IG and increased in the CG (5.2 ± 0.1 vs. 4.9 ± 0.1 ; $P = 0.006$ and 5.2 ± 0.2 vs. 5.4 ± 0.1 ; $P = 0.002$; respectively; difference between groups $P = 0.012$).

PTH levels increased in CG (276.8 ± 45.0 vs. 351.2 ± 61.5 ; $P = 0.043$) but did not change in the IG. Other bone and mineral metabolism parameters (calcium, phosphorus, and 25(OH)D) did not differ between baseline and 24 weeks follow-up in both groups IG and CG. Although urinary urea increased in the CG, no difference was observed in IG or between groups. Other 24-hour urinary parameters such as proteinuria, calcium, phosphorus and sodium also did not differ between groups after intervention (**Table 5**). Probiotic effects

remained significantly for eGFR ($p<0.001$), serum creatinine ($p<0.001$), urea ($p=0.46$), and C-reactive protein ($p=0.012$) even after adjusted for group randomization, eGFR, PCR, ACE-inhibitor or ARB use, DM, and age (**Table 6**).

Table 4

Table 5

Table 6

Bowel habits and stool characteristics are summarized in **Table 7**. At baseline, 5 patients (50%) of IG presented constipation and after 24 weeks of probiotics all of 10 patients (100%) did not showed constipation symptoms ($p<0.001$). In addition, stool consistency changed in IG compared to CG ($P=0.016$).

Table 7

DISCUSSION

This study demonstrated that the use of probiotic supplements in patients with CKD stages 3 to 5 improved renal function and inflammatory parameters. There was an increase in eGFR and a significant reduction of serum creatinine and urea levels. Additionally, CRP levels decreased significantly with the use of probiotics. As expected, there were improvement in constipation symptoms and stool consistency in patients using probiotics, which demonstrates adherence to the administered supplement.

Nowadays it is recognized a bi-directional relationship between gut and kidney. CKD may cause changes in the composition and function of the intestinal microbiota. Despite the recognition that the intestinal microbiota may be the source of several uremic toxins [29], there are few studies evaluating the intestinal flora in CKD patients and presence of dysbiosis. Hida et al. [10] evaluated the intestinal flora of 20 CKD patients on HD and compared to 20 healthy controls; they observed qualitative and quantitative differences between groups. The number of aerobic bacteria, such as enterobacteria and enterococci, was approximately 100-fold higher in HD patients compared to the control group. In relation to anaerobic bacteria, the number of bifidobacteria was lower while that of *Clostridium perfringens* was significantly higher in the HD patients. Alterations in intestinal microbiota composition have also been demonstrated in patients on peritoneal dialysis [30] and in patients with CKD stage 5 not on dialysis [31]. Moreover, a study by Wong et al. [32] demonstrated an increase of urease-producing bacterias, uricase and indol- and p-cresol-forming enzymes, and reduction of families of bacterias producing butyrate-forming enzymes suggesting that CKD patients have an intestinal microbiota that can contribute to uremic toxicity and inflammatory status. Several factors can potentially cause intestinal dysbiosis in CKD, including uremia and other complications such as metabolic acidosis, retention of uremic toxins, volume overload with consequent intestinal edema, and comorbidities. In addition, dietary approach and pharmacological interventions can also influence the balance of the intestinal mucosa [4,14,33].

Dysbiosis in CKD is associated with generation of uremic toxins and damage of the intestinal mucosa barrier. Thus, interventions that influence the balance of the microbiota as dietary measures, adsorbents, and supplements with prebiotics, probiotics and symbiotics are low risk measures for patients and need to be studied in CKD [34]. Our study demonstrated a reduction in creatinine and urea levels and an increase in eGFR in the group of patients

supplemented with probiotic compared to the control group. Although few studies have evaluated the impact of probiotics on markers of renal function in patients with CKD stages 3 to 5, our results are in agreement with Ando et al. [35]. They observed a reduction in the progression of CKD in patients with baseline serum creatinine levels ≥ 4.0 mg/dL with use of probiotics. Similarly, Wang et al. [30] observed that PD patients supplemented with probiotics had preserved residual renal function. Other studies have also shown reduction in urea levels in patients with CKD stages 3 and 4 [17,36], but not in serum creatinine levels in those patients supplemented with probiotics.

It is interesting to notice that most fecal ammonia originates from the hydrolysis of urea by intestinal bacteria. Increase in serum urea concentration occurs in CKD and therefore higher concentration of ammonia. This higher ammonia generation can promote pH increase in the gastrointestinal tract which promotes aerobic bacteria growth and uremic toxin production. Probiotics containing bifidobacteria promote carbohydrate fermentation and produce acetic and lactic acid acidifying the intestinal mucosa, potentially preventing the growth of aerobic bacteria and possibly of uremic toxins [11,32]. Limited studies have demonstrated reduction of uremic toxins in patients with CKD in HD and PD, and also in the earlier stages of CKD (stages 3 to 5 not on dialysis), with the use of probiotics [37]. Decreased levels of p-cresol sulfate [11] and indoxyl sulfate [14,38,39] were observed in chronic HD patients supplemented with probiotic compounds. Additionally, a study in animal model of rats submitted to 5/6 nephrectomy receiving different species of probiotic culture for 16 weeks showed a lower serum concentration of nitrogenated urea and creatinine. Besides that, rats fed on *Bacillus pasteurii* and Sporolac® showed greater survival compared to the control group [36]. Both p-cresol and indoxyl sulfate are cleared by the kidneys, mainly by tubular secretion, and are shown to accumulate in CKD [12]. It has been demonstrated that these uremic toxins are associated with various complications in CKD as shown in experimental

and human studies [40]. In animal models, several alterations have been demonstrated, such as insulin resistance, premature cellular senescence, endothelial dysfunction, vascular calcification, cardiac hypertrophy, renin-angiotensin system activation, klotho suppression, and renal interstitial fibrosis [41-47]. In clinical studies of patients with CKD, the increase of these toxins has been associated with progression of renal disease, inflammation, cardiovascular disease and mortality [48-54]. Although the levels of p-cresol and indoxyl sulfate in our study were not evaluated, the observation of reduction of urea levels and increasing eGFR can reflect a reduction of uremic toxins explaining the improvement of renal function in patients supplemented with probiotics.

Probiotic supplementation has been associated with the reduction of the inflammatory status commonly found in CKD. Inflammation contributes to malnutrition and progression of renal disease and CVD in CKD patients [55]. Uremic toxins can induce proinflammatory responses, leukocyte stimulation, and endothelial dysfunction [26,38]. In addition, disruption of integrity of the intestinal epithelium and intestinal ischemia can lead to increased colon permeability in CKD [56,57]. This barrier changes could favor intestinal bacterial and endotoxin translocation [58] and also contribute to the inflammatory state observed in patients with CKD. Furthermore, ammonia and ammonium hydroxide produced by hydrolysis of urea in the intestine are also suggested as causative factors of systemic inflammation in CKD [11,32,57]. Our study showed a significant reduction in CRP levels, a marker of the inflammatory state, in accordance with other studies [37]. However, this finding was not observed in other studies [59,60]. These opposite results can be explained by heterogeneity of the studies, different stages of CKD, dialysis treatment, type and composition of probiotics, duration of intervention, among others.

Bone and mineral metabolism disorder (BMD) was also evaluated in our study. BMD in CKD patients is associated with higher risk of CVD, vascular calcification and mortality [61].

Studies have demonstrated an increased concentration of indoxyl-sulfate showing negative effects on bone formation [62,63]. Recently, Barreto et al. [48] reported an association between indoxyl-sulfate levels and changes in bone histomorphometry in patients with CKD suggesting that this uremic toxin might contribute to bone resistance to parathyroid hormone action or inhibition of calcitriol. Nonetheless, the use of probiotics in our study showed no changes in serum calcium, phosphorus, parathyroid hormone and 25(OH)D levels after probiotic supplementation.

This study has several limitations, such as the limited sample size and the short treatment duration. However, the study could show improvement in renal function and inflammatory parameters. Reduction in creatinine levels may have led to an increase in eGFR and not represent a real impact on renal function. Studies using methods that measure GFR should be done to accurately determine the change of renal function with probiotic supplementation. Another limitation could be the adherence to consume probiotics or placebo. However, we controlled patient adherence by counting empty packets in monthly visits. In addition, we showed an improvement in the symptoms of constipation and stool consistency in patients who consumed probiotics which not occurred in control group. This fact can corroborate adherence to the supplement. Regarding the safety of probiotic used, no patient presented any side effect.

In summary, the supplementation of probiotic based on *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in CKD stage 3 to 5 patients showed beneficial effects on renal and inflammatory parameters. Further studies are needed including a larger sample and longer follow-up time to better evaluate the impact of this intervention in CKD.

ACKNOWLEDGEMENTS

The financial support received from Research Support Fund of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre and probiotic supplements donated by Laboratório Daudt/Brazil.

REFERENCES

1. Hwang SJ, Tsai JC, Chen HC. Epidemiology, impact and preventive care of chronic kidney disease in Taiwan. *Nephrology* 2010; 15(2):3–9.
2. Coresh J, Selvin E, Stevens LA, Manzi J, Kusek JW, Eggers P, et al. Prevalence of chronic kidney disease in the United States. *JAMA* 2007; 298(17):2038–47.
3. Piccolli AP, Nascimento MMD, Riella MC3. Prevalence of chronic kidney disease in a population in southern Brazil (Pro-Renal Study). *J Bras Nefrol.* 2017; 39(4):384-390.
4. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl* 2013; 3: 1–150.
5. Carville S, Wonderling D, Stevens P; Guideline Development Group. Early identification and management of chronic kidney disease in adults: summary of updated NICE guidance. *BMJ* 2014; 349:g4507.
6. Pan BL, Loke SS. Chronic kidney disease associated with decreased bone mineral density, uric acid and metabolic syndrome. *PLoS One* 2018; 13(1):e0190985.
7. Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(31):11070–5.
8. Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu Rev Nutr.* 2002;22:283-307.
9. Pan W, Kang Y. Gut microbiota and chronic kidney disease: implications for novel mechanistic insights and therapeutic strategies. *Int Urol Nephrol* 2017. [Epub ahead of print]
10. Hida M, Aiba Y, Sawamura S, Suzuki N, Satoh T, Koga Y. 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*.1996;74:349-55.

11. Vaziri ND, Wong J, Pahl M, Piceno YM, Yuan J, DeSantis TZ, Ni Z, Nguyen TH, Andersen GL. Chronic kidney disease alters intestinal microbial flora. *Kidney Int*. 2013;83(2):308-15.

12. Liabeuf S, Drüeke TB, Massy ZA. Protein-bound uremic toxins: new insight from clinical studies. *Toxins* 2011; 3(7):911–919.

13. Rossi M, Johnson DW, Morrison M, Pascoe EM, Coombes JS, Forbes JM, Szeto CC, McWhinney BC, Ungerer JP, Campbell KL. Synbiotics Easing Renal Failure by Improving Gut Microbiology (SYNERGY): A Randomized Trial. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2016;11(2):223-31.

14. Borges NA, Carmo FL, Stockler-Pinto MB, de Brito JS, Dolenga CJ, Ferreira DC, Nakao LS, Rosado A, Fouque D, Mafra D. Probiotic Supplementation in Chronic Kidney Disease: A Double-blind, Randomized, Placebo-controlled Trial. *J Ren Nutr* 2018;28(1):28-36.

15. Meijers BK, Claes K, Bammens B, de Loor H, Viaene L, Verbeke K, et al. p-Cresol and cardiovascular risk in mild-to-moderate kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010; 5(7):1182–1189.

16. Schepers E, Glorieux G, Vanholder R. The gut: the forgotten organ in uremia? *Blood Purif* 2010;29(2):130–6.

17. Miranda Alatraste PV, Urbina Arronte R, Gomez Espinosa CO, Espinosa Cuevas Mde L. Effect of probiotics on human blood urea levels in patients with chronic renal failure. *Nutr Hosp* 2014;29:582-590.

18. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF, Feldman HI, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 2009; 150(9):604–12.

19. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499-502.
20. World Health Organization (WHO). Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation. WHO Technical Report Series 894. Geneva: World Health Organization, 2000.
21. Lipschitz DA. Screening for nutritional status in the elderly. *Prim Care* 1994;21(1):55-67.
22. Third Report of Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) 2000. NIH publication n. 01-3670.
23. Ashwell M, Hsieh SD. Six reasons why the waist-to-height ratio is a rapid and effective global indicator for health risks of obesity and how its use could simplify the international public health message on obesity. *Int J Food Sci Nutr* 2005;56(5):303–307.
24. Kalantar-Zadeh K, Kleiner M, Dunne E, Lee GH, Luft FC. A modified quantitative subjective global assessment of nutrition for dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14(7):1732–1738.
25. Longstreth GF, Thompson WG, Chey WD, Houghton LA, Mearin F, Spiller RC. Functional bowel disorders. *Gastroenterology* 2006;130(5):1480–1491.
26. Lewis SJ, Heaton KW. Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time. *Scand J Gastroenterol* 1997;32(9):920–924.
27. Ogawa T, Shimada M, Nagano N, Ito K, Ando T, Shimomura Y, Ando Y, Otsuka K. Oral administration of *Bifidobacterium longum* in a gastro-resistant seamless capsule decreases serum phosphate levels in patients receiving haemodialysis. *Clin Kidney J* 2012;5(4):373-4.
28. Rossi M, Johnson DW, Morrison M, Pascoe E, Coombes JS, Forbes JM, McWhinney BC, Ungerer JP, Dimeski G, Campbell KL. SYNbiotics Easing Renal failure by improving Gut

microbiologY (SYNERGY): a protocol of placebo-controlled randomised cross-over trial. *BMC Nephrol* 2014;15:106.

29. Meyer TW, Hostetter TH. Uremic solutes from colon microbes. *Kidney Int.* 2012;81(10):949-54.

30. Wang IK, Wu YY, Yang YF, Ting IW, Lin CC, Yen TH, Chen JH, Wang CH, Huang CC, Lin HC. The effect of probiotics on serum levels of cytokine and endotoxin in peritoneal dialysis patients: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Benef Microbes.* 2015;6(4):423-30.

31. Jiang S, Xie S, Lv D, Wang P, He H, Zhang T, Zhou Y, Lin Q, Zhou H, Jiang J, Nie J, Hou F, Chen Y. Alteration of the gut microbiota in Chinese population with chronic kidney disease. *Sci Rep.* 2017;7(1):2870.

32. Wong J, Piceno YM, Desantis TZ, Pahl M, Andersen GL, Vaziri ND. Expansion of urease- and uricase-containing, indole- and p-cresol-forming and contraction of short-chain fatty acid-producing intestinal microbiota in ESRD. *Am J Nephrol* 2014;39:230-7.

33. Mafra D, Fouque D. Gut microbiota and inflammation in chronic kidney disease patients. *Clin Kidney J.* 2015;8(3):332-4.

34. Di Iorio BR, Marzocco S, Nardone L, Sirico M, De Simone E, Di Natale G, Di Micco L. Urea and impairment of the Gut-Kidney axis in Chronic Kidney Disease. *G Ital Nefrol* 2017;5:34.

35. Ando Y, Miyata Y, Tanba K, Saito O, Muto S, Kurosu M, Homma S, Kusano E, Asano Y. Effect of oral intake of an enteric capsule preparation containing *Bifidobacterium longum* on the progression of chronic renal failure. *Nihon Jinzo Gakkai Shi.* 2003;45(8):759-64.

36. Ranganathan N, Ranganathan P, Friedman EA, Joseph A, Delano B, Goldfarb DS, Tam P, Rao AV, Anteyi E, Musso CG. Pilot study of probiotic dietary supplementation for promoting

healthy kidney function in patients with chronic kidney disease. *Adv Ther.* 2010;27(9):634-47.

37. Simenhoff ML, Dunn SR, Zollner GP, Fitzpatrick ME, Emery SM, Sandine WE, Ayres JW. 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.* 1996 22(1-3):92–6.

38. 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* 2003;41(3):S142-5.

39. Taki K, Takayama F, Niwa T. Beneficial effects of Bifidobacteria in a gastroresistant seamless capsule on hyperhomocysteinemia in hemodialysis patients. *J Ren Nutr* 2005;15(1):77-80.

40. Vanholder R, Schepers E, Pletinck A, Nagler EV, Glorieux G. The uremic toxicity of indoxyl sulfate and p-cresyl sulfate: a systematic review. *J Am Soc Nephrol.* 2014;25:1897-07.

41. Koppe L, Pillon NJ, Vella RE, Croze ML, Pelletier CC, Chambert S, Massy Z, Glorieux G, Vanholder R, Dugenet Y, Soula HA, Fouque D, Soulage CO. p-Cresyl sulphate promotes insulin resistance associated with CKD. *J Am Soc Nephrol.* 2013; 24:88–99.

42. Adijiang A, Shimizu H, Higuchi Y, Nishijima F, Niwa T. Indoxyl sulphate reduces klotho expression and promotes senescence in the kidneys of hypertensive rats. *J Ren Nutr.* 2011;21:105–9.

43. Adijiang A, Niwa T. An oral sorbent, AST-120, increases Klotho expression and inhibits cell senescence in the kidney of uremic rats. *Am J Nephrol.* 2010;31:160–64. 44. Sun CY, Chang SC, Wu MS. Uremic toxins induce kidney fibrosis by activating intrarenal renin-

angiotensin-aldosterone system associated epithelial-to-mesenchymal transition. *PLoS One*. 2012; 7: e34026 52.

45. Meijers BK, Van KS, Verbeke K, Dehaen W, Vanrenterghem Y, Hoylaerts MF, Evenepoel P. The uremic retention solute p-cresyl sulphate and markers of endothelial damage. *Am J Kidney Dis*. 2009; 54:891–901.

46. Six I, Gross P, Remond MC, Chillon JM, Poirot S, Drueke TB, Massy ZA. Deleterious vascular effects of indoxyl sulphate and reversal by oral adsorbent AST-120. *Atherosclerosis*. 2015;243:248–56.

47. Niwa T, Shimizu H. Indoxyl sulphate induces nephrovascular senescence. *J Ren Nutr*. 2012;22:102–6.

48. Barreto FC, Barreto DV, Liabeuf S, Meert N, Glorieux G, Temmar M, Choukroun G, Vanholder R, Massy ZA. Serum indoxyl sulphate is associated with vascular disease and mortality in chronic kidney disease patients. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009;4:1551–58.

49. Liabeuf S, Barreto DV, Barreto FC, Meert N, Glorieux G, Schepers E, Temmar M, Choukroun G, Vanholder R, Massy ZA, on behalf of the European Uraemic Toxin Work Group (EUTox). Free p-cresylsulphate is a predictor of mortality in patients at different stages of chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;25:1183–91. 50. Niewczas MA, Sirich TL, Mathew AV, Skupien J, Mohny RP, Warram JH, Smiles A, Huang X, Walker W, Byun J, Karoly ED, Kensicki EM, Berry GT, Bonventre JV, Pennathur S, Meyer TW, Krolewski AS. Uremic solutes and risk of end-stage renal disease in type 2 diabetes: metabolomic study. *Kidney Int*. 2014;85:1214–24.

51. Meijers BK, Claes K, Bammens B, de Loor H, Viaene L, Verbeke K, Kuypers D, Vanrenterghem Y, Evenepoel P. p-Cresol and cardiovascular risk in mild-to-moderate kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010;5(7):1182-9.

52. Mozar A, Louvet L, Morlière P, Godin C, Boudot C, Kamel S, Drüeke TB, Massy ZA. Uremic toxin indoxyl sulfate inhibits human vascular smooth muscle cell proliferation. *Ther Apher Dial*. 2011;15(2):135–39.
53. Chiu CA, Lu LF, Yu TH, Hung WC, Chung FM, Tsai IT, Yang CY, Hsu CC, Lu YC, Wang CP, Lee YJ. Increased levels of total P-Cresyl sulphate and indoxyl sulphate are associated with coronary artery disease in patients with diabetic nephropathy. *Rev Diabet Stud*. 2010;7:275–84.
54. Wu IW, Hsu KH, Lee CC, Sun CY, Hsu HJ, Tsai CJ, Tzen CY, Wang YC, Lin CY, Wu MS. P-Cresyl sulphate and indoxyl sulphate predict progression of chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;26:938–47.
55. McIntyre CW, Harrison LE, Eldehni MT, Jefferies HJ, Szeto CC, John SG, Sigrist MK, Burton JO, Hothi D, Korsheed S, Owen PJ, Lai KB, Li PK. Circulating endotoxemia: a novel factor in systemic inflammation and cardiovascular disease in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011;6(1):133–41.
56. Anders HJ, Andersen K, Stecher B. The intestinal microbiota, a leaky gut, and abnormal immunity in kidney disease. *Kidney Int*. 2013;83(6):1010-6.
57. Vaziri ND, Goshtasbi N, Yuan J, Jellbauer S, Moradi H, Raffatellu M, Kalantar-Zadeh K. Uremic plasma impairs barrier function and depletes the tight junction protein constituents of intestinal epithelium. *Am J Nephrol*. 2012;36:438-43.
58. Wang F, Zhang P, Jiang H, Cheng S. Gut bacterial translocation contributes to microinflammation in experimental uremia. *Dig Dis Sci*. 2012;57(11):2856-62.
59. Natarajan R, Pechenyak B, Vyas U, Ranganathan P, Weinberg A, Liang P, Mallappallil MC, Norin AJ, Friedman EA, Saggi SJ. Randomized controlled trial of strain-specific probiotic formulation (Renady1) in dialysis patients. *Biomed Res Int* 2014;2014:568-71.

60. Ranganathan N, Friedman EA, Tam P, Rao V, Ranganathan P, Dheer R. 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.* 2009 Aug;25(8):1919-30.
61. Kunc M, Gabrych A, Witkowski JM. Microbiome impact on metabolism and function of sex, thyroid, growth and parathyroid hormones. *Acta Biochim Pol* 2016;63(2):189-201.
62. Cigarran Guldris S, González Parra E, Cases Amenós A. Gut microbiota in chronic kidney disease. *Nefrologia* 2017;37(1):9-19.
63. Hirata J, Hirai K, Asai H, Matsumoto C, Inada M, Miyaura C, Yamato H, Watanabe-Akanuma M. Indoxyl sulfate exacerbates low bone turnover induced by parathyroidectomy in young adult rats. *Bone* 2015;79:252-258.

FIGURES AND TABLES

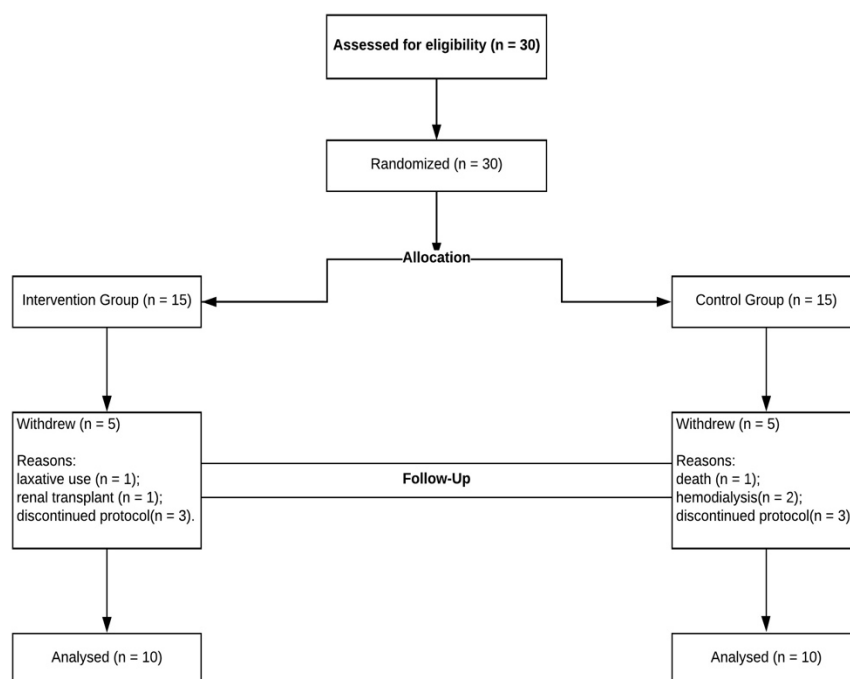


Figure 1 – Flow chart of the study.

Table 1 – Baseline clinical and demographic characteristics in intervention and control groups.

Patients characteristics	Intervention Group (n = 10)	Control Group (n = 10)	<i>P</i> -value
Age	62.8 ± 9.0	62.4 ± 10.2	0.927
Gender			1.000
Male	5 (50%)	5 (50%)	
Female	5 (50%)	5 (50%)	
Ethnicity			1.000
Black/Brow	4 (40%)	4 (40%)	
White	6 (60%)	6 (60%)	
Diabetes Mellitus			0.650
Yes	5 (50%)	7 (70%)	
No	5 (50%)	3 (30%)	
History of cardiovascular event			1.000
Yes	4 (40%)	4 (40%)	
No	6 (60%)	6 (60%)	
Systolic blood pressure	133 ± 17	140 ± 20	0.652
Diastolic blood pressure	84 ± 11	82 ± 13	0.366
ACE/ARB use			0.303
Yes	9 (90%)	6 (60%)	
No	1 (10%)	4 (40%)	
Physical activity			0.211
Sedentary	7 (70%)	10 (100%)	
Active	3 (30%)	0 (0%)	

CKD stage			0.249
3	1 (10%)	1 (10%)	
4	6 (60%)	2 (20%)	
5	3 (30%)	7 (70%)	

Abbreviations: ACE = angiotensin-converting enzyme inhibitors; ARB = angiotensin II receptor blocker; CKD = chronic kidney disease.

Table 2 – Baseline biochemical parameters in intervention and control groups.

Parameters	Intervention Group (n = 10)	Control Group (n = 10)	<i>P</i> -value
Creatinine (mg/dL)	3.4 ± 0.9	3.5 ± 1.2	0.789
Urea (mg/dL)	132.9 ± 45.4	132.9 ± 46.2	1.000
eGFR (mL/min/1.73m ²)	16.5 [10.7 to 23.2]	13.0 [12.0 to 23.2]	0.796
PCR	0.99 [0.43 to 1.66]	1.81 [0.87 to 2.46]	0.143
Potassium (mg/dL)	5.2 ± 0.4	5.2 ± 0.5	0.929
Calcium (mg/dL)	9.2 ± 0.7	9.0 ± 0.4	0.512
Phosphorus (mg/dL)	4.1 ± 1.0	4.0 ± 0.7	0.862
Alkaline phosphatase (U/L)	88.5 [65.7 to 120.0]	73.5 [66.7 to 90.7]	0.315
25(OH)D (ng/mL)	29.3 [26.2 to 33.1]	28.6 [21.5 to 34.1]	0.796
PTH (pg/mL)	215 [139 to 474]	269 [148 to 338]	0.912
C-reactive protein (mg/dL)	2.6 [1.0 to 7.3]	4.2 [1.5 to 22.7]	0.247
Glucose (mg/dL)	123 [101 to 148]	102 [88 to 137]	0.353
Total cholesterol (mg/dL)	164 [133 to 187]	154 [136 to 222]	0.684
HDL cholesterol (mg/dL)	40.5 ± 8.7	44.7 ± 11.3	0.366
LDL cholesterol (mg/dL)	92 [68 to 106]	83 [59 to 102]	0.579
Triglyceride (mg/dL)	152 [112 to 173]	118 [107 to 138]	0.143

Abbreviations: 25(OH)D = 25-hidroxivitamina D; eGFR = estimate glomerular filtration rate; PCR = urinary protein-creatinine ratio; PTH = Intact parathyroid hormone; HDL = High Density Lipoprotein; LDL = Low Density Lipoprotein.

Table 3 – Baseline anthropometric parameters in intervention and control groups

Parameters	Intervention Group (n = 10)	Control Group (n = 10)	<i>P</i> -value
BMI (kg/m ²)	30.9 ± 7.6	28.0 ± 14.8	0.328
BMI Classification			0.494
Eutrophy	3 (30%)	2 (20%)	
Overweight/Obesity	7 (70%)	8 (80%)	
WC (cm)	101.0 ± 12.7	98.4 ± 11.8	0.642
WC Classification			0.322
No risk	3 (30%)	1 (10%)	
High risk	0 (0%)	2 (20%)	
Very high risk	7 (70%)	7 (70%)	
WHR (cm)	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.612
WHR Classification			1.000
No adiposity	1 (10%)	1 (10%)	
With adiposity	9 (90%)	9 (90%)	
SGA Classification			1.000
No risk	6 (60%)	7 (70%)	
Nutritional risk	4 (40%)	3 (30%)	

Abbreviations: BMI = body mass index; SGA = subjective global assessment; WC = waist circumference; WHR = waist height ratio.

Table 4 – Effects of probiotic supplementation or placebo on renal function, inflammatory and metabolic parameters.

Parameters	Intervention Group (n = 10)				Control Group (n = 10)				<i>P</i> -value groups	<i>P</i> -value ANCOVA
	Baseline	After	Δ	<i>P</i> -value	Baseline	After	Δ	<i>P</i> -value		
eGFR(mL/min/1,73m ²)	17.9 ± 2.2	19.6 ± 2.3	1.7 (1.0; 2.4)	<0.001	17.7 ± 2.9	15.1 ± 2.8	-2.6 (-3.5; 1.7)	<0.001	<0.001	<0.001
Creatinine (mg/dL)	3.4 ± 0.3	3.1 ± 0.3	-0.3 (- 0.5; - 0.1)	<0.001	3.5 ± 0.3	4.2 ± 0.5	0.7 (0.3; 1.0)	<0.001	<0.001	<0.001
Urea (mg/dL)	132.9 ± 13.6	128.0 ± 12.7	-4.9(- 20.8; - 10.9)	0.546	132.9 ± 13.8	154.3 ± 13.0	21.4 (11.3; 31.5)	<0.001	0.006	0.015
PCR	1.1 ± 0.2	1.2 ± 0.2	0.1(- 0.04; 0.4)	0.124	2.2 ± 0.7	2.2 ± 0.6	-0.02(-0.8; 0.8)	0.957	0.136	0.675
C-reactive protein (mg/L)	4.5 ± 1.4	2.4 ± 0.7	-2.1 (-	0.008	15.4 ± 7.5	28.3 ± 12.0	12.9 (2.7;	0.013	0.004	0.030

			3.7; - 0.5)				23.1)			
Potassium (mg/dL)	5.2 ± 0.1	4.9 ± 0.1	-0.3 (- 0.5; - 0.1)	0.006	5.2 ± 0.2	5.4 ± 0.1	0.2 (-0.1; 0.6)	0.189	0.002	0.012
Phosphorus (mg/dL)	4.1 ± 0.3	4.1 ± 0.2	0.1 (- 0.3; 0.4)	0.743	4.0 ± 0.2	4.4 ± 0.2	0.4 (-0.2; 0.9)	0.061	0.207	0.223
Calcium (mg/dL)	9.2 ± 0.2	9.3 ± 0.1	0.1 (- 0.3; 0.6)	0.600	9.0 ± 0.1	9.1 ± 0.2	0.1 (-0.3; 0.5)	0.688	0.923	0.483
25(OH)D (ng/mL)	29.4 ± 1.3	27.9 ± 2.1	-1.5 (- 5.8; 2.9)	0.513	27.1 ± 3.2	23.4 ± 3.1	-3.7 (-7.9; 0.5)	0.084	0.469	0.359
PTH (pg/mL)	319.8 ± 87.2	258.3 ± 77.3	-61.4 (- 136.7; 13.8)	0.110	276.8 ± 45.0	351.2 ± 61.5	74.4 (2.4; 146.4)	0.043	0.011	0.033

Alkaline phosphatase (U/L)	98.2 ± 14.3	85.9 ± 11.7	-12.2 (- 25.6; 1.1)	0.072	75.7 ± 4.5	80.0 ± 6.1	4.32 (-2.8; 11.5)	0.236	0.032	0.172
Glucose (mg/dL)	124.1 ± 10.4	105.8 ± 7.7	-18.2 (- 31.9; - 4.6)	0.009	130.6 ± 25.9	152.1 ± 23.2	21.5 (-15.6; 58.6)	0.256	0.049	0.037
Total cholesterol (mg/dL)	157.5 ± 9.6	156.9 ± 5.8	-0.5 (- 20.6; 19.5)	0.957	181.1 ± 18.5	173.0 ± 10.6	-8.1 (-40.0; 23.8)	0.619	0.695	0.412
HDL cholesterol (mg/dL)	40.5 ± 2.6	46.6 ± 3.3	6.1 (2.1; 10.0)	0.003	44.7 ± 3.4	44.4 ± 4.8	-0.3 (-7.2; 6.6)	0.928	0.115	0.181
LDL cholesterol (mg/dL)	88.0 ± 6.7	83.5 ± 5.8	-4.5 (- 22.7; 13.7)	0.627	88.6 ± 11.5	93.3 ± 9.2	4.8 (-3.4; 12.9)	0.251	0.361	0,294
Triglyceride (mg/dL)	144.7 ± 11.3	140.6 ± 13.8	-4.1 (- 28,8;	0.745	137.4 ± 18.3	153.6 ± 22.7	16.2 (-12.3; 44.7)	0.265	0.292	0.364

20.6)

Abbreviations: PCR = urinary protein-creatinine ratio; PTH = Intact parathyroid hormone; 25(OH)D = 25-hydroxivitamina D; eGFR = estimate glomerular filtration rate; HDL = High Density Lipoprotein; LDL = Low Density Lipoprotein.

Table 5 – Effects of probiotic supplementation or placebo on 24-hour urinary parameters.

Parameters	Intervention Group (n = 10)				Control Group (n = 10)				<i>P</i> -value	<i>P</i> -value ANCOVA groups
	Baseline	After	Δ	<i>P</i> -value	Baseline	After	Δ	<i>P</i> -value		
Total protein (g/dL)	1305.0 ± 277.1	1345.8 ± 292.0	-40.8 (-422.8; 341.2)	0.834	2064.2 ± 587.0	2700.8 ± 699.0	-636.6 (-1361.9; 88.7)	0.085	0.154	0.206
Urea (mg/dL)	21.5 ± 2.0	19.3 ± 2.1	-2.2 (-6.4; 2.0)	0.311	18.5 ± 2.0	20.1 ± 2.2	1.6 (0.1; 3.2)	0.035	0.094	0.218
Calcium (mg/dL)	38.4 ± 10.0	42.3 ± 8.6	3.9 (-6.3; 14.1)	0.453	27.9 ± 6.6	30.2 ± 5.1	2.3 (-7.0; 11.7)	0.623	0.826	0.459
Phosphorus (mg/dL)	556.0 ± 65.9	593.4 ± 34.8	37.4(-103.0; 177.8)	0.602	487.4 ± 52.4	586.8 ± 57.9	99.4 (32.8; 166.0)	0.003	0.434	0.771
Sodium	179.5 ± 16.7	194.2 ± 28.9	14.7 (-	0.464	185.8 ± 21.4	192.4 ± 16.8	6.6 (-	0.668	0.749	0.799

(mEq/L)

24.6;

23.5;

54.0)

36.7)



Table 6 – Multiple regression analysis for the effects of probiotic supplementation.

Δ Parameters	β	<i>P</i> -value
eGFR	-0.851	<0.001
Creatinine	0.839	<0.001
Urea	0.520	0.046
C-reactive protein	0.709	0.012
Potassium	0.361	0.157
Phosphorus	0.132	0.603
Calcium	0.118	0.642
25(OH)D	-0.238	0.410
Intact parathyroid hormone	0.414	0.132
Alkaline phosphatase	0.362	0.181
Glucose	0.219	0.370
Total cholesterol	-0.138	0.511
HDL cholesterol	-0.318	0.247
LDL cholesterol	0.182	0.469
Triglyceride	0.256	0.203

Adjusted for group randomization, estimated glomerular filtration rate, creatinine protein ration, antihypertensive use, Diabetes Mellitus diagnosis and age of baseline.

Table 7 – Effects of probiotics supplementation or placebo in bowel habits and stool consistency.

	Intervention Group (n = 10)			Control Group (n = 10)			
Parameters	Baseline	After	<i>P</i> -value	Baseline	After	<i>P</i> -value	<i>P</i> -value ANCOVA
ROMA III Criteria							
Constipation	5 (50.0%)	0 (0%)	0.023	8 (80.0%)	7 (70.0%)	0.504	<0.001
No constipation	5 (50.0%)	10 (100.0%)		2 (20.0%)	3 (30.0%)		
Bristol scale							
Change	7 (70.0%)	2 (20.0%)	0.005	8 (80.0%)	7 (70.0%)	0.031	0.016
No change	3 (30.0%)	8 (80.0%)		2 (20.0%)	3 (30.0%)		
Number of evacuations (weekly)	6.10 ± 0.45	7.00 ± 0.00	0.049	4.9 ± 0.69	5.40 ± 0.51	0.380	0.584

7. CONCLUSÕES

Foram observados efeitos significativos na redução da creatinina e da ureia séricas, com reflexo no aumento da TFG estimada nos pacientes com DRC estágio 3 a 5 que receberam a intervenção probiótica. Este é um dado interessante, pois a melhora dos marcadores de função renal é um dos alvos do tratamento da DRC.

Ao avaliarmos a proteína C-reativa, reconhecido marcador inflamatório, verificamos a sua diminuição estatisticamente significativa no grupo intervenção, e entre os grupos. É bem documentado na literatura científica que pacientes com DRC e estado pró-inflamatório apresentam maior risco de desenvolvimento de patologias cardiovasculares e progressão da DRC.

Outro resultado esperado foi a melhora dos sintomas gastrointestinais, tais como diminuição dos sintomas de constipação e melhora da consistência fecal no grupo intervenção. Esta melhora demonstra a boa aderência dos pacientes à suplementação probiótica, e pode potencialmente indicar a modificação na microbiota intestinal destes pacientes.

A intervenção com probióticos não mostrou efeitos nos parâmetros do metabolismo mineral e ósseo, e no perfil lipídico durante as 24 semanas de suplementação.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Os efeitos do uso de suplementação com probióticos em pacientes, com DRC nos estágios 3 a 5, é um tema de estudo inovador. Até o presente momento na literatura científica, foram publicados somente quatro estudos acerca do tema. Destes estudos, nenhum avaliou concomitantemente marcadores de função renal, inflamação, metabolismo mineral e ósseo, nutricionais e hábitos intestinais.

A partir do material obtido no presente estudo ainda serão analisados outros parâmetros como toxinas urêmicas, balanço nitrogenado de ureia, marcadores pró-inflamatórios como as interleucinas, estado nutricional, consumo alimentar e a modificação da microbiota intestinal em amostra fecal. Estas análises posteriores certamente poderão auxiliar na melhor compreensão da relação bidirecional entre intestino e rim nesses pacientes portadores de doença renal.

O desenvolvimento de outros estudos clínicos com uso de probióticos em pacientes renais devem ter no seu desenho um maior tempo de intervenção, maior número de participantes, envolver delineamento do tipo *crossover* e a análise de endotoxinas. Estas estratégias poderiam evidenciar achados potencialmente promissores em outros parâmetros laboratoriais, além de proporcionar uma investigação mais acurada sobre o tema.

9. ANEXO – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O projeto de pesquisa intitulado "Efeito do consumo de probióticos em fatores associados com progressão da doença renal crônica e risco cardiovascular" será desenvolvido no Serviço de Nefrologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

O indivíduo com doença renal crônica pode apresentar alterações da flora intestinal que, além de causar constipação, também parece afetar diversas funções da saúde. Tem sido sugerido que o desequilíbrio do intestino pode colaborar com o aumento de obesidade, acúmulo de gorduras e toxinas no sangue, risco maior de infecção e inflamação. O consumo de probióticos tem sido sugerido como medidas para auxiliar na recuperação da flora intestinal e promover equilíbrio das funções do intestino. Os probióticos são bactérias boas que vivem dentro do nosso intestino e, se consumidas através de suplementos ou de alguns tipos de alimentos, podem auxiliar para regulação das funções do intestino refletindo na saúde geral do organismo.

Na doença renal crônica, alguns estudos de pesquisa mostraram benefícios do consumo de probióticos como tratamento complementar da dieta, incluindo diminuição das toxinas acumuladas devido a perda de função dos rins, diminuição do colesterol, melhora da constipação, entre outros. Evitar a perda de função dos rins é um dos principais objetivos do tratamento da doença renal crônica e acreditamos que a regulação da função do intestino com o uso de probióticos pode ajudar, quando combinado com os demais tratamentos.

Este estudo tem por objetivo avaliar o efeito do consumo de probióticos em fatores associados com progressão da perda de função dos rins e o risco de desenvolver doenças do coração. Também vamos verificar se o consumo de probióticos poderá trazer benefícios como redução dos níveis de gordura do sangue e melhora do hábito

intestinal. Para avaliar os efeitos dos probióticos, os participantes serão divididos em 2 grupos através de um sorteio. Um grupo irá receber o suplemento com probiótico e o outro grupo (chamado de controle) receberá um placebo (suplemento sem probiótico, o qual é feito de maltodextrina, um composto que não apresenta riscos para a saúde). Nem os participantes e nem os pesquisadores que o atenderão, sabem qual o suplemento que o Sr (a) estará recebendo.

Todos os participantes que aceitem em participar deste estudo serão acompanhados e avaliados por médico nefrologista e nutricionista. As consultas serão previamente agendadas, assim como as coletas de sangue e urina. Estes materiais serão analisados no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Uma amostra de sangue e uma amostra de fezes no período inicial e final do estudo serão congeladas e usadas nos casos de necessidade de repetir um exame ou dosagem de novo exame laboratorial.

Nas consultas serão realizadas avaliações nutricionais, orientações sobre a alimentação saudável, avaliação do hábito intestinal e a entrega do suplemento (probiótico). Tais procedimentos não envolvem qualquer risco de vida para os pacientes. O risco relacionado à coleta de sangue de uma veia do braço é a possibilidade de ocorrer um pequeno hematoma (mancha roxa na pele) e dor no local da coleta. Quanto ao consumo do probiótico, não foram identificados riscos conhecidos que possam trazer danos a sua saúde.

Nenhum benefício financeiro será obtido na participação do presente estudo tanto para o Serviço de Nefrologia, quanto para os(as) Sr.(as), mas a sua participação será muito importante para entender o efeito do consumo de probióticos no paciente renal crônico. E nenhuma outra pessoa, além dos pesquisadores e de seus colaboradores

diretamente envolvidos no projeto, terá acesso ao material proveniente da amostra de sangue.

Eu,..... fui informado dos objetivos especificados acima e da justificativa desta pesquisa de forma clara e detalhada. Recebi informações específicas sobre cada procedimento no qual estarei envolvido, do desconforto ou riscos previstos tanto quanto dos benefícios esperados. Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento.

Além disto, sei que novas informações obtidas durante o estudo me serão fornecidas e que terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa em face destas informações. Sei também que a qualquer momento poderei desistir de participar do estudo e esta decisão não acarretará prejuízo no meu atendimento médico assistencial. Para seu esclarecimento a qualquer momento ou em caso de necessidade o(a) senhor(a) poderá entrar em contato com os membros da equipe de pesquisa do Serviço de Nefrologia pelo telefone da pesquisadora Thaís Rodrigues Moreira (051 9741 2834).

Fui orientado que as informações por mim fornecidas terão caráter confidencial. Fui informado que caso existam danos à minha saúde causados diretamente pela pesquisa, terei direito a tratamento médico conforme estabelece a lei. Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Nome do Paciente: _____

Assinatura: _____

Nome do Pesquisador: _____

Assinatura: _____

Nome do Responsável: _____

Assinatura: _____

9. ANEXO 2 – CONSORT



CONSORT 2010 checklist of information to include when reporting a randomised trial*

Section/Topic	Item No	Checklist item	Reported on page No
Title and abstract			
	1a	Identification as a randomised trial in the title	45
	1b	Structured summary of trial design, methods, results, and conclusions (for specific guidance see CONSORT for abstracts)	45
Introduction			
Background and objectives	2a	Scientific background and explanation of rationale	47
	2b	Specific objectives or hypotheses	48
Methods			
Trial design	3a	Description of trial design (such as parallel, factorial) including allocation ratio	48
	3b	Important changes to methods after trial commencement (such as eligibility criteria), with reasons	48
Participants	4a	Eligibility criteria for participants	48
	4b	Settings and locations where the data were collected	49
Interventions	5	The interventions for each group with sufficient details to allow replication, including how and when they were actually administered	49
Outcomes	6a	Completely defined pre-specified primary and secondary outcome measures, including how and when they were assessed	50
	6b	Any changes to trial outcomes after the trial commenced, with reasons	50
Sample size	7a	How sample size was determined	51
	7b	When applicable, explanation of any interim analyses and stopping guidelines	51
Randomisation: Sequence generation	8a	Method used to generate the random allocation sequence	49
	8b	Type of randomisation; details of any restriction (such as blocking and block size)	49
Allocation concealment mechanism	9	Mechanism used to implement the random allocation sequence (such as sequentially numbered containers), describing any steps taken to conceal the sequence until interventions were assigned	49
	10	Who generated the random allocation sequence,	49

Implementation		who enrolled participants, and who assigned participants to interventions	
Blinding	11a	If done, who was blinded after assignment to interventions (for example, participants, care providers, those assessing outcomes) and how	48
	11b	If relevant, description of the similarity of interventions	49
Statistical methods	12a	Statistical methods used to compare groups for primary and secondary outcomes	49
	12b	Methods for additional analyses, such as subgroup analyses and adjusted analyses	51
Results			
Participant flow (a diagram is strongly recommended)	13a	For each group, the numbers of participants who were randomly assigned, received intended treatment, and were analysed for the primary outcome	52,68
	13b	For each group, losses and exclusions after randomisation, together with reasons	52
Recruitment	14a	Dates defining the periods of recruitment and follow-up	52
	14b	Why the trial ended or was stopped	52
Baseline data	15	A table showing baseline demographic and clinical characteristics for each group	69,70
Numbers analysed	16	For each group, number of participants (denominator) included in each analysis and whether the analysis was by original assigned groups	52,68
Outcomes and estimation	17a	For each primary and secondary outcome, results for each group, and the estimated effect size and its precision (such as 95% confidence interval)	74-77
	17b	For binary outcomes, presentation of both absolute and relative effect sizes is recommended	78-79
Ancillary analyses	18	Results of any other analyses performed, including subgroup analyses and adjusted analyses, distinguishing pre-specified from exploratory	80
Harms	19	All important harms or unintended effects in each group (for specific guidance see CONSORT for harms)	68
Discussion			
Limitations	20	Trial limitations, addressing sources of potential bias, imprecision, and, if relevant, multiplicity of analyses	58
Generalisability	21	Generalisability (external validity, applicability) of the trial findings	55-58
Interpretation	22	Interpretation consistent with results, balancing benefits and harms, and considering other relevant evidence	55-58
Other information			
Registration	23	Registration number and name of trial registry	48,49
Protocol	24	Where the full trial protocol can be accessed, if available	49

Funding	25	Sources of funding and other support (such as supply of drugs), role of funders	59
---------	----	---	----

*We strongly recommend reading this statement in conjunction with the CONSORT 2010 Explanation and Elaboration for important clarifications on all the items. If relevant, we also recommend reading CONSORT extensions for cluster randomised trials, non-inferiority and equivalence trials, non-pharmacological treatments, herbal interventions, and pragmatic trials. Additional extensions are forthcoming: for those and for up to date references relevant to this checklist, see www.consort-statement.org.