

Uso de probióticos em pacientes com doença renal crônica em hemodiálise: um ensaio clínico randomizado

Use of probiotics in patients with chronic kidney disease on hemodialysis: a randomized clinical trial

Authors

Érica Maria Rodrigues de Araújo¹ 

Gdayllon Cavalcante Meneses¹ 

Antônio Augusto Ferreira Carioca² 

Alice Maria Costa Martins³ 

Elizabeth De Francesco Daher⁴ 

Geraldo Bezerra da Silva Junior^{1,4} 

¹Universidade de Fortaleza, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, CE, Brasil.

²Universidade de Fortaleza, Curso de Nutrição e Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva, Fortaleza, CE, Brasil.

³Universidade Federal do Ceará, Programas de Pós-Graduação em Farmacologia e Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, CE, Brasil.

⁴Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, Departamento de Medicina Clínica, Fortaleza, CE, Brasil.

Data de submissão: 12/02/2022.

Data de aprovação: 20/06/2022.

Data de publicação: 12/09/2022.

Correspondência para:

Geraldo Bezerra da Silva Junior.
E-mail: geraldobezerrajr@unifor.br

DOI: <https://doi.org/10.1590/2175-8239-JBN-2022-0021pt>

RESUMO

Introdução: A suplementação com probióticos na doença renal crônica (DRC) pode estar associada à redução do processo inflamatório sistêmico. **Objetivo:** Avaliar a suplementação oral com probióticos em pacientes com DRC em hemodiálise. **Método:** Ensaio clínico, duplo cego, randomizado com 70 pacientes em hemodiálise, sendo 32 do grupo que recebeu o suplemento de probióticos e 38 do grupo placebo. Inicialmente ocorreu a coleta de sangue e suplementação oral com probióticos ou placebo durante três meses. O suplemento probiótico foi composto pela combinação de 4 cepas de bactérias Gram-positivas encapsuladas: *Lactobacillus Plantarum* A87, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium bifidum* A218 e *Bifidobacterium longum* A101, sendo 1 cápsula do suplemento ao dia, durante 3 meses. Após esse período foram feitas novas coletas de sangue para dosagem dos biomarcadores inflamatórios. Foram analisados os biomarcadores não tradicionais: Syndecan-1, IFN- γ , NGAL e cistatina C pelo método ELISA, e os seguintes parâmetros bioquímicos: PCR, cálcio, fósforo, potássio, PTH, TGP, hematócrito, hemoglobina, glicose e ureia. **Resultados:** Os pacientes que receberam suplemento tiveram diminuição significativa dos níveis séricos de syndecan-1 (de 239 ± 113 para 184 ± 106 ng/mL, $p = 0,005$). Outro parâmetro que diminuiu significativamente nos pacientes que receberam suplemento foi a glicemia (de 162 ± 112 para 146 ± 74 mg/dL, $p = 0,02$). **Conclusão:** O uso de probióticos na DRC avançada esteve associado à redução dos níveis de syndecan-1 e glicemia, sinalizando possível melhora no metabolismo e redução do processo inflamatório sistêmico.

Descritores: Insuficiência Renal Crônica; Probióticos; Microbioma Gastrointestinal; Inflamação; Biomarcadores.

ABSTRACT

Introduction: Supplementation with probiotics for patients with chronic kidney disease (CKD) may be associated with decreased systemic inflammation. **Objective:** To assess the impact of oral supplementation with probiotics for patients with CKD on hemodialysis. **Method:** This double-blind randomized clinical trial included 70 patients on hemodialysis; 32 were given oral supplementation with probiotics and 38 were in the placebo group. Blood samples were collected at the start of the study and patients were given oral supplementation with probiotics or placebo for three months. The probiotic supplement comprised four strains of encapsulated Gram-positive bacteria: *Lactobacillus Plantarum* A87, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium bifidum* A218 and *Bifidobacterium longum* A101. Patients were given one capsule per day for 3 months. Blood samples were taken throughout the study to check for inflammatory biomarkers. Non-traditional biomarkers Syndecan-1, IFN- γ , NGAL, and cystatin C were measured using an ELISA kit, along with biochemical parameters CRP, calcium, phosphorus, potassium, PTH, GPT, hematocrit, hemoglobin, glucose, and urea. **Results:** Patients given supplementation with probiotics had significant decreases in serum levels of syndecan-1 (239 ± 113 to 184 ± 106 ng/mL, $p = 0.005$); blood glucose levels also decreased significantly (162 ± 112 to 146 ± 74 mg/dL, $p = 0.02$). **Conclusion:** Administration of probiotics to patients with advanced CKD was associated with decreases in syndecan-1 and blood glucose levels, indicating potential improvements in metabolism and decreased systemic inflammation.

Keywords: Renal Insufficiency, Chronic; Probiotics; Gastrointestinal Microbiome; Inflammation; Biomarkers.



INTRODUÇÃO

A incidência de doença renal crônica (DRC) no Brasil vem aumentando de forma significativa. Segundo publicação do Censo Brasileiro de Diálise, em julho de 2020, a estimativa de pacientes em diálise foi de 144.779, mantendo uma tendência de aumento observada nos últimos anos¹. O número estimado de novos pacientes em centros de diálise em 2020 foi de 44.264¹.

A DRC está associada a um estado pró-inflamatório, e hábitos alimentares dos pacientes com DRC podem ter associação com esse quadro². Pacientes com DRC em hemodiálise são mais suscetíveis ao quadro de disbiose intestinal, que, por sua vez, aumenta o risco de complicações na DRC, doenças cardiovasculares³. O uso de probióticos pode favorecer o enriquecimento da microbiota intestinal, estimulando a melhora imunológica, recuperando da permeabilidade da barreira intestinal e promovendo efeitos anti-inflamatórios⁴, corrigindo a disbiose, o que pode ter efeito benéfico na DRC³. Estudos de revisão recentes analisando o uso de probióticos em pacientes com DRC evidenciam efeitos favoráveis na redução de biomarcadores de estresse oxidativo (malonaldeído), inflamação (interleucina-6), ureia, p-cresol, amônia, entre outros benefícios^{5,6}.

Cistatina C e NGAL têm sido utilizados principalmente como biomarcadores precoces de lesão renal, estando também associados à inflamação⁷⁻¹⁰. Alguns estudos recentes evidenciam redução de parâmetros inflamatórios tradicionais, como a proteína C reativa (PCR) após uso de probióticos em pacientes com DRC, bem como melhora da função renal, evidenciada pela redução dos níveis de cistatina C^{5,11}.

O objetivo deste estudo foi avaliar a suplementação oral com probióticos em pacientes com DRC em hemodiálise, tendo como principal hipótese a de que essa suplementação pode ser benéfica em reduzir o processo inflamatório sistêmico e contribuir para a melhora do perfil metabólico desses pacientes.

MÉTODOS

DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um ensaio clínico randomizado (ECR) e duplo-cego. Foram selecionados 70 pacientes em uma clínica de hemodiálise, em Fortaleza, Ceará, Brasil. Destes, 32 receberam a suplementação de probióticos e 38 receberam o placebo. Todos os

pacientes foram previamente informados sobre a coleta de material biológico para a realização do presente estudo, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e estiveram cientes da participação como voluntários. Foram coletados dos prontuários eletrônicos os dados sociodemográficos e exames de rotina dos participantes.

PARTICIPANTES

Foram incluídos pacientes do sexo feminino e masculino com idade entre 22 a 69 anos, com diagnóstico de DRC, em hemodiálise. Foram excluídos pacientes que já faziam uso de suplementos de probióticos, mulheres gestantes ou com suspeita de gravidez, transplantados renais, pessoas com alterações gastrointestinais, como cirurgias intestinais ou câncer no TGI, indivíduos com alterações comportamentais, por dificultar a obtenção de respostas necessárias à pesquisa, indivíduos com paraplegias, tetraplegias e amputações, por modificar a aferição pelo padrão antropométrico. Pacientes com outras doenças, como HIV/Aids, neoplasias e doenças autoimunes foram excluídos, assim como aqueles que estavam em uso de medicamentos que pudessem interferir de maneira significativa nos resultados, por influenciar no processo inflamatório e na microbiota, como antibióticos e anti-inflamatórios, também foram excluídos. O critério de exclusão de pacientes idosos norteou-se devido ao processo natural do envelhecimento, quando ocorrem alterações morfofuncionais e diminuição da funcionalidade dos rins, conforme descrito previamente¹². Crianças e adolescentes foram excluídos em virtude da classificação antropométrica¹³. Foi também critério de exclusão os casos em que o participante não faz uso regular dos probióticos. A seleção da amostra e os motivos pelos quais foram excluídos alguns pacientes estão ilustrados na Figura 1.

INTERVENÇÕES

Os suplementos e os placebos tiveram as mesmas características organolépticas, isto é, as cápsulas tinham a mesma cor, a mesma aparência física e o mesmo sabor. A qualidade das cápsulas foi assegurada pela farmácia de manipulação. O suplemento probiótico foi composto pela combinação de 4 cepas de bactérias Gram-positivas encapsuladas: *Lactobacillus plantarum* A87, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium bifidum* A218 e

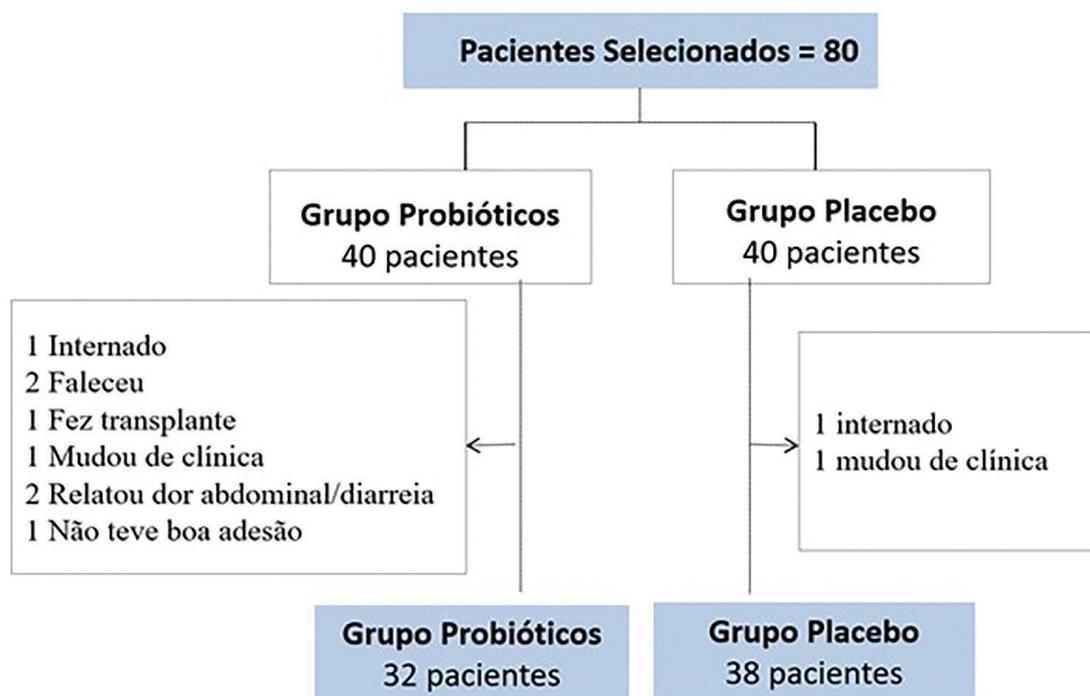


Figura 1. Fluxograma da pesquisa.

Bifidobacterium longum A101, sendo cada cepa na concentração de 1 bilhão de Unidade Formadora de Colônia (UFC), totalizando 4 bilhões de UFC em cada cápsula. A posologia consistiu na ingestão de 1 cápsula do suplemento ao dia, após o jantar, durante 3 meses. Além disso, foram dadas orientações quanto ao armazenamento adequado das cápsulas. A escolha da fórmula em estudo foi embasada pela declaração da ANVISA, que atesta os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* como microrganismos com potencial probiótico e por representarem 80% da microbiota de um indivíduo saudável¹⁴.

Durante o período de intervenção, uma equipe composta por 5 discentes do curso de medicina da UNIFOR fez o acompanhamento semanal dos participantes via contato telefônico, a fim de monitorar a adesão do paciente ao uso da suplementação, bem como as reações adversas. As coletas dos dados foram realizadas antes e após a suplementação de probióticos, com intervalo de 3 meses. Os participantes realizaram a coleta de sangue pré-diálise para análise dos biomarcadores de inflamação não tradicionais e aferição de peso após diálise, e receberam os frascos contendo suplemento ou placebo. Após 3 meses de intervenção, as coletas de dados realizadas inicialmente no estudo foram repetidas, seguindo o mesmo padrão de qualidade.

AVALIAÇÃO DO IMC

Foi utilizada a equação $(PLEa (18) = PS (kg) + [(PR - PS) \times 0,25])$ para calcular o peso ajustado livre de edema, em que PLEa significa peso livre de edema ajustado; PS, peso seco; e PR, peso de referência, conforme recomendação da *Clinical practice guideline for nutrition in chronic renal failure: 2021*¹⁵. O cálculo do índice de massa corporal (IMC) foi realizado seguindo a fórmula padrão de peso/altura², conforme formalizado pela Organização Mundial da Saúde desde 1995 e mantendo-se como referência até o momento.

COLETA DE SANGUE

As amostras de sangue dos participantes foram obtidas antes da sessão de diálise nos respectivos turnos. O sangue foi coletado em tubos Vacutainer® tampa amarela de 5 mL, contendo gel separador. Todos os tubos foram previamente identificados com o nome do paciente. Para o transporte das amostras até o laboratório de análises, foram utilizados estante, caixa de isopor e bolsas térmicas resfriadas. O sangue armazenado em cada tubo foi centrifugado a 2500 rotações por minuto (RPM) durante 10 minutos. Foi utilizada pipeta volumétrica para transferir o plasma obtido para microtubos tipo Eppendorf de

1,5 mL; em seguida, as alíquotas foram armazenadas a temperatura de -80°C até análises posteriores.

DETERMINAÇÃO DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS NÃO TRADICIONAIS

Os biomarcadores não tradicionais (NGAL, Cistatina C, PCR e IFN- γ) foram quantificados a partir de alíquotas tratadas no dia da coleta. Para todas essas quantificações foi aplicada a técnica ELISA, por ser um ensaio imunoenzimático, conferindo alta sensibilidade e especificidade. Os kits para o teste ELISA adquiridos eram da marca R&D Systems® (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), com reagentes suficientes para 5 a 15 placas com 96 testes por placa, dependendo do biomarcador. Todos os exames foram realizados a partir de amostras de soro.

DESFECHOS

Foram avaliados, após 3 meses de suplementação com probióticos, os principais parâmetros inflamatórios e metabólicos, sendo o desfecho principal esperado a redução da inflamação e dos distúrbios metabólicos, através da redução de biomarcadores, sendo os principais avaliados neste estudo: PCR, cistatina C, NGAL e glicemia.

RANDOMIZAÇÃO

Após o recrutamento, com auxílio do programa *Research Randomizer*® (www.randomizer.org), foi realizada randomização dos grupos de forma aleatória. O grupo 1 (G1) recebeu suplementação de probióticos e o grupo 2 (G2) recebeu placebo. Por se tratar de um ensaio clínico duplo-cego, a pesquisadora e os participantes foram cegados, tanto em relação à alocação sequencial quanto à codificação da suplementação e do placebo distribuídos aos grupos envolvidos. Os suplementos e os placebos tiveram as mesmas características organolépticas, isto é, as cápsulas tinham a mesma cor, aparência física e sabor. A qualidade das cápsulas foram asseguradas pela farmácia de manipulação. O placebo teve sua fórmula inerte, livre de alérgenos, de glúten, de soja, de lactose e sem interação medicamentosa, composto apenas com uma base de celulose microcristalina modificada, conhecido pelo nome de Celulamax E®. O excipiente Celulamax E® foi utilizado por atender aos critérios de segurança da legislação sanitária vigente^{16,17}.

MÉTODOS ESTATÍSTICOS

As variáveis quantitativas foram expressas como média \pm desvio de acordo com a normalidade dos dados. Foi usado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. As variáveis qualitativas foram expressas como contagem absoluta e porcentagens. Para comparações dos dados categóricos entre grupos independentes foi usado o teste do qui-quadrado ou exato de Fisher. Para comparações de dados categóricos entre grupos dependentes (antes e após suplementação) foi usado o teste de Mc Nemar. Para comparações de dados quantitativos entre grupos independentes em cada período (antes e após a suplementação) foram usados os testes t de Student ou Mann-Whitney de acordo com a normalidade dos dados. $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Os dados foram analisados no software SPSS para Macintosh, versão 23 (SPSS, IBM, USA).

ASPECTOS ÉTICOS

A realização desta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos da Universidade de Fortaleza – UNIFOR (parecer nº 3325286/2019). Todos os pacientes desta pesquisa assinaram o TCLE, após explicação minuciosa sobre os objetivos e procedimentos envolvidos no desenvolvimento do estudo.

RESULTADOS

Foram incluídos no presente estudo 70 pacientes em tratamento regular de HD. Destes, apenas 70 completaram o período de intervenção, sendo 38 pertencentes ao grupo placebo e 32 ao grupo suplementação. Saíram do estudo, ao todo, 10 participantes, por motivos diversos. Do grupo que recebeu a suplementação com probióticos, 8 saíram do estudo devido aos seguintes motivos: 1 foi internado, 2 foram a óbito, 1 fez transplante renal, 1 mudou de clínica, 2 relataram dor abdominal e diarreia, 1 não teve boa aderência. Já no grupo placebo, 1 paciente foi internado e 1 mudou de clínica durante o estudo, perdendo o seguimento.

As características basais dos dois grupos de pacientes eram semelhantes. A única diferença significativa encontrada foi com relação aos níveis de PTH, que estavam mais elevados no grupo que recebeu a suplementação (Tabela 1).

A comparação entre o grupo que recebeu a suplementação e o que recebeu o placebo, após o

TABELA 1 CARACTERÍSTICAS GERAIS E LABORATORIAIS DOS PARTICIPANTES NO PERÍODO PRÉ-SUPLEMENTAÇÃO, COMPARANDO O GRUPO QUE RECEBEU PLACEBO E O GRUPO QUE RECEBEU SUPLEMENTO PROBIÓTICO

	Período pré-suplementação		p*
	Placebo (n = 38)	Suplementação (n = 32)	
Sexo			0,602
Masculino	19 (50)	14 (43,8)	
Feminino	19 (50)	18 (56,3)	
Idade, anos	49 ± 13	47 ± 13	
Classificação IMC			0,479
Desnutrição	2 (5,3)	0 (0)	
Eutrofia	29 (76,3)	23 (71,9)	
Sobrepeso	6 (15,8)	8 (25)	
Obesidade	1 (2,6)	1 (3,1)	
PCR (ng/mL)	1563,3 ± 783	1626 ± 617,5	0,715
Syndecan-1 (ng/mL)	211,95 ± 121,5	239,48 ± 113,61	0,334
IFN-γ (detectável)	7 (18,4)	1 (3,1)	0,063
NGAL (ng/mL)	59,02 ± 20,18	65,67 ± 12,45	0,110
Cistatina C (ng/mL)	713,2 (398,5 – 815,5)	620,4 (212,1 – 993,8)	0,084
Cálcio (mg/dL)	8,6 ± 0,8	8,7 ± 0,5	0,551
Fósforo (mg/dL)	5 ± 1,7	5,2 ± 1,2	0,531
PTH (U/L)	400,6 ± 253,7	738,6 ± 592,8	0,047
TGP (U/L)	12 (9 – 16)	12 (10 – 18)	0,714
Ht (%)	33,3 ± 5,4	33,5 ± 5,1	0,904
Hb (g/dL)	11 ± 1,9	11,1 ± 1,8	0,762
K (mEq/L)	4,7 ± 0,7	5,1 ± 1,3	0,145
Glicose (mg/dL)	151,5 ± 93,9	162,7 ± 112,6	0,761
Ureia – pré (mg/dL)	114 ± 35,8	122,8 ± 30,6	0,303
Ureia – pós (mg/dL)	31 ± 14,2	32,5 ± 16,5	0,707
IMC (kg/m²)	23 ± 2,8	23,7 ± 2,6	0,352

PCR: proteína C-reativa; IFN-γ: interferon-gama; NGAL: lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos; PTH: Paratormônio; TGP: Transaminase pirúvica; Ht: Hematócrito; Hb: Hemoglobina; K: potássio; IMC: Índice de massa corporal; Significativo: p < 0,05. Dados qualitativos expressos como contagem absoluta e porcentagens entre parênteses. Dados quantitativos expressos como média ± desvio-padrão ou como mediana e amplitude interquartil entre parênteses. *Foi usado o teste t de Student ou Mann-Whitney para comparações entre dados quantitativos e qui-quadrado ou teste exato de Fisher para avaliar a associação entre dados qualitativos.

período da suplementação, não evidenciou diferença significativa em nenhum parâmetro (Tabela 2).

Quanto aos mediadores inflamatórios, conforme análise pareada, em que todos os parâmetros dos pacientes foram comparados entre os períodos (pré-suplementação *versus* pós-suplementação) dentro de cada grupo (placebo e aqueles que receberam suplemento), foi observado que houve uma associação significativa após 3 meses de estudo, no grupo que recebeu suplemento.

No que diz respeito ao grupo placebo, foi observado que houve uma diminuição do mediador inflamatório PCR entre os períodos pré e pós-suplementação (de 1563 ± 783 para 860 ± 331 ng/mL,

p = 0,001), porém, em relação aos outros parâmetros, não foi observada relevância estatística entre período inicial e final do estudo (Tabela 3). Já no grupo que recebeu o suplemento, também houve diminuição significativa da PCR (de 1626 ± 617 para 898 ± 313 ng/mL, p = 0,001), comparando os níveis séricos nas fases pré e pós-suplementação. Em relação à hemoglobina e ao hematócrito, houve um aumento significativo dos níveis após a suplementação de probióticos, o que não foi observado no grupo placebo (Tabela 4). Não foi observada diminuição significativa para parâmetros renais, incluindo NGAL sérico e cistatina C sérica no grupo suplementação.

TABELA 2 COMPARAÇÃO ENTRE CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS NOS PERÍODOS PÓS SUPLEMENTAÇÃO

	Período pós-suplementação		p*
	Placebo (n = 38)	Suplementação (n = 32)	
Classificação IMC			0,479
Desnutrição	2 (5,3)	0 (0)	
Eutrofia	29 (76,3)	23 (71,9)	
Sobrepeso	6 (15,8)	8 (25)	
Obesidade	1 (2,6)	1 (3,1)	
PCR (ng/mL)	860 ± 331	898 ± 313	0,622
Syndecan-1 (ng/mL)	211,4 ± 198,1	184,3 ± 106	0,491
IFN-γ (detectável)	6 (15,8)	4 (12,5)	0,695
NGAL (ng/mL)	60,5 ± 27,1	64,2 ± 25,8	0,571
Cistatina C (ng/mL)	527,35 (507,01 – 540,49)	537,89 (505,5 – 559,4)	0,358
Cálcio (mg/dL)	10,9 ± 13,3	10,9 ± 12,7	0,988
Fósforo (mg/dL)	5,4 ± 1,6	5 ± 1,3	0,299
PTH (U/L)	242,7 ± 177,4	677,1 ± 841,6	0,072
TGP (U/L)	11 (9 – 14)	11 (8 – 14)	0,669
Hematócrito (%)	35,2 ± 6,8	37,1 ± 5,4	0,254
Hemoglobina (g/dL)	11,5 ± 2,2	12 ± 1,5	0,29
Potássio (mEq/L)	5,1 ± 0,7	5,2 ± 1,4	0,785
Glicose (mg/dL)	156,9 ± 98,2	146,5 ± 74,6	0,766
Ureia – pré (mg/dL)	111,5 ± 45,8	117,5 ± 28,9	0,553
Ureia – pós (mg/dL)	31,4 ± 14,7	34,2 ± 25,1	0,586
IMC (kg/m²)	23 ± 2,8	23,7 ± 2,6	0,325

PCR: proteína C-reativa; IFN-γ: interferon-gama; NGAL: lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos; PTH: Paratormônio; TGP: Transaminase pirúvica; Ht: Hematócrito; Hb: Hemoglobina; K: potássio; IMC: Índice de massa corporal; Significativo: $p < 0,05$. Dados qualitativos expressos como contagem absoluta e porcentagens entre parênteses. Dados quantitativos expressos como média ± desvio-padrão ou como mediana e amplitude interquartil entre parênteses. *Foi usado o teste t de Student ou Mann-Whitney para comparações entre dados quantitativos e qui-quadrado ou teste exato de Fisher para avaliar a associação entre dados qualitativos. Fonte: o próprio autor.

Por outro lado, na avaliação de um Biomarcador do glicocálice endotelial, syndecan-1, os pacientes que receberam o suplemento tiveram diminuição significativa dos níveis no sangue (de 239 ± 113 para 184 ± 106 ng/mL, $p = 0,005$) (Tabela 2). Outro parâmetro que diminuiu significativamente nos pacientes que receberam suplemento foi a glicemia (de 162 ± 112 para 146 ± 74 mg/dL, $p = 0,02$) (Tabela 2).

DISCUSSÃO

O presente estudo evidenciou que o uso de probióticos em pacientes com DRC em hemodiálise associou-se a uma redução dos níveis de marcadores de lesão endotelial (syndecan-1) e melhora de parâmetros laboratoriais, como glicemia, hematócrito e hemoglobina. O interesse por esse tipo de suplementos tem aumentado nos últimos anos, inclusive no Brasil¹⁸, já havendo novos estudos de metanálise

sendo preparados para avaliar o efeito de probióticos na DRC¹⁹.

Os primeiros estudos sobre a microbiota intestinal na DRC relataram não haver diferença significativa entre o número de microrganismo da microbiota dos pacientes com DRC em comparação à do indivíduo saudável, porém as *Bifidobactérias spp* se encontravam em menor quantidade e as *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterococcus* prevalecendo no TGI no doente renal²⁰. Outros estudos indicam que a microbiota intestinal do DRC pode estar alterada, apresentando maior quantidade de bactérias potencialmente patogênicas e pró-inflamatórias que contribuem para a progressão da doença renal²¹.

Dessa forma, a necessidade da comprovação dessas alterações supracitadas na DRC fundamentou a realização do presente estudo, que manteve o foco

TABELA 3 COMPARAÇÃO ENTRE CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS NOS PERÍODOS ANTES E APÓS A SUPLEMENTAÇÃO NO GRUPO PLACEBO

	Placebo (n = 38)		p*
	Antes da suplementação	Após a suplementação	
Classificação IMC			1,000
Desnutrição	2 (5,3)	1 (2,6)	
Eutrofia	29 (76,3)	23 (60,5)	
Sobrepeso	6 (15,8)	5 (13,2)	
Obesidade	1 (2,6)	10 (26,3)	
PCR (ng/mL)	1563,3 ± 783	860 ± 331	0,001
Syndecan-1 (ng/mL)	211,95 ± 121,5	211,4 ± 198,1	0,984
IFN-γ (detectável)	7 (18,4)	6 (15,8)	1,000
NGAL (ng/mL)	59,02 ± 20,18	60,5 ± 27,1	0,737
Cistatina C (ng/mL)	713,2 (398,5 – 815,5)	527,35 (507,01 – 540,49)	0,072
Cálcio (mg/dL)	8,6 ± 0,8	10,9 ± 13,3	0,339
Fósforo (mg/dL)	5 ± 1,7	5,4 ± 1,6	0,388
PTH (U/L)	400,6 ± 253,7	242,7 ± 177,4	0,17
TGP (U/L)	12 (9 – 16)	11 (9 – 14)	0,786
Hematócrito (%)	33,3 ± 5,4	35,2 ± 6,8	0,434
Hemoglobina (g/dL)	11 ± 1,9	11,5 ± 2,2	0,571
Potássio (mEq/L)	4,7 ± 0,7	5,1 ± 0,7	0,076
Glicose (mg/dL)	151,5 ± 93,9	156,9 ± 98,2	0,916
Ureia – pré (mg/dL)	114 ± 35,8	111,5 ± 45,8	0,491
Ureia – pós (mg/dL)	31 ± 14,2	31,4 ± 14,7	0,452
IMC (kg/m²)	23 ± 2,8	23 ± 2,8	1,000

PCR: proteína C-reativa; IFN-γ: interferon-gama; NGAL: lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos; PTH: Paratormônio; TGP: Transaminase pirúvica; Ht: Hematócrito; Hb: Hemoglobina; K: potássio; IMC: Índice de massa corporal; Significativo: p < 0,05. Dados qualitativos expressos como contagem absoluta e porcentagens entre parênteses. Dados quantitativos expressos como média ± desvio-padrão ou como mediana e amplitude interquartil entre parênteses. *Foi usado o teste t pareado ou teste de Wilcoxon para comparações entre dados quantitativos e teste de McNemar para avaliar a associação entre dados qualitativos.

em avaliar os efeitos da suplementação de probióticos formulados com as cepas *Lactobacillus plantarum* A87, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium bifidum* A218, *Bifidobacterium longum* A101, na concentração total de 4 bilhões de UFC sobre os biomarcadores não tradicionais nos pacientes renais crônicos em hemodiálise.

Os resultados deste estudo mostraram, após 3 meses de intervenção, diminuição significativa para o biomarcador do glicocálice endotelial, syndecan-1, da glicemia e aumento de hemoglobina e hematócrito no grupo suplementado quando comparado ao grupo placebo. Entretanto, não se pode atribuir este fato somente à suplementação com probióticos, uma vez que os pacientes em diálise também recebem tratamento para anemia, uma complicação frequente da DRC.

O syndecan-1 é um dos principais componentes do glicocálice endotelial, e a clivagem de seus domínios extracelulares libera sua forma solúvel no plasma^{22,23}. Sua expressão no sistema imunológico e liberação em níveis séricos aumentam com estímulos inflamatórios ou quando ocorre lesão do glicocálice endotelial, condição presente no DRC em terapia hemodialítica²⁴.

Corroborando com os resultados apresentados neste estudo sobre a significativa redução dos escores histológicos do syndecan-1, Le e Yang²⁵ relatam que dois dos gêneros mais amplamente estudados que se mostraram eficazes no alívio da inflamação gastrointestinal são os *Lactobacillus* e *Bifidobacteria* e que estas exibiram efeitos terapêuticos na inflamação gastrointestinal por meio de suas funções modulatórias contra citocinas inflamatórias.

TABELA 4 COMPARAÇÃO ENTRE CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS NOS PERÍODOS ANTES E APÓS A SUPLEMENTAÇÃO NO GRUPO QUE RECEBEU SUPLEMENTO

	Suplemento (n = 32)		p*
	Antes da suplementação	Após a suplementação	
Classificação IMC			1,000
Desnutrição	0 (0)	1 (3,1)	
Eutrofia	23 (71,9)	10 (31,3)	
Sobrepeso	8 (25)	1 (3,1)	
Obesidade	1 (3,1)	21 (65,6)	
PCR (ng/mL)	1626 ± 617,5	898 ± 313	0,001
Syndecan-1 (ng/mL)	239,48 ± 113,61	184,3 ± 106	0,005
IFN-γ (detectável)	1 (3,1)	4 (12,5)	0,375
NGAL (ng/mL)	65,67 ± 12,45	64,2 ± 25,8	0,772
Cistatina C (ng/mL)	620,4 (212,1 – 993,8)	537,89 (505,5 – 559,4)	0,112
Cálcio (mg/dL)	8,7 ± 0,5	10,9 ± 12,7	0,371
Fósforo (mg/dL)	5,2 ± 1,2	5 ± 1,3	0,356
PTH (U/L)	738,6 ± 592,8	677,1 ± 841,6	0,421
TGP (U/L)	12 (10 – 18)	11 (8 – 14)	0,576
Hematócrito (%)	33,5 ± 5,1	37,1 ± 5,4	0,011
Hemoglobina (g/dL)	11,1 ± 1,8	12 ± 1,5	0,036
Potássio (mEq/L)	5,1 ± 1,3	5,2 ± 1,4	0,817
Glicose (mg/dL)	162,7 ± 112,6	146,5 ± 74,6	0,026
Ureia – pré (mg/dL)	122,8 ± 30,6	117,5 ± 28,9	0,516
Ureia – pós (mg/dL)	32,5 ± 16,5	34,2 ± 25,1	0,802
IMC (kg/m²)	23,7 ± 2,6	23,7 ± 2,6	1

PCR: proteína C-reativa; IFN-γ: interferon-gama; NGAL: lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos; PTH: Paratormônio; TGP: Transaminase pirúvica; Ht: Hematócrito; Hb: Hemoglobina; K: potássio; IMC: Índice de massa corporal; Significativo: p < 0,05. Dados qualitativos expressos como contagem absoluta e porcentagens entre parênteses. Dados quantitativos expressos como média ± desvio-padrão ou como mediana e amplitude interquartil entre parênteses. *Foi usado o teste t pareado ou teste de Wilcoxon para comparações entre dados quantitativos e teste de McNemar para avaliar a associação entre dados qualitativos.

A redução observada nos níveis de syndecan-1 pode representar uma evidência do efeito da suplementação com probióticos na redução da inflamação endotelial, o que representa, indiretamente, uma redução do risco cardiovascular. Ainda há poucos estudos sobre a relação da microbiota e o syndecan-1, mas há evidências de que o syndecan-1 tem papel importante na lesão de isquemia-reperusão intestinal²⁶. Mais estudos são necessários para a avaliação dos efeitos sistêmicos da suplementação com probióticos, sobretudo com relação aos possíveis efeitos benéficos cardiovasculares. Alguns estudos sugerem que os probióticos contribuem para a redução e o controle da dislipidemia, a redução da pressão arterial, de mediadores inflamatórios, entre outros²⁷.

No presente estudo, em relação ao perfil glicídico significativamente reduzido, Soleimani et al.²⁸ também observaram efeitos benéficos nos parâmetros de glicose e de alguns biomarcadores de inflamação quando comparado com o grupo controle em um ensaio clínico duplo-cego com 60 pacientes diabéticos em hemodiálise, suplementando-os durante 12 semanas com uma fórmula contendo as cepas *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* e *Bifidobacterium bifidum* na dose de 2×10^9 UFC/g de cada.

Em relação aos biomarcadores não tradicionais NGAL, cistatina C e ao mediador inflamatório IFN-γ, não foi observada diferença significativa neste estudo. Em contraste, há um ensaio clínico randomizado

controlado com 60 pacientes diagnosticados com nefropatia diabética realizado por Miraghajani et al.²⁹, utilizando leite de soja enriquecido com *Lactobacillus plantarum* A7 para determinar o efeito do consumo desse produto em novos fatores renais, incluindo NGAL e Cistatina C. Nesse estudo os pacientes do grupo suplemento foram convidados a ingerir 200 mL/dia do leite probiótico e os do grupo controle, apenas o leite de soja sem adição de *Lactobacillus* por 8 semanas. Miraghajani et al.²⁹ concluíram que o leite de soja probiótico teve um efeito benéfico sobre a função renal, pois reduziu o nível de NGAL ($p = 0,05$) e cistatina C ($p = 0,02$). A cistatina C e o NGAL tem aplicação principalmente como biomarcadores precoces de lesão renal, porém têm também papel como biomarcadores de inflamação e, no caso da cistatina C, também de adequação da diálise⁷⁻¹⁰. Então, o racional para a aplicação desses biomarcadores nesta pesquisa foi avaliá-los como marcadores de inflamação e não como marcadores de função renal, uma vez que uma das principais hipóteses do efeito da suplementação de probióticos é a redução da inflamação sistêmica. Entretanto, não houve redução significativa dos níveis de cistatina C e NGAL após a suplementação com probióticos.

Com relação ao PCR, foi observada diminuição, tanto no grupo placebo quanto no grupo suplementação. Apresentando desenho de estudo semelhante com grupos de pacientes em diálise, Ranganathan et al.³⁰ não encontram diferenças significativas em parâmetros como ureia, creatinina e PCR, após 2 meses de tratamento. Em um ensaio clínico triplo-cego randomizado controlado por placebo realizado com 54 pacientes diabéticos em uso de suplemento simbiótico contendo 7 cepas liofilizadas de *Lactobacillus acidophilus* na concentração de 2 bilhões de UFC, *L. casei* com 7 bilhões de UFC, *L. rhamnosus* com 1,5 bilhão de UFC, *L. bulgaricus* com 2 bilhões de UFC, *Bifidobacterium breve* com 2 bilhões de UFC, *B. longum* com 2 bilhões de UFC e *Streptococcus thermophilus* com 2 bilhões de UFC, juntamente com 100 mg do prebiótico fruto-oligossacarídeo, mostraram que o consumo desse suplemento apresentou redução significativa dos níveis séricos de PCR no grupo que recebeu a suplementação quando comparado com o grupo placebo³¹.

No estudo de Toumi et al.³² foi avaliado o efeito potencial de um coquetel composto por quatro cepas

bacterianas vivas (*L. acidophilus*, *L. plantarum*, *B. lactis* e *B. breve*) em um experimento animal. Após indução e estabelecimento de lesão intestinal por dextran sulfato de sódio (DSS), foi administrado o coquetel de probióticos aos camundongos por gavagem oral. Nesse experimento, o nível de produção plasmática de IFN- γ na colite induzida foi reduzida após suplementação de probiótico; porém, no presente estudo, não foi observada diferença significativa.

No sistema hematopoiético, frequentemente observa-se anemia não regenerativa normocítica e normocrômica³³. Diferentes fatores favorecem seu desenvolvimento durante a progressão da DRC, dentre eles: redução no tempo de vida do eritrócito; redução da concentração de glutatona eritrocitária; deficiência de folatos e vitamina B, eliminadas em excesso devido à poliúria e ingestão insuficiente desses nutrientes; déficit de ferro, devido à baixa ingestão e absorção intestinal e a déficit de eritropoietina devido à redução de massa renal e, conseqüentemente, sua produção³⁴.

Em consonância com os resultados do presente trabalho, em relação ao aumento de hemoglobina e hematócrito no grupo suplementado, quando comparado ao grupo placebo, no estudo de Sakai et al.³⁵, ao realizar um ensaio experimental com grupo controle, verificou-se que a adição de suplemento probiótico em ração de ratos gastrectomizados estimulou a absorção de ferro no intestino grosso, embora sendo mínima. Em outro trabalho com desenho semelhante, Ohta et al.³⁶ constataram a eficácia da suplementação com prebióticos sobre o hematócrito e hemoglobina, prevenindo a anemia em um experimento com ratos.

Este estudo apresentou algumas limitações, como a realização do estudo em um único centro de diálise, o número restrito de participantes e o tempo de seguimento. Também não foi possível realizar análise de ingestão alimentar, que tem influência sobre a microbiota dos pacientes e pode interferir nos resultados. Entretanto, os achados apontam evidências do benefício da suplementação de probióticos nesse grupo de pacientes.

Em conclusão, o uso de probióticos na DRC avançada esteve associado à redução dos níveis de syndecan-1 e glicemia, sinalizando possível melhora no metabolismo e redução do processo inflamatório sistêmico. Por se tratar de uma amostra pequena de

pacientes, não foi possível fazer análise estatística mais avançada, incluindo regressão logística, ou avaliar o efeito de fatores que pudessem confundir. São necessários estudos com maior tempo de seguimento e em outros estágios da DRC para conhecer melhor os efeitos dos probióticos nessa doença.

AGRADECIMENTOS

À farmácia de manipulação BioPhormula e Galena Farmacêutica, pela doação dos probióticos, sem conflito de interesse e financeiro com os autores da pesquisa.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), pelo apoio financeiro e estímulo à pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelas bolsas de produtividade concedidas aos pesquisadores AMCM, EFD e GBSJ.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

EMRA: Elaboração do projeto, coleta de dados, análise dos dados, escrita e revisão do manuscrito. GCM: Análise dos dados, escrita e revisão do manuscrito. AAFC: Análise dos dados, escrita e revisão do manuscrito. AMCM: Escrita e revisão do manuscrito. EFD: Escrita e revisão do manuscrito. GBSJ: Orientação, elaboração do projeto, coleta de dados, análise dos dados, escrita e revisão do manuscrito.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não haver nenhum conflito de interesse referente a este estudo.

REFERÊNCIAS

- Nerbass FB, Lima HN, Thomé FS, Vieira Neto OM, Lugon JR, Sesso R. Brazilian Dialysis Survey 2020. *J Bras Nefrol* [Preprint]. 2022. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/2175-8239-JBN-2021-0198>. PubMed PMID: 35212702.
- Alkchurin OM, Kaskel F. Update on inflammation in chronic kidney disease. *Blood Purif*. 2015;39(1-3):84-92. doi: <http://dx.doi.org/10.1159/000368940>. PubMed PMID: 25662331.
- Feng Z, Wang T, Dong S, Jiang H, Zhang J, Raza HK, et al. Association between gut dysbiosis and chronic kidney disease: a narrative review of the literature. *J Int Med Res*. 2021;49(10):3000605211053276. doi: <http://dx.doi.org/10.1177/03000605211053276>. PubMed PMID: 34704483.
- Koppe L, Mafrá D, Fouque D. Probiotics and chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2015;88(5):958-66. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/ki.2015.255>. PubMed PMID: 26376131.
- Fagundes RAB, Soder TF, Grokoski KC, Benetti F, Mendes RH. Probiotics in the treatment of chronic kidney disease: a systematic review. *J Bras Nefrol*. 2018;40(3):278-86. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/2175-8239-jbn-3931>. PubMed PMID: 29958304.

- Liu J, Zhong JY, Yang HC, Wang DQ, Zhang Y, Yang YM, et al. Biotic supplements in patients with chronic kidney disease: meta-analysis of randomized controlled trials. *J Ren Nutr*. 2022;32(1):10-21. doi: <http://dx.doi.org/10.1053/j.jrn.2021.08.005>. PubMed PMID: 34666930.
- Muslimovic A, Tulumovic D, Hasanspahic S, Hamzic-Mehmedbasic A, Temimovi R. Serum Cystatin C: marker of inflammation and cardiovascular morbidity in chronic kidney disease stages 1-4. *Mater Sociomed*. 2015;27(2):75-8. doi: <http://dx.doi.org/10.5455/msm.2015.27.75-78>. PubMed PMID: 26005379.
- Maheshwari KU, Santhi S, Malar RJ. Cystatin C: an alternative alternative dialysis adequacy marker in high flux hemodialysis. *Indian J Nephrol*. 2015;25(3):143-5. doi: <http://dx.doi.org/10.4103/0971-4065.139489>. PubMed PMID: 26060362.
- Chakraborty S, Kaur S, Guha S, Batra SK. The multifaceted roles of neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) in inflammation and cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1826(1):129-69. PubMed PMID: 22513004.
- Yigit IP, Celiker H, Dogukan A, Ilhan N, Gurel A, Ulu R, et al. Can serum NGAL levels be used as an inflammation marker on hemodialysis patients with permanent catheter? *Ren Fail*. 2015;37(1):77-82. doi: <http://dx.doi.org/10.3109/0886022X.2014.975133>. PubMed PMID: 25347233.
- Lempert KD. Probiotics and CKD progression: are creatinine-based estimates of GFR applicable? *Am J Kidney Dis*. 2019;74(4):429-31. doi: <http://dx.doi.org/10.1053/j.ajkd.2019.02.003>. PubMed PMID: 30910371.
- Gesualdo GD, Zazzetta MS, Say KG, Orlandi FS. Factors associated with the frailty of elderly people with chronic kidney disease on hemodialysis. *Cien Saude Colet*. 2016;21(11):3493-8. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/1413-812320152111.18222015>. PubMed PMID: 27828582.
- World Health Organization. WHO child growth standards: length/height for age, weight-for-age, weight-for-length, weight-for-height and body mass index-for-age, methods and development. Geneva: WHO; 2006. 312 p. [citado em 2022 jan 30]. Disponível em: <https://www.who.int/publications/item/924154693X>
- Brasil, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 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 União*; Brasília; 12 nov 2003 [citado em 2022 abr 6]. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/34379969/do1-2018-07-27-resolucao-da-diretoria-colegiada-rdc-n-243-de-26-de-julho-de-2018-34379917
- Ikizler TA, Cuppari L. The 2020 updated KDOQI clinical practice guidelines for nutrition in chronic kidney disease. *Blood Purif*. 2021;50(4-5):667-71. doi: <http://dx.doi.org/10.1159/000513698>. PubMed PMID: 33652433.
- Amidon GL, Lennernas H, Shah VP, Crison JR. A theoretical basis for a biopharmaceutics drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vitro bioavailability. *Pharm Res*. 1995;12(3):413-20. doi: <http://dx.doi.org/10.1023/A:1016212804288>. PubMed PMID: 7617530.
- Ferreira AO. Guia prático da farmácia magistral. 3a ed. São Paulo: Pharmabooks; 2008. 410 p.
- Colombo M, Todorov SD, Eller M, Nero LA. The potential use of probiotic and beneficial bacteria in the Brazilian dairy industry. *J Dairy Res*. 2018;85(4):487-96. doi: <http://dx.doi.org/10.1017/S0022029918000845>. PubMed PMID: 30444209.
- Wang P, Peng Y, Guo Y, Zhao Y. The efficacy of probiotic on inflammatory cytokines in patients with chronic kidney disease: a protocol for systemic review and meta-analysis. *Medicine*. 2021;100(26):e26422. doi: <http://dx.doi.org/10.1097/MD.00000000000026422>. PubMed PMID: 34190163.

20. 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(2):349-55. doi: <http://dx.doi.org/10.1159/000189334>. PubMed PMID: 8893154.
21. Poesen R, Meijers B, Evenepoel P. The colon: an overlooked site for therapeutics in dialysis patients. *Semin Dial*. 2013;26(3):323-32. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/sdi.12082>. PubMed PMID: 23458264.
22. Götte M. Syndecans in inflammation. *FASEB J*. 2003;17(6):575-91. doi: <http://dx.doi.org/10.1096/fj.02-0739rev>. PubMed PMID: 12665470.
23. Savery MD, Jiang JX, Park PW, Damiano ER. The endothelial glycocalyx in syndecan-1 deficient mice. *Microvasc Res*. 2013;87:83-91. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mvr.2013.02.001>. PubMed PMID: 23428342.
24. Zhang S, Qing Q, Wang Q, Xu J, Zhi F, Park PW, et al. Syndecan-1 and heparanase: potential markers for activity evaluation and differential diagnosis of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2013;19(5):1025-33. doi: <http://dx.doi.org/10.1097/MIB.0b013e318280298f>. PubMed PMID: 23511033.
25. Le B, Yang SH. Efficacy of *Lactobacillus plantarum* in prevention of inflammatory bowel disease. *Toxicol Rep*. 2018;5:314-7. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.02.007>. PubMed PMID: 29854599.
26. Peng Z, Ban K, Sen A, Grill R, Park P, Costantini TW, et al. Syndecan 1 plays a novel role in enteral glutamine's gut-protective effects of the posts ischemic gut. *Shock*. 2012;38(1):57-62. doi: <http://dx.doi.org/10.1097/SHK.0b013e31825a188a>. PubMed PMID: 22706022.
27. Thushara RM, Gangadaran S, Solati Z, Moghadasian MH. Cardiovascular benefits of probiotics: a review of experimental and clinical studies. *Food Funct*. 2016;7(2):632-42. doi: <http://dx.doi.org/10.1039/C5FO01190F>. PubMed PMID: 26786971.
28. Soleimani A, Mojarrad MZ, Bahmani F, Taghizadeh M, Ramezani M, Tajabadi-Ebrahimi M, et al. Probiotic supplementation in diabetic hemodialysis patients has beneficial metabolic effects. *Kidney Int*. 2017;91(2):435-42. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.kint.2016.09.040>. PubMed PMID: 27927601.
29. Miraghajani M, Dehsoukhteh SS, Rafie N, Hamedani SG, Sabihi S, Ghiasvand R. Potential mechanisms linking probiotics to diabetes: a narrative review of the literature. *Sao Paulo Med J*. 2017;135(2):169-78. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/1516-3180.2016.0311271216>. PubMed PMID: 28538869.
30. Ranganathan N, Ranganathan P, Friedman EA, Joseph A, Delano B, Goldfarb DS, et al. Pilot study of probiotic dietary supplementation for promoting healthy kidney function in patients with chronic kidney disease. *Adv Ther*. 2010;27(9):634-47. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s12325-010-0059-9>. PubMed PMID: 20721651.
31. Asemi Z, Zare Z, Shakeri H, Sabihi SS, Esmailzadeh A. Effect of multispecies probiotic supplements on metabolic profiles, hs-CRP, and oxidative stress in patients with type 2 diabetes. *Ann Nutr Metab*. 2013;63(1-2):1-9. doi: <http://dx.doi.org/10.1159/000349922>. PubMed PMID: 23899653.
32. Toumi R, Soufli I, Raza H, Belkhef M, Biad A, Touil-Boukoffa C. Probiotic bacteria *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* attenuate inflammation in dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in mice. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2014;27(4):615-27. doi: <http://dx.doi.org/10.1177/039463201402700418>. PubMed PMID: 25572742.
33. Scott MA. *Fundamentals of veterinary clinical pathology*. 2nd ed. New Jersey: Blackwell Publishing; 2008.
34. MacDougall RC. Role of uremic toxins in exacerbating anemia in renal failure. *Kidney Int Suppl*. 2001;78:S67-72. doi: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1523-1755.2001.59780067.x>. PubMed PMID: 11168986.
35. Sakai K, Ohta A, Shiga K, Takasaki M, Tokunaga T, Hara H. The cecum and dietary short-chain fructooligosaccharides are involved in preventing postgastrectomy anemia in rats. *J Nutr*. 2000;130(6):1608-12. doi: <http://dx.doi.org/10.1093/jn/130.6.1608>. PubMed PMID: 10827217.
36. Ohta A, Ohtsuki M, Baba S, Takizawa T, Adachi T, Kimura S. Dietary Fructooligosaccharides on the absorption of iron, calcium and magnesium in iron-deficient anemic rats. *J Nutr Sci Vitaminol*. 1995;41(3):281-91. doi: <http://dx.doi.org/10.3177/jnsv.41.281>.