

Laila Santos de Andrade

**EFEITO DO USO DA FARINHA DE BANANA VERDE SOBRE
TOXINAS URÊMICAS DERIVADAS DO METABOLISMO DA
MICROBIOTA INTESTINAL EM PACIENTES EM DIÁLISE
PERITONEAL**

Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo – Escola Paulista de
Medicina para obtenção do título de
Doutora em Ciências.

São Paulo

2020

Laila Santos de Andrade

**EFEITO DO USO DA FARINHA DE BANANA VERDE SOBRE
TOXINAS URÊMICAS DERIVADAS DO METABOLISMO DA
MICROBIOTA INTESTINAL EM PACIENTES EM DIÁLISE
PERITONEAL**

Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo – Escola Paulista de
Medicina para obtenção do título de
Doutora em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Lilian Cuppari

São Paulo

2020

Ficha catalográfica

de Andrade, Laila Santos

Efeito do uso da farinha de banana verde sobre toxinas urêmicas derivadas do metabolismo da microbiota intestinal em pacientes em diálise peritoneal / Laila Santos de Andrade – São Paulo, 2020.

xii, 80f.

Tese (Doutorado)—Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Nutrição.

Título em inglês: Effect of unripe banana flour on gut-derived uremic toxins in individuals undergoing peritoneal dialysis.

1. Suplementação dietética. 2. Prebióticos. 3. Doença renal crônica. 4. Diálise peritoneal.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

Coordenador do curso de pós-graduação:

Profa. Dra. Eliane Beraldi Ribeiro

LAILA SANTOS DE ANDRADE

EFEITO DO USO DA FARINHA DE BANANA VERDE SOBRE TOXINAS
URÊMICAS DERIVADAS DO METABOLISMO DA MICROBIOTA
INTESTINAL EM PACIENTES EM DIÁLISE PERITONEAL

Banca examinadora:

Profa. Dra. Denise Mafra

Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara

Profa. Dra. Claudia Cristina Alves Pereira

Profa. Dra. Maria Claudia Cruz Andreoli

Profa. Dra. Lila Missae Oyama (Suplente)

Prof. Dr. Rodrigo Bueno de Oliveira (Suplente)

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”. (Albert Einstein)

*Dedico esta tese aos meus queridos pais, Lílian e Fernando, que
sempre me apoiaram e incentivaram nessa jornada.*

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar a Deus, pela oportunidade da vida, pelo amparo em todos os momentos, por todas as oportunidades de aprendizado, por todas as pessoas maravilhosas e queridas que tive e tenho ao meu lado nessa jornada chamada vida! Agradeço por tudo!

À minha família amada, que é a minha base, meu porto seguro, uma dádiva de Deus em minha vida. Sou infinitamente grata por todo o apoio, carinho, compreensão, paciência e tudo que vem como consequência do amor que nos une.

À minha querida orientadora, Profa. Dra. Lillian Cuppari, agradeço por todo o apoio, pelo exemplo de competência e compromisso com a ciência e pelas oportunidades de aprendizado que me proporcionou desde a especialização até agora. Foram muitas experiências enriquecedoras. Sou muito grata por tudo que pude aprender com você ao longo desses anos. Eu te admiro muito!

Ao Danilo Aoike, por todo suporte na análise estatística e pela amizade.

À Profa. Dra. Lía Nakao que abriu as portas do laboratório na UFPR e me recebeu com muita atenção e me deu todo o suporte necessário para a dosagem das toxinas urêmicas.

À querida Silvia Daniéle pela dedicação e comprometimento em todo o processo de dosagem das toxinas urêmicas. Assim como por ter me acolhido com tanto carinho em Curitiba e especialmente no laboratório onde passamos vários dias.

À Fabiana Sardá que foi a principal responsável por viabilizar a produção da farinha de banana verde. Ela foi incansável diante dos obstáculos que apareceram.

Ao Prof. Dr. Christian Hoffmann pelo apoio na produção da farinha de banana verde e por ter aberto as portas do seu laboratório e do seu grupo de pesquisa.

À Natália e à Renata pela imensa contribuição em diferentes etapas do protocolo de estudo.

À Prof. Dra. Claudia Cristina Alves, minha querida orientadora da iniciação científica, a responsável por me colocar neste universo “intestino/microbiota, pré, pró e simbióticos”. Sou muito grata por todos os ensinamentos, conselhos, pelo carinho, confiança e incentivo para que eu seguisse na área acadêmica.

Às minhas queridas amigas, Natí, Raí e Bru, pelo apoio, incentivo, acolhimento, por todas as nossas conversas, reflexões e momentos descontraídos.

A todos os amigos que torceram por mim nesta caminhada.

A todos os meus colegas da pós-graduação, com os quais sempre pude aprender bastante, tanto no que diz respeito à academia como em relação a diversos aspectos da vida.

A todas as pessoas de todos os laboratórios diferentes pelos quais passei ao longo do processo de realização deste estudo.

A todas que voluntariamente contribuíram no processo de produção da farinha de banana verde, especialmente à Fabiana Lima que esteve presente em todos os momentos. Foram semanas de muito trabalho braçal!

Aos pacientes que voluntariamente participaram do estudo e a todos os pacientes que na rotina de atendimento contribuíram com o meu crescimento profissional e pessoal.

À Camila, Vanessa e Maíra, enfermeiras do ambulatório de diálise peritoneal, por todo suporte no processo de inclusão dos participantes e ao longo do período de coleta dos materiais biológicos.

À enfermeira Sílvia por todo auxílio na organização da dinâmica da coleta.

A todos os funcionários da Fundação Oswaldo Ramos, pela assistência em tudo que foi necessário e pelo ambiente de trabalho agradável.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para realização deste trabalho e com meu crescimento profissional e pessoal, seja por meio de apoio intelectual, material ou emocional.

Apresentação

A presente tese foi estruturada da seguinte forma: Resumo, *Abstract*, Fundamentação científica, Objetivos, Artigo a ser submetido à publicação e Conclusão. Essa estrutura segue as normas do Programa de Pós-Graduação em Nutrição, que tem como objetivo principal garantir a redação do artigo científico ainda no período da pós-graduação, favorecendo o processo de publicação dos mesmos.

As contribuições da banca avaliadora foram incorporadas à tese e ao artigo que foi submetido à publicação.

Este trabalho recebeu apoio das seguintes instituições:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Fundação Oswaldo Ramos – Hospital do Rim

Sumário

Dedicatória	vi
Agradecimentos	vii
Apresentação	xi
Resumo	4
Abstract	6
1. FUNDAMENTAÇÃO CIENTÍFICA	8
1.1 Doença Renal Crônica.....	8
1.2 Intestino	10
1.2.1 Microbiota	10
1.2.2 Barreira intestinal	12
1.3 Intestino na DRC	14
1.3.1 Microbiota intestinal na DRC	14
1.3.2 Barreira intestinal na DRC	15
1.4 Intervenções com foco no intestino e na microbiota intestinal na DRC	16
1.4.1 Amido resistente e farinha de banana verde.....	17
2. OBJETIVOS	25
3. REFERÊNCIAS	27
4. ARTIGO SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO	39
5. CONCLUSÃO	70
Anexos	

Lista de abreviaturas

DRC	Doença renal crônica
TFG	Taxa de filtração glomerular
HD	Hemodiálise
DP	Diálise peritoneal
PCR	Proteína C-reativa
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
IS	Indoxil sulfato
pCS	p-cresil sulfato
IAA	Ácido indol 3-acético
Treg	Célula T reguladora
OTU	Unidades taxonômicas operacionais
FOS	Fruto-oligossacarídeos
GOS	Galacto-oligossacarídeos
AR	Amido resistente
FBV	Farinha de banana verde

Introdução: Vários metabólitos derivados do metabolismo microbiano compõem o metaboloma sérico dos mamíferos, tais como o indoxil sulfato (IS), p-cresil sulfato (pCS) e o ácido indol 3-acético (IAA). Na doença renal crônica (DRC), o acúmulo destes metabólitos tem sido associado à inflamação, doença cardiovascular e mortalidade por todas as causas. Nesse contexto, a fim de atenuar o acúmulo destes metabólitos, os prebióticos surgem como uma possível estratégia. **Objetivos:** Avaliar o efeito da farinha de banana verde (FBV- 48% de amido resistente) sobre os níveis séricos de IS, pCS, IAA, marcadores inflamatórios (IL-6, TNF- α , IL-10 e PCR), permeabilidade intestinal e sintomas gastrointestinais em indivíduos em programa de diálise peritoneal (DP). **Metodologia:** Trata-se de um ensaio clínico randomizado, controlado por placebo, duplo-cego, cruzado. Quarenta e três indivíduos em DP foram alocados para o grupo FBV (21 g/dia) ou placebo (amido de milho ceroso- 12 g/dia), por 4 semanas. Após a conclusão deste período, os participantes passaram por um período de *washout* de 4 semanas e na sequência utilizaram o suplemento oposto. As concentrações de IS, pCS e IAA foram determinadas por cromatografia líquida de alta performance (HPLC); os níveis séricos de IL-6, TNF- α , IL-10 foram determinados pela tecnologia xMAP da Luminex®; a permeabilidade intestinal foi avaliada por meio da dosagem de endotoxinas no soro; os sintomas gastrointestinais por meio da Escala de Avaliação de Sintomas Gastrointestinais (GSRS) e a ingestão dietética por meio do registro alimentar de três dias alternados. **Resultados:** Dos 43 pacientes incluídos, 26 completaram o estudo [idade= 55 $\pm$ 12 anos; homens- 53,8%; diabetes- 34,6%; diurese residual- 84,6%; tempo em diálise peritoneal= 16 (5-31) meses]. A FBV não promoveu mudanças nos níveis séricos de IS (p=0,70), pCS (p=0,70) e IAA (p=0,74). Uma redução no nível sérico de IS foi observada em um subgrupo de participantes que apresentaram uma ingestão diária de FBV mais próxima da dose proposta no protocolo de estudo [n=11; placebo: mediana 79,5 μ mol/L (31-142) *versus* FBV: 62,5 μ mol/L (31-133), p= 0,009]. Dentre os períodos do estudo, nenhuma diferença foi observada na ingestão alimentar habitual, na excreção urinária dos metabólitos estudados, assim como na remoção dos mesmos pelo processo dialítico. Nenhuma diferença foi encontrada nos demais parâmetros analisados. **Conclusão:** A FBV não afetou os níveis séricos de IS, pCS e IAA. Apenas no subgrupo de participantes que tiveram uma ingestão diária de FBV próxima da dose proposta no estudo foi observada redução no IS.

ABSTRACT

Introduction: Gut-derived metabolites, such as indoxyl sulfate (IS), p-cresyl sulfate (pCS) and indole 3-acetic acid (IAA), are part of the mammalian serum metabolome. In chronic kidney disease (CKD), the accumulation of these metabolites has been associated to inflammation, cardiovascular disease and mortality from all causes. In this context, prebiotics emerge as a strategy to mitigate the accumulation of such compounds, by modulating gut microbiota and production of their metabolites.

Objectives: To evaluate the effect of unripe banana flour (UBF- 48% of resistant starch, a prebiotic) on serum concentrations of IS, pCS and IAA and on serum inflammatory biomarkers (IL-6, TNF- α , IL-10 e CRP), intestinal permeability and gastrointestinal symptoms in individuals undergoing peritoneal dialysis (PD).

Methods: A randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial was conducted. Forty-three individuals on PD were randomized to sequential treatment with UBF (21 g/day) and placebo (waxy corn starch- 12 g/day) for 4 weeks, or vice versa. Between both interventions there was a 4-week washout. Serum concentration of IS, pCS and IAA was determined by high performance liquid chromatography (HPLC); serum levels of IL-6, TNF- α , IL-10 were determined by Luminex® xMAP technology; intestinal permeability was assessed by measuring endotoxins in serum; gastrointestinal symptoms by Gastrointestinal Symptom Rating Scale (GSRS) and dietary intake by food record of three alternate days. **Results:** Of 43 individuals randomized, 26 completed the follow-up [age= 55 $\pm$ 12; 53.8% men; 34.6% with diabetes; 84.6% with residual diuresis; dialysis vintage= 16 (5-31) months]. UBF did not promote changes in serum levels of IS (p=0.70), pCS (p=0.70) e IAA (p=0.74). Reduction in serum total IS was observed in a subgroup of participants who had a daily UBF intake closer to that proposed in the study [n=11; placebo: median 79.5 μ mol/L (31-142) versus UBF: 62.5 μ mol/L (31-133), p= 0.009]. This finding was independent of habitual dietary intake and urinary excretion and dialysis removal of IS. No changes were observed in the other analyzed parameters. **Conclusion:** UBF did not affect either the serum levels of IS or pCS and IAA, a decrease in IS was only found in the subgroup of participants who had a daily UBF intake closer to that proposed in the study.

1. FUNDAMENTAÇÃO CIENTÍFICA

1.1 Doença renal crônica

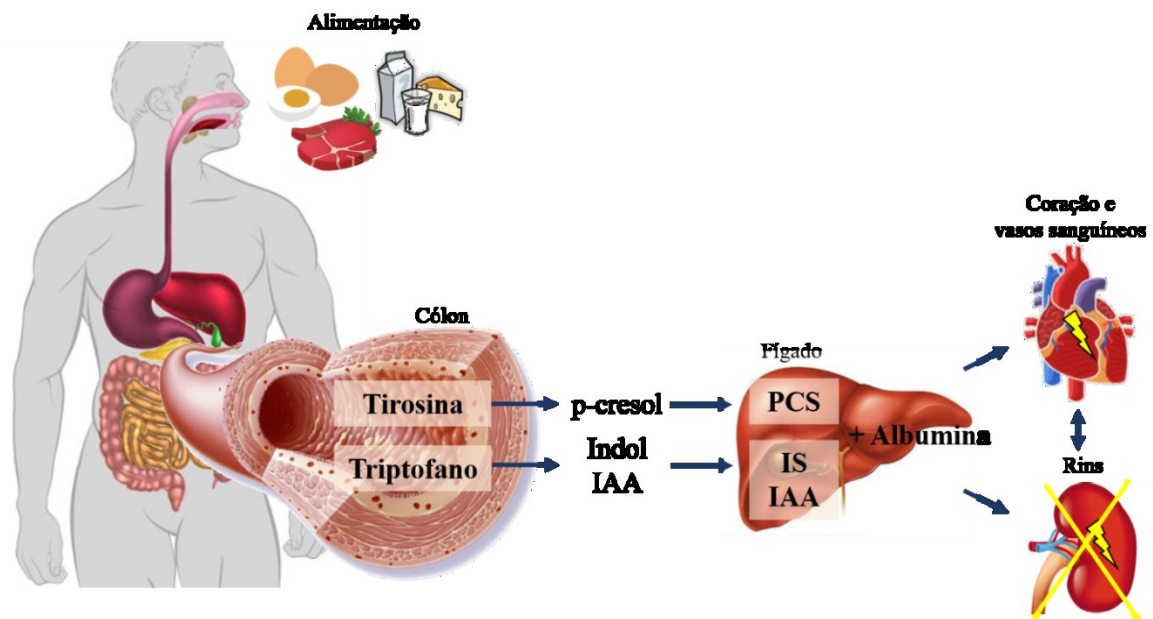
A doença renal crônica (DRC) é um dos principais problemas de saúde pública em todo o mundo. As principais causas de DRC são a hipertensão e o diabetes. A cada ano o número total estimado de pacientes em tratamento dialítico no Brasil aumenta. Em 2017 o número total de pacientes em diálise crônica no Brasil foi estimado em 126.538, o que indica um aumento de 3% em relação ao ano anterior. E em um período de cinco anos (2012 a 2017) o aumento foi de aproximadamente 30% (1).

A doença renal crônica (DRC) caracteriza-se por anormalidades estruturais ou funcionais do rim, presentes por mais de três meses, com implicações para saúde. A classificação da DRC é feita em seis categorias, considerando a taxa de filtração glomerular (TFG) em ml/min/1,73m^2 e marcadores de lesão na estrutura renal: estadio 1 (TFG ≥ 90 + albuminúria), estadio 2 (TFG 60-89 + albuminúria), estadio 3a (TFG 45-59), estadio 3b (TFG 30-44), estadio 4 (TFG 15-29) e estadio 5 (TFG < 15 -dependente ou não de diálise). A taxa de filtração glomerular entre 10 e 15 está geralmente associada a sinais e sintomas clínicos de uremia e fazem parte da indicação para início de terapia renal substitutiva (hemodiálise, diálise peritoneal ou transplante renal) (2). Da população em diálise no Brasil estima-se que 91% realizam hemodiálise e 7% diálise peritoneal (1). A hemodiálise (HD) compreende o processo de transferência de solutos e água entre o sangue e o líquido de diálise, por meio de uma membrana semipermeável artificial enquanto que na diálise peritoneal (DP) essa troca é feita através da membrana peritoneal (3). A perda de função renal residual é mais lenta na DP do que na HD. Os fatores responsáveis por essa diferença não são conhecidos, mas sugere-se que a hipovolemia durante as sessões de HD pode ser um dos principais responsáveis (4).

Como consequência da redução das funções renais e também da própria terapia dialítica, os indivíduos com DRC apresentam inúmeras complicações. Dentre elas estão a anemia, acidose metabólica, subnutrição, alterações do metabolismo mineral e ósseo, inflamação crônica, imunodeficiência e doenças cardiovasculares (5-7). A inflamação crônica parece ser um importante mediador de complicações associadas à DRC, principalmente no sistema cardiovascular (8). A inflamação está associada à maior risco de óbito cardiovascular e também por todas as causas de

morte em pacientes submetidos à diálise (9). Vários marcadores inflamatórios, como a proteína C-reativa (PCR), fator de necrose tumoral alfa (TNF α), interleucina-6 (IL-6), são preditores de doença cardiovascular (10, 11). Diversos fatores contribuem com o estado inflamatório, tais como a depuração reduzida de citocinas pró-inflamatórias, o próprio processo de diálise, estresse oxidativo, acidose metabólica e a toxicidade urêmica (12).

Devido à redução da função renal, diversos metabólitos que fisiologicamente são excretados pelos rins são retidos, culminando na toxicidade urêmica (13). Parte desses metabólitos, que compõem o metaboloma sérico dos mamíferos, é provenientes da microbiota colônica e como muitos deles são dependentes da excreção renal é esperado encontrá-los também acumulados na DRC (14, 15). Dentre eles estão o indoxil sulfato (IS), o ácido indol 3-acético (IAA) e o p-cresil sulfato (pCS) que são gerados a partir da fermentação bacteriana dos aminoácidos triptofano e tirosina. No cólon distal, a fermentação do triptofano resulta em indol e IAA e a fermentação da tirosina em p-cresol. No fígado e na mucosa colônica o p-cresol e o indol são sulfatados, sendo assim convertidos em pCS e IS, respectivamente (16, 17). No sangue, aproximadamente 90% desses metabólitos circulam ligados à albumina. Devido à ligação ser reversível há um equilíbrio dinâmico entre a fração ligada e a livre. À medida que a fração livre diminui a fração ligada vai sendo disponibilizada (18). Por fim, no rim, a fração livre é excretada por meio da filtração glomerular e a fração ligada por meio de secreção tubular (19). Dessa forma, na DRC, a concentração sérica desses compostos aumenta gradualmente à medida que a função renal diminui, atingindo o nível mais alto em situação de diálise (20, 21). Devido a estes compostos circularem majoritariamente ligados a proteínas séricas, eles são pouco removidos no processo dialítico (21, 22). O acúmulo desses compostos tem sido associado à progressão da DRC (23), inflamação (24, 25), doença cardiovascular (26, 27), e mortalidade por doença cardiovascular e por todas as causas em indivíduos com DRC (28-30). E em estudos experimentais causaram efeitos deletérios em diferentes tecidos e tipos celulares (31-37). A Figura 1 representa a produção desses metabólitos e a toxicidade deles na DRC.



Fonte: Ramos, C.I., 2018 (38)

Figura 1. Representação esquemática da produção de p-cresil sulfato (pCS), indoxil sulfato (IS) e ácido indol 3-acético (IAA) e a toxicidade dos mesmos na DRC.

Nos últimos anos, tem sido sugerido que alterações observadas na composição da microbiota e na permeabilidade intestinal, em consequência da DRC, podem também contribuir com desordens imunológicas e toxicidade urêmica, assim como com a progressão da doença (39).

Nesse contexto, tem se buscado estratégias que possam modular a microbiota intestinal e consequentemente, atenuar complicações associadas à DRC. Dentre elas, destacam-se o aumento na ingestão de alimentos fontes de fibras, o controle da ingestão de proteína e o uso de prebióticos, probióticos e simbióticos (40).

1.2 Intestino

1.2.1 Microbiota

A microbiota intestinal humana é composta por aproximadamente 100 trilhões de bactérias e três milhões de genes bacterianos, 150 vezes mais genes do que o genoma humano (41). Cerca de 90% das espécies bacterianas que compõem a microbiota intestinal humana pertencem aos filos *Bacteroidetes* (*Bacteroides*,

Prevotella e *Xylanibacter*) e *Firmicutes* (*Ruminococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Eubacterium* e *Faecalibacterium*). Em proporções menores, são encontradas espécies pertencentes aos filos *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, e *Verrucomicrobia*. Arqueias metanogênicas, leveduras e vírus também aparecem na composição da microbiota intestinal (41, 42). Recentemente, tem sido sugerido que um aumento na proporção do filo *Proteobacteria*, parece configurar a presença de disbiose intestinal (43).

A composição da microbiota intestinal apresenta grande diversidade. Cada indivíduo possui uma microbiota única e que flutua ao longo do tempo (42). Vários fatores, internos e externos, influenciam o desenvolvimento, a composição e a atividade metabólica da microbiota. Dentre eles destacam-se o tipo de parto e de aleitamento, o contato com o meio ambiente, fatores genéticos, idade, estilo de vida, hábitos alimentares, medicações e a condição de saúde do indivíduo (44, 45). A composição da microbiota varia ao longo do trato gastrointestinal, e também parece variar entre a mucosa e o lúmen intestinal. A maior concentração de micro-organismos e atividade metabólica encontra-se no cólon (46). A microbiota desempenha importantes efeitos fisiológicos no organismo humano interagindo com diferentes sistemas. Dentre eles a produção de energia por meio da fermentação de compostos não digeridos, síntese de vitaminas (47), manutenção da integridade da barreira intestinal (48), produção de bacteriocinas que contribuem com a resistência ou resiliência à infecção por patógenos (49) e influencia sobre o metabolismo e o sistema imunológico do hospedeiro (50-52). Mais recentemente, tem sido sugerido que a microbiota intestinal também influencia o funcionamento do sistema nervoso central do hospedeiro. Na verdade, um diálogo multidirecional entre o intestino (microbiota, sistema imune local e sistema neuroendócrino) e o sistema nervoso central tem sido proposto (50, 53).

A fermentação bacteriana de carboidratos não digeridos proporciona diversos benefícios ao hospedeiro, incluindo a manutenção do pH intestinal adequado por meio da produção de ácido lático, ácido acético e ácidos graxos de cadeia curta (acetato, propionato e butirato). Além disso, os ácidos graxos de cadeia curta são fontes de energia para os colonócitos e nutrientes essenciais para os linfócitos T reguladores (Treg). Essas células possuem um papel importante sobre a integridade da barreira intestinal (54-56).

Além da fermentação dos carboidratos, ocorre também no cólon a fermentação de aminoácidos que não foram absorvidos em porções superiores do intestino. Resultam desta fermentação produtos tais como amônia, aminas, fenóis, indóis, tióis e ácidos graxos de cadeia curta e ramificada (54). A maioria desses metabólitos é normalmente excretada nas fezes e na urina. Dentre esses produtos estão aminas biogênicas, compostos imunomoduladores e outras moléculas de sinalização que parecem estar envolvidas na regulação do sistema imunológico da mucosa intestinal, por meio de mecanismos pró e anti-inflamatórios (17, 57).

Dentre as bactérias que colonizam o intestino humano, há espécies que preferencialmente fermentam carboidratos e utilizam os aminoácidos para o crescimento e outras que preferencialmente fermentam aminoácidos para obter energia. O tipo e a quantidade de substrato disponível no intestino exercem um efeito modulador importante sobre a composição e o metabolismo microbiano. A relação entre a ingestão de fibra e proteína parece ser um dos principais fatores da alimentação que influenciam a composição e o metabolismo microbiano colônico (58-60). Uma ingestão maior de fibras e menor de proteína foi associada a uma menor produção de metabólitos provenientes da fermentação de aminoácidos, tais como p-cresil sulfato e indoxil sulfato, em indivíduos saudáveis (61).

Além dos componentes dietéticos, outros fatores também podem influenciar a composição e o metabolismo da microbiota intestinal, tais como pH intestinal, medicação, tempo de trânsito intestinal, genética do hospedeiro e a presença de doenças. Dessa forma, a quantidade e o tipo de metabólitos produzidos pela microbiota intestinal, assim como a composição da mesma é resultado de interações complexas entre a microbiota, o hospedeiro e o meio intestinal, onde a dieta tem um papel central (54, 62).

1.2.2 Barreira intestinal

O trato gastrointestinal funciona como uma barreira entre o meio externo e interno do corpo. Conforme mencionado anteriormente, o intestino abriga uma comunidade complexa e dinâmica de microrganismos comensais, o que implica em uma constante exposição da superfície da mucosa intestinal a uma grande quantidade de bactérias. A fim de manter uma relação de simbiose entre o

hospedeiro e a microbiota, o sistema imune gastrointestinal desempenha inúmeras atividades. O revestimento epitelial atua como primeira linha de defesa do sistema imune da mucosa, tanto no que diz respeito à proteção contra invasão bacteriana como à tolerância a microrganismos comensais. As células epiteliais, por meio de estruturas de adesão e de junção celular, constituem uma barreira física contra a entrada de bactérias do lúmen ao mesmo tempo em que formam uma barreira seletivamente permeável, permitindo a passagem de nutrientes, íons e água (63-65). Estímulos fisiológicos ou até mesmo patológicos regulam a permeabilidade intestinal, por meio de modificações nas estruturas envolvidas nos mecanismos de adesão e junção celular (63). As junções ocludentes, também conhecidas como “tight junctions” ou “zonula occludens”, se dispõem em forma de cinturão ao redor da porção apical da célula epitelial e tem como função limitar a difusão passiva de íons e pequenas moléculas através do espaço intercelular, controlando assim o transporte paracelular. Nutrientes, hormônios, citocinas pró-inflamatórias e componentes bacterianos podem regular as junções ocludentes e, por consequência, alterar a permeabilidade do epitélio (66). Além dos enterócitos e colonócitos, outros tipos celulares constituem o epitélio intestinal e também contribuem com a função de barreira do epitélio. Dentre eles, estão células caliciformes secretoras de muco, células de *Paneth* que secretam peptídeos antimicrobianos, células M apresentadoras de antígenos e células enteroendócrinas que produzem e secretam hormônios peptídicos. A atividade e a comunicação dessas células com as células imunológicas localizadas na mucosa intestinal permitem a identificação de componentes presentes no lúmen intestinal e a modulação de diversas atividades, tanto no intestino como em outras partes do corpo, como por exemplo, a secreção de muco, a motilidade intestinal e aspectos do sistema imunológico e do metabolismo energético do hospedeiro (67, 68).

Um equilíbrio rigoroso entre respostas pró e anti-inflamatórias é essencial para a manutenção da relação de simbiose entre o hospedeiro e a microbiota e por consequência para a integridade da barreira intestinal. As células T reguladoras (Treg) exercem um papel central sobre este equilíbrio. Por meio da secreção de interleucina-10 (IL-10), as células Treg atuam sobre diferentes tipos celulares atenuando respostas pró-inflamatórias (65, 69). Conforme mencionado anteriormente, produtos do metabolismo microbiano também contribuem com a

dinâmica de manutenção da barreira intestinal, uma vez que determinados metabólitos possuem efeitos imunomoduladores, como por exemplo, os ácidos graxos de cadeia curta, que geram respostas anti-inflamatórias sobre diferentes tipos celulares e também parecem contribuir com o desenvolvimento de células Treg (56). Inter-relações complexas entre diferentes tipos celulares e a microbiota intestinal garantem a manutenção de uma relação equilibrada entre o hospedeiro e a microbiota.

1.3 Intestino na DRC

1.3.1 Microbiota intestinal na DRC

A DRC vem sendo associada a alterações na composição da microbiota colônica. Diferenças significativas na abundância de diversas unidades taxonômicas operacionais microbianas (OTUs) foram observadas quando comparou-se a composição da microbiota fecal de indivíduos com DRC com indivíduos sem comprometimento de função renal. Um aumento de espécies bacterianas pertencentes aos filos *Proteobacteria*, *Firmicutes* e *Actinobacteria* foi encontrado nos indivíduos com DRC. Dentre as 19 famílias bacterianas dominantes nesses pacientes, 12 possuem bactérias produtoras de urease, 5 de uricase e 3 são produtoras de enzimas formadoras de indol e p-cresol. Dentre as 4 famílias reduzidas nesses pacientes estão duas que possuem bactérias produtoras de enzimas envolvidas na produção de butirato (70). Resultado semelhante foi encontrado em outro estudo em que também se observou redução significativa em duas espécies produtoras de butirato (*Roseburia spp.* e *Faecalibacterium prausnitzii*) em indivíduos com DRC (71). Indiretamente, essas alterações sugerem a configuração de uma microbiota com maior capacidade de produzir toxinas urêmicas e deficitária na produção de metabólitos benéficos, como o butirato. No entanto, alterações na composição da microbiota não implicam necessariamente em alterações no metabolismo colônico (42). Além disso, o aumento de bactérias produtoras de determinadas enzimas também não implica necessariamente em uma atividade maior dessas enzimas e por consequência mudança no perfil metabólico (72).

Até o momento, há poucos estudos que avaliaram a influência da DRC sobre o metabolismo colônico. Recentemente, em um estudo bem desenhado nos diferentes estágios da doença, não se observou aumento de p-cresol e indol nas fezes dos indivíduos com DRC em relação aos indivíduos sem alteração de função renal. Além disso, a partir de cultura *ex vivo* das amostras fecais também não foi encontrada diferença na taxa de produção desses metabólitos entre os indivíduos com DRC e os indivíduos sem a doença (73).

Conforme mencionado anteriormente, na população geral a dieta é um importante modulador do metabolismo colônico. Na DRC, a dieta também parece ser o principal determinante do perfil metabólico da microbiota intestinal. Poesen et al. (74), investigando o perfil metabólico fecal de indivíduos em hemodiálise em relação ao perfil metabólico de indivíduos sem DRC e indivíduos sem DRC que moravam na mesma casa que os pacientes, compartilhando os mesmos hábitos alimentares, observou diferenças no perfil metabólico dos indivíduos em HD apenas quando os comparou com os indivíduos sem DRC não relacionados aos pacientes, sugerindo indiretamente o importante impacto da dieta.

1.3.2 Barreira intestinal na DRC

Há evidências indiretas que associam a DRC com danos a barreira intestinal, ou seja, aumento de permeabilidade intestinal (75), tais como presença de endotoxemia na ausência de infecções (76, 77) e detecção de DNA possivelmente de origem colônica no sangue (78, 79).

Por meio de estudos experimentais com animais, tem-se investigado os possíveis mecanismos envolvidos no aumento da permeabilidade intestinal em condição de DRC. Vaziri et al. (80), em um estudo com ratos urêmicos, observaram danos importantes na barreira intestinal, acompanhados de reduções de 50 a 90% na quantidade de proteínas das junções ocludentes na mucosa colônica. A fim de investigar se o comprometimento das estruturas das junções ocludentes poderia ser decorrente do acúmulo de compostos urêmicos, o mesmo grupo de pesquisadores incubou colonócitos humanos com plasma de indivíduos saudáveis e com plasma urêmico pré e pós-sessão de hemodiálise. O soro urêmico em ambas condições (pré e pós-HD) levou a redução expressiva das proteínas das junções ocludentes,

indicando que compostos presentes no plasma urêmico parecem estar envolvidos no processo de disfunção da barreira intestinal causado pela uremia (81). No entanto, esse mecanismo ainda é controverso. Em um estudo similar, realizado por nosso grupo, utilizando a mesma linhagem de células, não foi observado impacto negativo do soro urêmico (82). É possível que a microbiota faça parte dos mecanismos envolvidos no dano a barreira intestinal. Tem sido sugerido que a catalisação da ureia em amônia pelas bactérias colônicas que produzem a enzima urease afeta negativamente as células do epitélio intestinal. Em um estudo *in vitro* onde células intestinais foram incubadas com ureia em presença de urease observou-se uma acentuada queda na expressão de proteínas das junções ocludentes e na permeabilidade do epitélio (83). Na DRC parece haver um alto influxo de ureia para o trato gastrointestinal, o que pode favorecer a produção de altas quantidades de amônia (84). Uma vez que a microbiota intestinal faz parte do processo de manutenção da integridade da barreira intestinal, considera-se também que as alterações observadas na composição da microbiota de indivíduos com DRC, assim como uma possível redução na produção de ácidos graxos de cadeia curta podem também contribuir com o aumento da permeabilidade intestinal (85).

Apesar de todos esses estudos experimentais, em indivíduos com DRC a presença de aumento na permeabilidade intestinal ainda permanece desconhecida. A avaliação da permeabilidade intestinal por meio de métodos não invasivos ainda é um desafio em estudos clínicos na DRC. Não há métodos validados e alguns dos métodos são influenciados pela função renal (75).

1.4 Intervenções com foco no intestino e na microbiota intestinal na DRC

Considerando o impacto negativo que a DRC parece exercer sobre o intestino e a microbiota intestinal e o fato de que toxinas urêmicas associadas com diversas complicações na DRC são provenientes do metabolismo colônico, estudos a fim de modular a microbiota intestinal e reduzir a produção de determinados metabólitos tem sido desenvolvidos. O aumento da ingestão de fibra (86), o controle da ingestão de proteína (87-89) e a suplementação com prebióticos, probióticos (90, 91) e simbióticos (92, 93) tem se destacado nesse contexto. No presente trabalho, o foco será dado ao aumento da ingestão de fibra e a suplementação com prebióticos.

Prebióticos são substratos utilizados seletivamente por microorganismos do hospedeiro conferindo benefícios à saúde. Dentre estes substratos estão as fibras alimentares facilmente fermentáveis, tais como a inulina, fruto-oligossacarídeos (FOS), galacto-oligossacarídeos (GOS) e amido resistente. Esses carboidratos não digeríveis quando atingem o cólon são fermentados pelas bactérias colônicas, o que lhes confere a capacidade de alterar a composição e a atividade metabólica da microbiota intestinal e consequentemente beneficiar a saúde do hospedeiro (94, 95). Em indivíduos saudáveis, o uso de prebióticos parece ser capaz de reduzir a produção microbiana de pCS e IS (96). Na DRC, apesar do crescente interesse no assunto, ainda há poucas evidências sobre o impacto dos prebióticos sobre os níveis séricos de toxinas urêmicas, tais como o pCS, IS e IAA (97). Conforme é possível observar na Tabela 1, onde estão apresentados os estudos com diferentes tipos de prebióticos na DRC, poucos deles tiveram como objetivo avaliar o impacto sobre os níveis séricos de pCS e IS e os resultados são heterogêneos. Recentemente, a suplementação com amido resistente surgiu como uma possibilidade de reduzir a produção de IS pelas bactérias colônicas, produção essa que não parece ser afetada por outros tipos de prebióticos (Tabela 1).

1.4.1 Amido resistente e farinha de banana verde

O amido é um carboidrato polimérico produzido e armazenado em vários vegetais como fonte de energia. Os grânulos de amido são formados por dois polissacarídeos, amilose e amilopectina. Ambos são constituídos por moléculas de α -glicose. A amilose é um polímero linear enquanto a amilopectina é altamente ramificada. Devido às ramificações a amilopectina é facilmente hidrolisada pela enzima pancreática α -amilase. A proporção de amilose:amilopectina no amido influencia a digestibilidade do amido. Quanto maior a proporção de amilose para amilopectina menor será a digestibilidade do amido (98).

O amido resistente (AR) é definido como amido e produtos da hidrólise do amido que não são absorvidos no intestino delgado (99). O termo amido resistente envolve cinco tipos de amido: AR1, fisicamente inacessível à enzima digestiva, presente em grãos inteiros ou parcialmente moídos; AR2, grânulos de amido resistentes à hidrólise enzimática, encontrado na batata crua, banana verde e no

amido de milho com alto teor de amilose; AR3, amido retrogradado, presente em alimentos cozidos e resfriados (ex.: batata cozida) e em alimentos processados, tais como pães e cereais matinais a base de flocos de milho; AR4, amido quimicamente modificado, formado por meio da adição de ésteres e éteres, presente em alimentos industrializados; AR5, complexo amilose-lipídeo, resistente à hidrólise enzimática (100, 101).

A disponibilidade de AR no cólon parece favorecer a manutenção de uma microbiota intestinal saudável, modulando a composição e atividade metabólica dessa microbiota (102-105). A fermentação desse carboidrato não digerível resulta na produção de ácidos graxos de cadeia curta (acetato, propionato e butirato) (106, 107). Além dos benefícios citados anteriormente, os ácidos graxos de cadeia curta, também atuam sobre o metabolismo de carboidratos e lipídios (108). Diversos pesquisadores têm encontrado efeitos positivos da ingestão de AR sobre os níveis séricos de colesterol (109), balanço de energia (110, 111) e sobre a sensibilidade à insulina (112, 113).

Dentre os alimentos com quantidade significativa de AR, destaca-se a farinha de banana verde (FBV), que apresenta cerca de 50% desse carboidrato (114). Até o momento, há poucos estudos que avaliaram os potenciais benefícios do uso da FBV para a saúde (115). Na DRC, em um estudo com indivíduos em hemodiálise, com diabetes e constipação, observou-se melhora do funcionamento intestinal, redução dos sintomas de desconforto gastrointestinal e redução na glicemia de jejum, com o uso de 11,3 g de FBV (5 g de AR), três vezes por semana, ao longo de seis semanas (116).

Considerando o alto teor de amido resistente da FBV, somado a grande disponibilidade de banana no Brasil e ao baixo custo de produção da farinha (117), a mesma parece ser uma estratégia interessante a ser usada no contexto da DRC, a fim de modular a microbiota intestinal e reduzir a produção de determinados metabólitos, derivados do metabolismo colônico, que se acumulam em consequência a perda da função renal.

Tabela 1. Intervenções com fibras e prebióticos a fim de modular a microbiota e a produção de toxinas urêmicas na presença de DRC

Autores, ano	Desenho e população do estudo	Objetivo	Intervenção	Resultados	Limitações
Bliss et al., 1996 (118)	Estudo clínico randomizado, controlado por placebo, cruzado. Fase não dialítica (n=16)	Avaliar o efeito da intervenção sobre a ureia sérica, excreção fecal de nitrogênio e massa bacteriana nas fezes.	Goma arábica- 50 g/dia 4 semanas	↑ peso fecal e massa bacteriana, ↑ excreção fecal de nitrogênio, ↓ 11% ureia sérica	Tamanho amostral
Younes et al., 2006 (119)	Estudo clínico randomizado, controlado, cruzado. Fase não dialítica (n=9)	Avaliar o efeito da intervenção sobre a excreção urinária e fecal de nitrogênio.	Pão integral (25 g de fibra) + 4.5 g de inulina + 10.5 g de AR/dia 5 semanas	↑ 55% excreção fecal de nitrogênio, ↓ 12% excreção urinária de nitrogênio, ↓ 23% ureia sérica, ↑ 51% peso fecal	Tamanho amostral Ausência de placebo
Meijers et al., 2010 (120)	Estudo clínico não controlado. Hemodiálise (n=20)	Avaliar o efeito da intervenção sobre os níveis séricos de pCS e IS.	Oligofrutose + inulina- 20 g/dia 4 semanas	↓ 20% pCS sérico ↓ ureia sérica IS sérico não mudou.	Tamanho amostral Ausência de grupo controle. Controle de ingestão alimentar não foi relatado.
Salmean et al., 2013 (121)	Estudo clínico não controlado. Fase não dialítica (n=13)	Avaliar o efeito da intervenção sobre os níveis séricos de ureia e creatinina.	Biscoitos e barras de cereais fornecendo 23 g de fibra/dia (fibra de casca de ervilha, fibra de milho e inulina). 4 semanas	↓ 10.6% ureia sérica ↓ creatinina sérica	Tamanho amostral Ausência de grupo controle
Sirich et al., 2014 (122)	Estudo clínico randomizado, controlado. Hemodiálise (n=40)	Avaliar o efeito da intervenção sobre os níveis séricos de pCS e IS.	30 g de Hi-Maize®260/dia (18 g de AR/dia) 6 semanas	↓ 27% IS livre sérico ↓ 17% IS total sérico Tendência ↓ pCS livre Sem diferenças no pCS total e na ureia sérica.	Tamanho amostral. Controle de ingestão alimentar não foi relatado.

Tabela 1. Intervenções com fibras e prebióticos a fim de modular a microbiota e a produção de toxinas urêmicas na presença de DRC

Autores, ano	Desenho e população do estudo	Objetivo	Intervenção	Resultados	Limitações
Khosroshahi et al., 2014 (123)	Estudo clínico não controlado. Fase não dialítica (n=40)	Avaliar o efeito da intervenção sobre parâmetros bioquímicos.	90 mL de xarope de lactulose 8 semanas	Sérico: ↓ ureia ↓ creatinina ↓ ácido úrico ↓ β2-microglobulina	Ausência de grupo controle. Controle de ingestão alimentar não foi relatado.
Salmean et al., 2015 (124)	Estudo clínico não controlado. Fase não dialítica (n=13)	Avaliar o efeito da intervenção sobre o nível sérico de p-cresol, a frequência de evacuações e a qualidade de vida.	Muffins com 10 g de fibra de casca de ervilha + 15 g de inulina 12 semanas	↓ 20% pCS sérico ↑ frequência de evacuações Sem diferenças no escore de qualidade de vida e nível sérico de ureia e creatinina.	Tamanho amostral. Ausência de grupo controle.
Xie et al., 2015 (125)	Estudo clínico randomizado, controlado por placebo. Hemodiálise (n=124)	Avaliar o efeito da intervenção sobre marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo.	10 g ou 20 g de fibra solúvel (não especificada) 6 semanas	Com as duas doses utilizadas: ↓ TNF-α, IL-6, IL-8 e PCR Melhora do perfil lipídico e nos marcadores de estresse oxidativo.	
Poesen et al., 2016 (126)	Estudo clínico randomizado, controlado por placebo, duplo-cego, cruzado. Fase não dialítica (n=39)	Avaliar o efeito da intervenção sobre toxinas urêmicas derivadas do metabolismo microbiano colônico e sobre a resistência à insulina.	20 g de oligossacarídeos de arabinoxilano 4 semanas	↓ TMAO Não houve diferenças nos níveis séricos de pCS, IS, PAG e ureia. HOMA-IR também não mudou.	

Tabela 1. Intervenções com fibras e prebióticos a fim de modular a microbiota e a produção de toxinas urêmicas na presença de DRC

Autores, ano	Desenho e população do estudo	Objetivo	Intervenção	Resultados	Limitações
Khosroshahi et al., 2016 (127)	Estudo clínico randomizado, controlado por placebo. Fase não dialítica (n=32)	Avaliar o efeito da intervenção sobre a microbiota fecal.	90 mL de xarope de lactulose 8 semanas	↓ creatinina sérica ↑ <i>Bifidobacterium</i> e <i>Lactobacillus</i> na microbiota fecal.	Controle de ingestão alimentar não foi relatado.
Elamin et al., 2017 (128)	Estudo clínico não controlado. Fase não dialítica (n=30)	Avaliar o efeito da intervenção sobre os níveis séricos de ureia, toxinas urêmicas e marcadores inflamatórios.	10 g, 20 g ou 40 g de Goma arábica 4 semanas	↓ PCR apenas no grupo com 10 g de goma arábica. Não houve diferenças nas outras variáveis analisadas.	Tamanho amostral. Ausência de grupo controle. Controle de ingestão alimentar não foi relatado.
Ramos et al., 2018 (129)	Estudo clínico randomizado, controlado por placebo, duplo-cego. Fase não dialítica (n=46)	Avaliar o efeito da intervenção sobre toxinas urêmicas derivadas do metabolismo microbiano colônico (pCS, IS e IAA).	FOS- 12 g/dia 12 semanas	Tendência ↓ pCS sérico Não houve diferenças nos níveis séricos de IS e IAA, na excreção urinária de pCS, IS e IAA e nos marcadores inflamatórios avaliados.	Tamanho amostral
Khosroshahi et al., 2018 (130)	Estudo clínico randomizado, controlado por placebo, duplo-cego. Hemodiálise (n=44)	Avaliar o efeito da intervenção sobre marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo.	Biscoitos com 25 g de Hi-Maize®260/dia (15 g de AR) 8 semanas	↓ TNF- α , IL-6 e MDA ↓ ureia e creatinina Não houve diferenças nos níveis séricos de IL-1 β e PCR e na atividade antioxidante total.	Tamanho amostral Controle de ingestão alimentar não foi relatado.

Tabela 1. Intervenções com fibras e prebióticos a fim de modular a microbiota e a produção de toxinas urêmicas na presença de DRC

Autores, ano	Desenho e população do estudo	Objetivo	Intervenção	Resultados	Limitações
Hill et al., 2019 (131)	Estudo clínico não controlado. Fase não dialítica (n=18)	Avaliar a viabilidade de ingestão do produto oferecido e o efeito sobre toxinas urêmicas e marcadores do metabolismo mineral e ósseo.	Beta-glucana de aveia- 3 g/dia 12 semanas	↓ TMAO sérico Não houve diferenças nos níveis séricos de ADMA, Klotho, cálcio e fósforo.	Tamanho amostral. Ausência de grupo controle. Controle de ingestão alimentar não foi relatado.
Laffin et al., 2019 (132)	Estudo clínico randomizado, controlado por placebo, duplo-cego. Hemodiálise (n=20)	Avaliar o efeito da intervenção sobre gêneros bacterianos específicos que parecem estar reduzidos em indivíduos com DRC.	Biscoitos com 25 g de Hi-Maize®260/dia (15 g de AR) 8 semanas	↑ <i>Faecalibacterium</i> Não houve diferença na abundância de <i>Bifidobacteria</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Parabacteroides</i> e <i>Ruminococcus</i>	Tamanho amostral. Controle de ingestão alimentar não foi relatado. Análise da microbiota realizada não contempla o impacto da intervenção sobre outros grupos bacterianos que fazem parte da microbiota.
Khosroshahi et al., 2019 (133)	Estudo clínico randomizado, controlado por placebo, duplo-cego. Hemodiálise (n=44)	Avaliar o efeito da intervenção sobre o nível sérico de toxinas urêmicas.	Biscoitos com 25 g de Hi-Maize®260/dia (15 g de AR) 8 semanas	↓ creatinina e ácido úrico ↓ p-cresol apenas dentro do grupo intervenção. Não houve diferença entre o placebo e a intervenção. IS sérico também não mudou.	Tamanho amostral. Controle de ingestão alimentar não foi relatado.

Tabela 1. Intervenções com fibras e prebióticos a fim de modular a microbiota e a produção de toxinas urêmicas na presença de DRC

Autores, ano	Desenho e população do estudo	Objetivo	Intervenção	Resultados	Limitações
Xiong et al., 2020 (134)	Estudo clínico randomizado, controlado por placebo, duplo-cego, cruzado. Diálise peritoneal (n=15)	Avaliar o efeito da intervenção sobre os níveis de indole e p-cresol fecal, IS e pCS séricos e composição da microbiota fecal.	Inulina- 10 g/dia 12 semanas	Tendência ↓ indole fecal ↓ <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> (espécie produtora de indole) Não houve diferença nos níveis séricos de IS e pCS.	Tamanho amostral O método utilizado para analisar a composição da microbiota fecal é limitado em relação à avaliação de espécies microbianas.
Esgalhado et al., 2020 (135)	Estudo clínico randomizado, controlado por placebo, duplo-cego, cruzado. Hemodiálise (n=26)	Avaliar o efeito da intervenção sobre a inflamação e toxinas urêmicas derivadas do metabolismo microbiano intestinal.	Sessão HD- Biscoitos (9 unidades) com 16 g de AR Dias sem HD- 27 g de Hi-Maize®260 (16 g de AR) 4 semanas	↓ IS sérico Em células mononucleares do sangue: ↑ Nrf2 (expressão gênica) Porém não houve diferença na quantificação da proteína Nrf2. Não houve diferença nos níveis séricos de pCS, IAA, PCR e IL-6.	Tamanho amostral

AR- amido resistente; FOS- frutooligossacarídeos; pCS- sulfato de p-cresil; IS- sulfato de indoxil; IAA- ácido indol3-acético; TMAO- N-óxido de trimetilamina; PAG- fenilacetilglutamina; ADMA- dimetilarginina assimétrica; TNF- α - fator de necrose tumoral alfa; IL-6- interleucina-6; IL-8- interleucina-8; IL-1 β - interleucina-1 beta; PCR- proteína C-reativa; Nrf2- fator nuclear eritroide 2-relacionado ao fator 2; MDA- malondialdeído; HOMA-IR- modelo de avaliação da homeostase para resistência à insulina; HD- hemodiálise.

2. OBJETIVOS

2. Objetivo primário

Avaliar o efeito do uso da farinha de banana verde (FBV) sobre os níveis séricos de indoxil sulfato (IS), p-cresil sulfato (pCS) e ácido indol3-acético (IAA) em indivíduos em diálise peritoneal.

2.1 Objetivos secundários:

Avaliar o efeito do uso da FBV sobre:

- níveis séricos de marcadores inflamatórios: proteína C-reativa (PCR), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-10 (IL-10);
- nível sérico de lipopolissacarídeo (LPS);
- sintomas gastrointestinais.

3. REFERÊNCIAS

1. Thomé FS, Sesso RC, Lopes AA, Lugon JR, Martins CT. Brazilian chronic dialysis survey 2017. *J Bras Nefrol.* 2019;41(2):208-14.
2. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl.* 2013. p. 1-150.
3. Manfredi S, Nadaletto M, Draibe S, Canziani M. Técnicas dialíticas na doença renal crônica. In: Ajzen H, Schor N *Guia de Nefrologia.* 3 ed. Barueri: Manole; 2011.
4. Abensur H, Araújo M. Atualização em diálise peritoneal: Importância da função renal residual na técnica de diálise peritoneal ambulatorial contínua. *Jornal Brasileiro de Nefrologia.* 2000;22(2):110-3.
5. Kaysen GA. The microinflammatory state in uremia: causes and potential consequences. *J Am Soc Nephrol.* 2001;12(7):1549-57.
6. Cachofeiro V, Goicochea M, de Vinuesa SG, Oubiña P, Lahera V, Luño J. Oxidative stress and inflammation, a link between chronic kidney disease and cardiovascular disease. *Kidney Int Suppl.* 2008(111):S4-9.
7. Girndt M, Sester U, Sester M, Kaul H, Köhler H. Impaired cellular immune function in patients with end-stage renal failure. *Nephrol Dial Transplant.* 1999;14(12):2807-10.
8. Carrero JJ, Stenvinkel P. Persistent inflammation as a catalyst for other risk factors in chronic kidney disease: a hypothesis proposal. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009;4 Suppl 1:S49-55.
9. Dai L, Golembiewska E, Lindholm B, Stenvinkel P. End-Stage Renal Disease, Inflammation and Cardiovascular Outcomes. *Contrib Nephrol.* 2017;191:32-43.
10. Stenvinkel P. Inflammation in end-stage renal disease: the hidden enemy. *Nephrology (Carlton).* 2006;11(1):36-41.
11. Menon V, Wang X, Greene T, Beck GJ, Kusek JW, Marcovina SM, et al. Relationship between C-reactive protein, albumin, and cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis.* 2003;42(1):44-52.
12. Akchurin OM, Kaskel F. Update on inflammation in chronic kidney disease. *Blood Purif.* 2015;39(1-3):84-92.
13. Vanholder R, De Smet R, Glorieux G, Argilés A, Baurmeister U, Brunet P, et al. Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability. *Kidney Int.* 2003;63(5):1934-43.
14. Wikoff WR, Anfora AT, Liu J, Schultz PG, Lesley SA, Peters EC, et al. Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(10):3698-703.

-
15. Mair RD, Sirich TL, Plummer NS, Meyer TW. Characteristics of Colon-Derived Uremic Solutes. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2018;13(9):1398-404.
 16. Mafra D, Barros AF, Fouque D. Dietary protein metabolism by gut microbiota and its consequences for chronic kidney disease patients. *Future Microbiol*. 2013;8(10):1317-23.
 17. Gao J, Xu K, Liu H, Liu G, Bai M, Peng C, et al. Impact of the Gut Microbiota on Intestinal Immunity Mediated by Tryptophan Metabolism. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018;8:13.
 18. Deltombe O, Van Biesen W, Glorieux G, Massy Z, Dhondt A, Eloot S. Exploring Protein Binding of Uremic Toxins in Patients with Different Stages of Chronic Kidney Disease and during Hemodialysis. *Toxins (Basel)*. 2015;7(10):3933-46.
 19. Sirich TL, Aronov PA, Plummer NS, Hostetter TH, Meyer TW. Numerous protein-bound solutes are cleared by the kidney with high efficiency. *Kidney Int*. 2013;84(3):585-90.
 20. Lin CJ, Chen HH, Pan CF, Chuang CK, Wang TJ, Sun FJ, et al. p-Cresylsulfate and indoxyl sulfate level at different stages of chronic kidney disease. *J Clin Lab Anal*. 2011;25(3):191-7.
 21. Sirich TL, Funk BA, Plummer NS, Hostetter TH, Meyer TW. Prominent accumulation in hemodialysis patients of solutes normally cleared by tubular secretion. *J Am Soc Nephrol*. 2014;25(3):615-22.
 22. Lesaffer G, De Smet R, Lameire N, Dhondt A, Duym P, Vanholder R. Intradialytic removal of protein-bound uraemic toxins: role of solute characteristics and of dialyser membrane. *Nephrol Dial Transplant*. 2000;15(1):50-7.
 23. Wu IW, Hsu KH, Lee CC, Sun CY, Hsu HJ, Tsai CJ, et al. p-Cresyl sulphate and indoxyl sulphate predict progression of chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2011;26(3):938-47.
 24. Rossi M, Campbell KL, Johnson DW, Stanton T, Vesey DA, Coombes JS, et al. Protein-bound uremic toxins, inflammation and oxidative stress: a cross-sectional study in stage 3-4 chronic kidney disease. *Arch Med Res*. 2014;45(4):309-17.
 25. Borges NA, Barros AF, Nakao LS, Dolenga CJ, Fouque D, Mafra D. Protein-Bound Uremic Toxins from Gut Microbiota and Inflammatory Markers in Chronic Kidney Disease. *J Ren Nutr*. 2016;26(6):396-400.
 26. Rossi M, Campbell K, Johnson D, Stanton T, Pascoe E, Hawley C, et al. Uraemic toxins and cardiovascular disease across the chronic kidney disease spectrum: an observational study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2014;24(9):1035-42.

27. Dou L, Sallée M, Cerini C, Poitevin S, Gondouin B, Jourde-Chiche N, et al. The cardiovascular effect of the uremic solute indole-3 acetic acid. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26(4):876-87.
28. Barreto FC, Barreto DV, Liabeuf S, Meert N, Glorieux G, Temmar M, et al. Serum indoxyl sulfate is associated with vascular disease and mortality in chronic kidney disease patients. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009;4(10):1551-8.
29. Lin CJ, Wu V, Wu PC, Wu CJ. Meta-Analysis of the Associations of p-Cresyl Sulfate (PCS) and Indoxyl Sulfate (IS) with Cardiovascular Events and All-Cause Mortality in Patients with Chronic Renal Failure. *PLoS One*. 2015;10(7):e0132589.
30. Shafi T, Meyer TW, Hostetter TH, Melamed ML, Parekh RS, Hwang S, et al. Free Levels of Selected Organic Solutes and Cardiovascular Morbidity and Mortality in Hemodialysis Patients: Results from the Retained Organic Solutes and Clinical Outcomes (ROSCO) Investigators. *PLoS One*. 2015;10(5):e0126048.
31. Pletinck A, Glorieux G, Schepers E, Cohen G, Gondouin B, Van Landschoot M, et al. Protein-bound uremic toxins stimulate crosstalk between leukocytes and vessel wall. *J Am Soc Nephrol*. 2013;24(12):1981-94.
32. Gross P, Massy ZA, Henaut L, Boudot C, Cagnard J, March C, et al. Para-cresyl sulfate acutely impairs vascular reactivity and induces vascular remodeling. *J Cell Physiol*. 2015;230(12):2927-35.
33. Han H, Zhu J, Zhu Z, Ni J, Du R, Dai Y, et al. p-Cresyl sulfate aggravates cardiac dysfunction associated with chronic kidney disease by enhancing apoptosis of cardiomyocytes. *J Am Heart Assoc*. 2015;4(6):e001852.
34. Sun CY, Chang SC, Wu MS. Suppression of Klotho expression by protein-bound uremic toxins is associated with increased DNA methyltransferase expression and DNA hypermethylation. *Kidney Int*. 2012;81(7):640-50.
35. Mozar A, Louvet L, Godin C, Mentaverri R, Brazier M, Kamel S, et al. Indoxyl sulphate inhibits osteoclast differentiation and function. *Nephrol Dial Transplant*. 2012;27(6):2176-81.
36. Chen J, Zhang X, Zhang H, Liu T, Teng J, Ji J, et al. Indoxyl Sulfate Enhance the Hypermethylation of Klotho and Promote the Process of Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease. *Int J Biol Sci*. 2016;12(10):1236-46.
37. Opdebeeck B, Maudsley S, Azmi A, De Maré A, De Leger W, Meijers B, et al. Indoxyl Sulfate and p-Cresyl Sulfate Promote Vascular Calcification and Associate with Glucose Intolerance. *J Am Soc Nephrol*. 2019;30(5):751-66.
38. Ramos C. Efeito do uso de prebiótico (frutooligossacarídeo) sobre toxinas urêmicas em pacientes com doença renal crônica (Tese). Universidade Federal de São Paulo. Programa de pós-graduação em nutrição. 2018. p. 92.

-
39. Sabatino A, Regolisti G, Brusasco I, Cabassi A, Morabito S, Fiaccadori E. Alterations of intestinal barrier and microbiota in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2015;30(6):924-33.
40. de Andrade LS, Ramos CI, Cuppari L. The cross-talk between the kidney and the gut: implications for chronic kidney disease. *Nutrire*. 2017;42: 27.
41. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010;464(7285):59-65.
42. Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*. 2012;489(7415):220-30.
43. Shin NR, Whon TW, Bae JW. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends Biotechnol*. 2015;33(9):496-503.
44. Ottman N, Smidt H, de Vos WM, Belzer C. The function of our microbiota: who is out there and what do they do? *Front Cell Infect Microbiol*. 2012;2:104.
45. Graf D, Di Cagno R, Fåk F, Flint HJ, Nyman M, Saarela M, et al. Contribution of diet to the composition of the human gut microbiota. *Microb Ecol Health Dis*. 2015;26:26164.
46. Isolauri E, Salminen S, Ouwehand AC. Microbial-gut interactions in health and disease. *Probiotics*. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2004;18(2):299-313.
47. Cummings JH, Macfarlane GT. Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 1997;21(6):357-65.
48. Ewaschuk JB, Diaz H, Meddings L, Diederichs B, Dmytrash A, Backer J, et al. Secreted bioactive factors from *Bifidobacterium infantis* enhance epithelial cell barrier function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008;295(5):G1025-34.
49. O'Shea EF, Cotter PD, Stanton C, Ross RP, Hill C. Production of bioactive substances by intestinal bacteria as a basis for explaining probiotic mechanisms: bacteriocins and conjugated linoleic acid. *Int J Food Microbiol*. 2012;152(3):189-205.
50. Nieuwdorp M, Gilijamse PW, Pai N, Kaplan LM. Role of the microbiome in energy regulation and metabolism. *Gastroenterology*. 2014;146(6):1525-33.
51. Kamada N, Núñez G. Regulation of the immune system by the resident intestinal bacteria. *Gastroenterology*. 2014;146(6):1477-88.
52. Hooper LV, Littman DR, Macpherson AJ. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*. 2012;336(6086):1268-73.
53. El Aidy S, Dinan TG, Cryan JF. Gut Microbiota: The Conductor in the Orchestra of Immune-Neuroendocrine Communication. *Clin Ther*. 2015;37(5):954-67.

-
54. Macfarlane GT, Macfarlane S. Bacteria, colonic fermentation, and gastrointestinal health. *J AOAC Int.* 2012;95(1):50-60.
55. Smith PM, Howitt MR, Panikov N, Michaud M, Gallini CA, Bohlooly-Y M, et al. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science.* 2013;341(6145):569-73.
56. Sun M, Wu W, Liu Z, Cong Y. Microbiota metabolite short chain fatty acids, GPCR, and inflammatory bowel diseases. *J Gastroenterol.* 2017;52(1):1-8.
57. Hollister EB, Gao C, Versalovic J. Compositional and functional features of the gastrointestinal microbiome and their effects on human health. *Gastroenterology.* 2014;146(6):1449-58.
58. Scott KP, Gratz SW, Sheridan PO, Flint HJ, Duncan SH. The influence of diet on the gut microbiota. *Pharmacol Res.* 2013;69(1):52-60.
59. Birkett A, Muir J, Phillips J, Jones G, O'Dea K. Resistant starch lowers fecal concentrations of ammonia and phenols in humans. *Am J Clin Nutr.* 1996;63(5):766-72.
60. Poesen R, Mutsaers HA, Windey K, van den Broek PH, Verweij V, Augustijns P, et al. The Influence of Dietary Protein Intake on Mammalian Tryptophan and Phenolic Metabolites. *PLoS One.* 2015;10(10):e0140820.
61. Patel KP, Luo FJ, Plummer NS, Hostetter TH, Meyer TW. The production of p-cresol sulfate and indoxyl sulfate in vegetarians versus omnivores. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2012;7(6):982-8.
62. Hawrelak JA, Myers SP. The causes of intestinal dysbiosis: a review. *Altern Med Rev.* 2004;9(2):180-97.
63. Pappenheimer JR, Reiss KZ. Contribution of solvent drag through intercellular junctions to absorption of nutrients by the small intestine of the rat. *J Membr Biol.* 1987;100(2):123-36.
64. Duerkop BA, Vaishnava S, Hooper LV. Immune responses to the microbiota at the intestinal mucosal surface. *Immunity.* 2009;31(3):368-76.
65. Hooper LV, Macpherson AJ. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(3):159-69.
66. Nusrat A, Turner JR, Madara JL. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines, and immune cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2000;279(5):G851-7.
67. Garrett WS, Gordon JI, Glimcher LH. Homeostasis and inflammation in the intestine. *Cell.* 2010;140(6):859-70.

68. Takiishi T, Fenero CIM, Câmara NOS. Intestinal barrier and gut microbiota: Shaping our immune responses throughout life. *Tissue Barriers*. 2017:e1373208.
69. Barnes MJ, Powrie F. Regulatory T cells reinforce intestinal homeostasis. *Immunity*. 2009;31(3):401-11.
70. Vaziri ND, Wong J, Pahl M, Piceno YM, Yuan J, DeSantis TZ, et al. Chronic kidney disease alters intestinal microbial flora. *Kidney Int*. 2013;83(2):308-15.
71. Jiang S, Xie S, Lv D, Zhang Y, Deng J, Zeng L, et al. A reduction in the butyrate producing species *Roseburia* spp. and *Faecalibacterium prausnitzii* is associated with chronic kidney disease progression. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2016;109(10):1389-96.
72. Russell WR, Duncan SH, Scobbie L, Duncan G, Cantlay L, Calder AG, et al. Major phenylpropanoid-derived metabolites in the human gut can arise from microbial fermentation of protein. *Mol Nutr Food Res*. 2013;57(3):523-35.
73. Gryp T, De Paepe K, Vanholder R, Kerckhof FM, Van Biesen W, Van de Wiele T, et al. Gut microbiota generation of protein-bound uremic toxins and related metabolites is not altered at different stages of chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2020;97(6):1230-42.
74. Poesen R, Windey K, Neven E, Kuypers D, De Preter V, Augustijns P, et al. The Influence of CKD on Colonic Microbial Metabolism. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(5):1389-99.
75. Terpstra ML, Singh R, Geerlings SE, Bemelman FJ. Measurement of the intestinal permeability in chronic kidney disease. *World J Nephrol*. 2016;5(4):378-88.
76. McIntyre CW, Harrison LE, Eldehni MT, Jefferies HJ, Szeto CC, John SG, et al. 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.
77. Feroze U, Kalantar-Zadeh K, Sterling KA, Molnar MZ, Noori N, Benner D, et al. Examining associations of circulating endotoxin with nutritional status, inflammation, and mortality in hemodialysis patients. *J Ren Nutr*. 2012;22(3):317-26.
78. Wang F, Jiang H, Shi K, Ren Y, Zhang P, Cheng S. Gut bacterial translocation is associated with microinflammation in end-stage renal disease patients. *Nephrology (Carlton)*. 2012;17(8):733-8.
79. Shi K, Wang F, Jiang H, Liu H, Wei M, Wang Z, et al. Gut bacterial translocation may aggravate microinflammation in hemodialysis patients. *Dig Dis Sci*. 2014;59(9):2109-17.

80. Vaziri ND, Yuan J, Rahimi A, Ni Z, Said H, Subramanian VS. Disintegration of colonic epithelial tight junction in uremia: a likely cause of CKD-associated inflammation. *Nephrol Dial Transplant*. 2012;27(7):2686-93.
81. Vaziri ND, Goshtasbi N, Yuan J, Jellbauer S, Moradi H, Raffatellu M, et al. Uremic plasma impairs barrier function and depletes the tight junction protein constituents of intestinal epithelium. *Am J Nephrol*. 2012;36(5):438-43.
82. Andrade LS, Dalboni MA, Carvalho JTG, Grabulosa CC, Pereira NBF, Aoike DT, et al. In vitro effect of uremic serum on barrier function and inflammation in human colonocytes. *J Bras Nefrol*. 2018;40(3):217-24.
83. Vaziri ND, Yuan J, Norris K. Role of urea in intestinal barrier dysfunction and disruption of epithelial tight junction in chronic kidney disease. *Am J Nephrol*. 2013;37(1):1-6.
84. Vaziri ND, Zhao YY, Pahl MV. Altered intestinal microbial flora and impaired epithelial barrier structure and function in CKD: the nature, mechanisms, consequences and potential treatment. *Nephrol Dial Transplant*. 2015.
85. Lau WL, Kalantar-Zadeh K, Vaziri ND. The Gut as a Source of Inflammation in Chronic Kidney Disease. *Nephron*. 2015;130(2):92-8.
86. Evenepoel P, Meijers BK. Dietary fiber and protein: nutritional therapy in chronic kidney disease and beyond. *Kidney Int*. 2012;81(3):227-9.
87. Sirich TL. Dietary protein and fiber in end stage renal disease. *Semin Dial*. 2015;28(1):75-80.
88. Marzocco S, Dal Piaz F, Di Micco L, Torraca S, Sirico ML, Tartaglia D, et al. Very low protein diet reduces indoxyl sulfate levels in chronic kidney disease. *Blood Purif*. 2013;35(1-3):196-201.
89. Black AP, Anjos JS, Cardozo L, Carmo FL, Dolenga CJ, Nakao LS, et al. Does Low-Protein Diet Influence the Uremic Toxin Serum Levels From the Gut Microbiota in Nondialysis Chronic Kidney Disease Patients? *J Ren Nutr*. 2018;28(3):208-14.
90. 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 Suppl 1):S142-5.
91. Borges NA, Carmo FL, Stockler-Pinto MB, de Brito JS, Dolenga CJ, Ferreira DC, et al. Probiotic Supplementation in Chronic Kidney Disease: A Double-blind, Randomized, Placebo-controlled Trial. *J Ren Nutr*. 2018;28(1):28-36.
92. Rossi M, Johnson DW, Morrison M, Pascoe EM, Coombes JS, Forbes JM, et al. Synbiotics Easing Renal Failure by Improving Gut Microbiology (SYNERGY): A Randomized Trial. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2016;11(2):223-31.

93. Guida B, Germanò R, Trio R, Russo D, Memoli B, Grumetto L, et al. Effect of short-term synbiotic treatment on plasma p-cresol levels in patients with chronic renal failure: a randomized clinical trial. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2014;24(9):1043-9.
94. Gibson GR, Hutkins R, Sanders ME, Prescott SL, Reimer RA, Salminen SJ, et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;14(8):491-502.
95. Jones JM. CODEX-aligned dietary fiber definitions help to bridge the 'fiber gap'. *Nutr J*. 2014;13:34.
96. Rossi M, Klein K, Johnson DW, Campbell KL. Pre-, pro-, and synbiotics: do they have a role in reducing uremic toxins? A systematic review and meta-analysis. *Int J Nephrol*. 2012;2012:673631.
97. McFarlane C, Ramos CI, Johnson DW, Campbell KL. Prebiotic, Probiotic, and Synbiotic Supplementation in Chronic Kidney Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Ren Nutr*. 2019;29(3):209-20.
98. Annison G, Topping DL. Nutritional role of resistant starch: chemical structure vs physiological function. *Annu Rev Nutr*. 1994;14:297-320.
99. Englyst HN, Kingman SM, Cummings JH. Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. *Eur J Clin Nutr*. 1992;46 Suppl 2:S33-50.
100. Champ M, Langkilde AM, Brouns F, Kettlitz B, Bail-Collet YL. Advances in dietary fibre characterisation. 2. Consumption, chemistry, physiology and measurement of resistant starch; implications for health and food labelling. *Nutr Res Rev*. 2003;16(2):143-61.
101. Birt DF, Boylston T, Hendrich S, Jane JL, Hollis J, Li L, et al. Resistant starch: promise for improving human health. *Adv Nutr*. 2013;4(6):587-601.
102. Dey M. Toward a Personalized Approach in Prebiotics Research. *Nutrients*. 2017;9(2).
103. Barouei J, Bendiks Z, Martinic A, Mishchuk D, Heeney D, Hsieh YH, et al. Microbiota, metabolome, and immune alterations in obese mice fed a high-fat diet containing type 2 resistant starch. *Mol Nutr Food Res*. 2017;61(11).
104. Ferrario C, Statello R, Carnevali L, Mancabelli L, Milani C, Mangifesta M, et al. How to Feed the Mammalian Gut Microbiota: Bacterial and Metabolic Modulation by Dietary Fibers. *Front Microbiol*. 2017;8:1749.
105. Alfa MJ, Strang D, Tappia PS, Graham M, Van Domselaar G, Forbes JD, et al. A randomized trial to determine the impact of a digestion resistant starch composition on the gut microbiome in older and mid-age adults. *Clin Nutr*. 2018;37(3):797-807.

-
106. Venkataraman A, Sieber JR, Schmidt AW, Waldron C, Theis KR, Schmidt TM. Variable responses of human microbiomes to dietary supplementation with resistant starch. *Microbiome*. 2016;4(1):33.
107. Snelson M, Kellow NJ, Coughlan MT. Modulation of the Gut Microbiota by Resistant Starch as a Treatment of Chronic Kidney Diseases: Evidence of Efficacy and Mechanistic Insights. *Adv Nutr*. 2019;10(2):303-20.
108. Keenan MJ, Zhou J, Hegsted M, Pelkman C, Durham HA, Coulon DB, et al. Role of resistant starch in improving gut health, adiposity, and insulin resistance. *Adv Nutr*. 2015;6(2):198-205.
109. Nichenametla SN, Weidauer LA, Wey HE, Beare TM, Specker BL, Dey M. Resistant starch type 4-enriched diet lowered blood cholesterol and improved body composition in a double blind controlled cross-over intervention. *Mol Nutr Food Res*. 2014;58(6):1365-9.
110. Johansson EV, Nilsson AC, Östman EM, Björck IM. Effects of indigestible carbohydrates in barley on glucose metabolism, appetite and voluntary food intake over 16 h in healthy adults. *Nutr J*. 2013;12:46.
111. Sardá F, Giuntini E, Gomez M, Lui M, Negrini J, Tadini C, et al. Impact of resistant starch from unripe banana flour on hunger, satiety, and glucose homeostasis in healthy volunteers. *Journal of Functional Foods*. 2016;24:63-74.
112. Koh GY, Rowling MJ. Resistant starch as a novel dietary strategy to maintain kidney health in diabetes mellitus. *Nutr Rev*. 2017;75(5):350-60.
113. Johnston KL, Thomas EL, Bell JD, Frost GS, Robertson MD. Resistant starch improves insulin sensitivity in metabolic syndrome. *Diabet Med*. 2010;27(4):391-7.
114. Menezes EW, Tadini CC, Tribess TB, Zuleta A, Binaghi J, Pak N, et al. Chemical composition and nutritional value of unripe banana flour (*Musa acuminata*, var. Nanicão). *Plant Foods Hum Nutr*. 2011;66(3):231-7.
115. Falcomer AL, Riquette RFR, de Lima BR, Ginani VC, Zandonadi RP. Health Benefits of Green Banana Consumption: A Systematic Review. *Nutrients*. 2019;11(6).
116. Gumbrevicius I. Efeito da farinha de banana verde sobre o funcionamento intestinal de pacientes diabéticos, constipados, com doença renal crônica, submetidos a tratamento de hemodiálise (Dissertação). Universidade de São Paulo. Programa de pós-graduação interunidades em nutrição humana aplicada - PRONUT. 2016. p. 115.
117. Tribess T, Hernández-Urbe J, Méndez-Montealvo M, Menezes E, Bello-Perez L, Tadini C. Thermal properties and resistant starch content of green banana flour (*Musa cavendishii*) produced at different drying conditions. *LWT- Food Science and Technology*. 2009;42(5):1022-5.

-
118. Bliss DZ, Stein TP, Schleifer CR, Settle RG. Supplementation with gum arabic fiber increases fecal nitrogen excretion and lowers serum urea nitrogen concentration in chronic renal failure patients consuming a low-protein diet. *American Journal of Clinical Nutrition*. 1996;63:6.
119. Younes H, Egret N, Hadj-Abdelkader M, Rémésy C, Demigné C, Gueret C, et al. Fermentable carbohydrate supplementation alters nitrogen excretion in chronic renal failure. *J Ren Nutr*. 2006;16(1):67-74.
120. Meijers BK, De Preter V, Verbeke K, Vanrenterghem Y, Evenepoel P. p-Cresyl sulfate serum concentrations in haemodialysis patients are reduced by the prebiotic oligofructose-enriched inulin. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;25(1):219-24.
121. Salmean YA, Segal MS, Langkamp-Henken B, Canales MT, Zello GA, Dahl WJ. Foods with added fiber lower serum creatinine levels in patients with chronic kidney disease. *J Ren Nutr*. 2013;23(2):e29-32.
122. Sirich TL, Plummer NS, Gardner CD, Hostetter TH, Meyer TW. Effect of increasing dietary fiber on plasma levels of colon-derived solutes in hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2014;9(9):1603-10.
123. Tayebi Khosroshahi H, Habibzadeh A, Khoshbaten M, Rahbari B, Chaichi P, Badiee AH. Lactulose for reduction of nitrogen products in patients with chronic kidney disease. *Iran J Kidney Dis*. 2014;8(5):377-81.
124. Salmean YA, Segal MS, Palii SP, Dahl WJ. Fiber supplementation lowers plasma p-cresol in chronic kidney disease patients. *J Ren Nutr*. 2015;25(3):316-20.
125. Xie LM, Ge YY, Huang X, Zhang YQ, Li JX. Effects of fermentable dietary fiber supplementation on oxidative and inflammatory status in hemodialysis patients. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(1):1363-9.
126. Poesen R, Evenepoel P, de Loor H, Delcour JA, Courtin CM, Kuypers D, et al. The Influence of Prebiotic Arabinoxylan Oligosaccharides on Microbiota Derived Uremic Retention Solutes in Patients with Chronic Kidney Disease: A Randomized Controlled Trial. *PLoS One*. 2016;11(4):e0153893.
127. Tayebi-Khosroshahi H, Habibzadeh A, Niknafs B, Ghotaslou R, Yeganeh Sefidan F, Ghojzadeh M, et al. The effect of lactulose supplementation on fecal microflora of patients with chronic kidney disease; a randomized clinical trial. *J Renal Inj Prev*. 2016;5(3):162-7.
128. Elamin S, Alkhawaja MJ, Bukhamsin AY, Idris MAS, Abdelrahman MM, Abutaleb NK, et al. Gum Arabic Reduces C-Reactive Protein in Chronic Kidney Disease Patients without Affecting Urea or Indoxyl Sulfate Levels. *Int J Nephrol*. 2017;2017:9501470.

129. Ramos CI, Armani RG, Canziani MEF, Dalboni MA, Dolenga CJR, Nakao LS, et al. Effect of prebiotic (fructooligosaccharide) on uremic toxins of chronic kidney disease patients: a randomized controlled trial. *Nephrol Dial Transplant*. 2019;34(11):1876-84.
130. Tayebi Khosroshahi H, Vaziri ND, Abedi B, Asl BH, Ghojzadeh M, Jing W, et al. Effect of high amylose resistant starch (HAM-RS2) supplementation on biomarkers of inflammation and oxidative stress in hemodialysis patients: a randomized clinical trial. *Hemodial Int*. 2018;22(4):492-500.
131. Hill E, Sapa H, Negrea L, Bame K, Hostetter T, Barkoukis H, et al. Effect of Oat β -Glucan Supplementation on Chronic Kidney Disease: A Feasibility Study. *J Ren Nutr*. 2020;30(3):208-15.
132. Laffin MR, Tayebi Khosroshahi H, Park H, Laffin LJ, Madsen K, Kafil HS, et al. Amylose resistant starch (HAM-RS2) supplementation increases the proportion of *Faecalibacterium* bacteria in end-stage renal disease patients: Microbial analysis from a randomized placebo-controlled trial. *Hemodial Int*. 2019;23(3):343-7.
133. Khosroshahi HT, Abedi B, Ghojzadeh M, Samadi A, Jouyban A. Effects of fermentable high fiber diet supplementation on gut derived and conventional nitrogenous product in patients on maintenance hemodialysis: a randomized controlled trial. *Nutr Metab (Lond)*. 2019;16:18.
134. Li L, Xiong Q, Zhao J, Lin X, He S, Wu N, et al. Inulin-type fructan intervention restricts the increase in gut microbiome-generated indole in patients with peritoneal dialysis: a randomized crossover study. *Am J Clin Nutr*. 2020;111(5):1087-99.
135. Esgalhado M, Kemp JA, Paiva BR, Brito JS, Cardozo LFMF, Azevedo R, et al. Resistant starch type-2 enriched cookies modulate uremic toxins and inflammation in hemodialysis patients: a randomized, double-blind, crossover and placebo-controlled trial. *Food Funct*. 2020;11(3):2617-25.

Effect of unripe banana flour on gut-derived uremic toxins in individuals undergoing peritoneal dialysis: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial

Authors

Laila Santos de Andrade¹; Fabiana Andréa Hoffmann Sardá²; Natalia Barros Ferreira Pereira¹; Renata Rodrigues Teixeira¹; Silvia Daniéle Rodrigues³; Jordana Dinorá de Lima⁴; Maria Aparecida Dalboni⁵; Danilo Takashi Aoike⁶; Lia Sumie Nakao³; Lilian Cuppari^{1, 6, 7}

¹Nutrition Program, Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, São Paulo, Brazil

²Department of Food and Experimental Nutrition, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, Brazil

³Department of Basic Pathology, Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, Brazil

⁴Department of Cell Biology, Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, Brazil

⁵Post-graduate Program in Medicine, Universidade Nove de Julho – UNINOVE, São Paulo, Brazil

⁶Division of Nephrology, Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, São Paulo, Brazil

⁷Hospital do Rim – Fundação Oswaldo Ramos, São Paulo, Brazil

Corresponding Author

Lilian Cuppari

Division of Nephrology, Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, Rua Botucatu, 591. 04023-062, São Paulo, SP, Brazil. E-mail: lcuppari@uol.com.br

Brazilian Clinical Trials Registry (www.ensaiosclinicos.gov.br)

ID number: RBR-4xxwwj

Abstract

Background & Aims: Gut-derived metabolites, such as indoxyl sulfate (IS), p-cresyl sulfate (pCS) and indole 3-acetic acid (IAA), are part of the mammalian serum metabolome. In chronic kidney disease (CKD), the accumulation of these metabolites has been associated to inflammation, cardiovascular disease and mortality. In this context, prebiotics emerge as a strategy to mitigate the accumulation of such compounds, by modulating gut microbiota and production of their metabolites. The aim of this study was to evaluate the effect of unripe banana flour (UBF- 48% of resistant starch, a prebiotic) on serum concentrations of IS, pCS and IAA in individuals undergoing peritoneal dialysis (PD). **Methods:** A randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial was conducted. Forty-three individuals on PD were randomized to sequential treatment with UBF (21 g/day) and placebo (waxy corn starch- 12 g/day) for 4 weeks, or vice versa. Between both interventions there was a 4-week washout. The primary outcomes were serum levels of IS, pCS and IAA. Secondary outcomes were 24h urine excretion and dialysis removal of IS, pCS and IAA, serum inflammatory markers (hsCRP, IL-6, IL-10 and TNF- α), serum LPS, dietary intake and gastrointestinal symptoms. **Results:** Of 43 individuals randomized, 26 completed the follow-up [(age= 55 $\pm$ 12 years; 53.8% men; 34.6% with diabetes; 84.6% with residual diuresis; dialysis vintage= 16 (5-31) months]. UBF did not promote changes in serum levels of IS (p=0.70), pCS (p=0.70) and IAA (p=0.74). Taking into account the adherence to the supplement, reduction in serum total IS was observed in a subgroup of participants who had a daily UBF intake closer to that proposed in the study [n=11; placebo: median 79.5 μ mol/L (31-142) versus UBF: 62.5 μ mol/L (31-133), p= 0.009]. This finding was independent of habitual dietary intake, urinary excretion and dialysis removal of IS. No changes were observed in other secondary outcomes. **Conclusions:** UBF did not promote changes in serum levels of IS or pCS and IAA, a decrease in IS was only found in the subgroup of participants who had a daily UBF intake closer to that proposed in the study.

Trial Registration www.ensaiosclinicos.gov.br ID number: RBR-4xxwwj

Keywords

Unripe banana flour, uremic toxins, gut, prebiotic, chronic kidney disease

Introduction

Numerous metabolites that normally are part of the mammalian serum metabolome are derived from metabolism of gut microbiota [1, 2]. Among them, indoxyl sulfate (IS), indole 3-acetic acid (IAA) and p-cresyl sulfate (pCS) are generated from bacterial fermentation of amino acids tryptophan and tyrosine. In the distal colon, fermentation of tryptophan results in indole and IAA and the result of tyrosine fermentation is p-cresol. By sulfate conjugation in the liver and in colonic mucosa p-cresol and indole are converted into pCS and IS, respectively [3, 4]. In the circulation, more than 90% of these compounds are bound to proteins and are excreted by the kidneys [5, 6]. In chronic kidney disease (CKD), due to gradual loss of kidney function, several compounds are retained, including those derived from the gut microbiome. Serum concentration of these compounds increases gradually as renal function decreases, reaching the highest level in dialysis [7, 8]. Since they are bounded to serum protein, their dialytic clearance is low [8, 9]. Accumulation of these uremic toxins has been associated with progression of CKD [10], inflammation [11, 12], cardiovascular disease [13, 14] and mortality from cardiovascular disease and all causes in individuals with CKD [15-17].

Studies have shown that CKD is associated with altered colonic microbiota composition [18-21]. Among these changes, increased bacterial families with producers of indole and p-cresol were observed, suggesting a potentially upregulated microbiota in the production of these metabolites [19]. However, changes in the composition of the microbiota do not necessarily implicate in alterations in microbial metabolism [22]. Recently, in a well-designed study, it was demonstrated that the gut microbiota production of these metabolites does not change as renal function decreases [23].

Diet seems to be the main determinant of the gut microbial metabolism [24]. The type and amount of substrate that reach the human colon are key modulators of bacterial composition and metabolism. A greater availability of carbohydrates in relation to nitrogen compounds favors the growth of bacteria that preferentially ferment carbohydrates over the fermentation of nitrogenous compounds, resulting in beneficial changes in the gut microbiota composition and in the pattern of metabolites produced [25-27]. A markedly lower production

of IS and pCS was associated with lower protein and higher fiber intake in vegetarians individuals [28]. In individuals with CKD, a positive correlation between dietary protein-fiber ratio and serum levels of IS and pCS was observed [29]. Due to dietary restriction of fruit, vegetables and legumes to control hyperkalemia, low fiber intake is frequent among individuals with CKD [30, 31], what may favors the fermentation of amino acids and consequently contributing to accumulation of IS and pCS.

In this context, prebiotics emerge as a strategy to mitigate the accumulation of these compounds, by modulating the gut microbiota and production of metabolites towards lower amino acids fermentation. Prebiotics are substrates selectively utilized by host microorganisms providing health benefits. Among them are fermentable dietary fibers, such as inulin, fructo-oligosaccharides (FOS), galacto-oligosaccharides (GOS) and resistant starch (RS). When these undigested carbohydrates reach the colon, they are fermented by specific colon bacteria, which lead to changes in the composition and metabolic activity of the gut microbiota, benefiting the health of the host [32, 33]. To date, there is a paucity of well-designed studies about prebiotics impact on serum levels of gut-derived uremic toxins in CKD. Among the studies conducted so far, the impact on pCS levels is more common than on IS. Recently, RS has emerged as a possibility to reduce microbial production of IS [34, 35]. In two studies with patients undergoing hemodialysis, the use of RS resulted in reduction of IS serum levels [34, 36]. Among foods with significant amount of RS, the flour obtained from unripe banana, that contains about 50% of RS may represent a potential option to provide large amounts of prebiotic [37]. Adding to that, the great availability of bananas in Brazil and the low cost of flour production, unripe banana flour (UBF) may be an attractive foodstuff to be used in the CKD setting [38].

In this sense, we tested for the first time whether providing UBF to individuals with CKD undergoing peritoneal dialysis would reduce the serum gut-derived uremic toxins (IS, pCS and IAA).

Materials and Methods

This is a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial. The study was approved by the Ethics Committee of Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP, São Paulo, Brazil) and registered at the Brazilian Clinical Trials Registry (RBR-4xxwwj). Written informed consent was obtained from each participant.

Study population

Patients undergoing automated peritoneal dialysis (APD) from Fundação Oswaldo Ramos outpatient clinic (São Paulo, Brazil), aged 18-80 years, with a dialysis vintage of at least three months and adherent to dialysis treatment were invited to participate in the study. The exclusion criteria were the use of prebiotics, probiotics, synbiotics and antibiotics one month before the beginning of the study, presence of inflammatory bowel diseases, stomach or bowel resection, liver cirrhosis, cancer, human immunodeficiency virus, peritonitis in the last month, pregnancy and breastfeeding.

Participants were discontinued from the study if they presented any gastrointestinal intolerance even after dose adjustments, were hospitalized, started antibiotic therapy, underwent kidney transplant or wished to be withdrawn.

Intervention

The UBF was prepared in the Food Research Center (FoRC) of the Universidade de São Paulo (USP) with the unripe banana pulp, *Musa acuminata* (group AAA), subgroup Cavendish, at the first stage of maturation (unripe), not subjected to a maturation chamber and purchased at a local market. The production of UBF was performed in accordance with the patented process (PI 0705778-4) proposed by Tribess et al. [38] to preserve resistant starch (RS). RS and total starch (TS) present in the UBF were quantified by the AOAC 2002.02 method [39] and the method described by Cordenunsi and Lajolo [40], respectively. The flour produced contained approximately 48% resistant starch. In addition to resistant starch, UBF has other types of fibers (about 7%) and small amounts of phytosterols and polyphenols [37]. Regarding the potassium content, in 100 g of UBF there are approximately 1133 mg of potassium. Waxy corn starch (Amioca) supplied by Ingredion Incorporated

(Ingredion Brasil Ingredientes Industriais Ltda., São Paulo, Brazil) was used as placebo.

Supplements were packaged in identical sachets and identified by the numbers 225 and 653 in a handling pharmacy, under the responsibility of a pharmacist (Magister Pharmacy, São Paulo, Brazil). Each UBF sachet contained 10.5 g of flour (5 g of RS) and the placebo sachets contained 6 g waxy corn starch. The amount of placebo was defined in order to provide the similar amount of energy in relation to UBF (21 kcal/sachets).

The initial dose of both interventions was one sachet per day. After the three initial days, in the absence of adverse effects, participants were advised to double the daily amount of each supplement. In the presence of difficulties to take the proposed final dose (two sachets daily), such as any adverse gastrointestinal symptom, the participant was maintained in the study with the tolerable dose. Participants were advised to take the supplements during meals, mixed in any drink or food at low to moderate temperature in order to preserve the resistant starch.

Study protocol

The participants were assigned to sequential treatment with UBF and placebo, or vice versa, after a blocked randomization procedure using a random block of 4 participants in a 1:1 ratio. A computerized random list was generated by an independent researcher. The list was handed over to another independent researcher who was responsible for separating and allocating supplements to participants. The duration of each intervention was 4 weeks with a washout period (4 weeks) between them. Before and after each intervention, venous blood, 24h dialysate and 24h urine of participants with daily urinary volume ≥ 200 mL were collected. Figure 1 shows the study protocol.

The majority of the participants had been previously advised by a renal dietitian, according to the nutritional guidelines for patients undergoing peritoneal dialysis [41, 42], in the outpatient clinic routine. During each intervention, the participants were advised to maintain a stable dietary pattern and not to take prebiotics, probiotics or synbiotics. If necessary, dietary adjustments were advised or reinforced during the follow-up. The sachets were delivered to the participants during their monthly visit to the outpatient clinic. In

the first week of each intervention, an independent researcher, through phone calls, elucidated possible doubts regarding the use of the supplement and, when necessary, adjusted the dose with the participant, encouraging the regular use of the supplement. To evaluate adherence, sachets were counted at the end of each arm of the study.

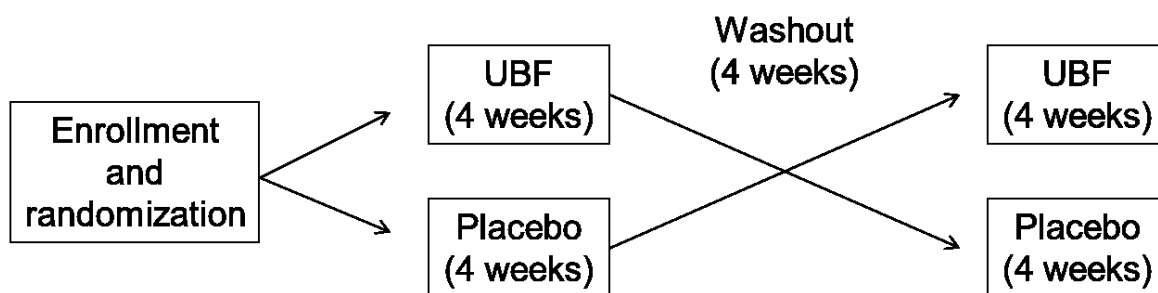


Figure 1. Scheme of the study protocol. UBF- unripe banana flour

Outcome measures

The primary outcomes were serum levels of IS, pCS and IAA. The secondary outcomes were 24h urine excretion and dialysis removal of IS, pCS and IAA, serum inflammatory markers [high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP), interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10) and tumor necrosis factor- α (TNF- α)], serum lipopolysaccharide (LPS), dietary intake and gastrointestinal symptoms.

Demographic, clinical and biochemical data

Demographic and clinical data were collected from medical records. Venous blood samples were collected in the morning and under fasting conditions (12 hours). Aliquots were immediately centrifuged and the serum was stored at -80°C . Aliquots of urine and dialysate were also stored at -80°C .

Serum, urinary and dialysate concentration of IS, pCS and IAA were quantified by high-performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescent detection. Samples were diluted with the exception of dialysate, heated at 95°C during 30 minutes and centrifuged at 13,000 rpm for 10 minutes at room temperature. Then, the samples were cooled on ice for 10 minutes, filtered

through 0.22 mm filter and injected into the system of HPLC. To quantify the free fractions, the serum samples without dilution were only centrifuged and filtered (0.22 mm). The chromatographic system was the one described by Rodrigues et al. [43]. During the run, fluorescence wave-lengths varied: $\lambda_{exc} = 283$ nm and $\lambda_{em} = 380$ nm to IS and IAA and $\lambda_{exc} = 265$ nm and $\lambda_{em} = 290$ nm to pCS.

Serum IL-6, IL-10 and TNF- α were measured using a kit of 3-cytokine Milliplex MAP Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel (EMD Millipore Corp., Billerica, MA, USA) following the specific protocol provided by the manufacturer. Serum LPS was determined using the Hycult Biotech Limulus Amebocyte Lysate assay (Hycult Biotech, Uden, The Netherlands). Serum levels of urea, creatinine, sodium, potassium, ionized calcium, phosphorus, glucose, albumin, glycated hemoglobin and high-sensitivity C-reactive protein were measured by standard techniques. Residual renal function (RRF) was calculated by the mean of creatinine and urea clearance corrected for body surface area [44]. Dialysis efficiency (Kt/V) was calculated according to proposed by the Clinical Practice Guidelines for Peritoneal Dialysis Adequacy [45].

Dietary intake

A food record of three alternate days, including the day before blood collection, was used to estimate energy, protein and fiber intake. Participants completed the records at the beginning and at the end of each intervention. All records were checked in a face-to-face interview by the same dietitian, using food models and household utensils to improve the accuracy of the recorded data. The software Nutwin® (UNIFESP, São Paulo, Brazil) was used to calculate the average nutrient intake.

Protein intake was also estimated by the protein equivalent nitrogen appearance (PNA), normalized by desirable or adjusted body weight [41].

Gastrointestinal symptoms

Gastrointestinal symptoms were monitored using the Gastrointestinal Symptom Rating Scale (GSRS) questionnaire, translated and validated into Brazilian Portuguese. This questionnaire consists of 15 questions comprising the following symptoms: abdominal pain, reflux, nausea, borborygmi, abdominal

distension, belching, flatulence, diarrhea and constipation. The intensity and/or frequency of each symptom are scored according to seven-level Likert scale. The total GSRS score ranging from 15 to 105 points. The higher the score, the higher the intensity and/or frequency of the symptom [46].

Statistical analysis

The sample size was calculated using as reference the study of Sirich et al. [34]. A total of 35 participants were estimated to detect a reduction of 17% in serum total IS, with a power of 80% and an error level of 0.05. Allowing a dropout rate of 20%, 43 participants were enrolled in the study. The GPower software, version 3.1.2 (Franz Faul, University of Kiel, Germany) was used to calculate the sample size.

The data are presented as the mean and standard deviation (SD), median and interquartile range or frequency and percentage, as appropriate. Student's t-test or Mann–Whitney test and Pearson's Chi-square or Fisher's exact test were used to compare the baseline characteristics between the patients who discontinued and patients who completed the follow-up. Generalized estimating equations (GEE) were used to analyze the effect of intervention on the variables. Statistical significance was established at p values < 0.05 . All statistical analyses were performed using the SPSS® software version 18.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

Study participants

Participants were recruited between May 2018 and September 2018 from a single peritoneal dialysis center. Forty-three participants were recruited and randomly allocated to sequential treatment with UBF and placebo, or vice-versa. Twenty-six participants concluded both arms of the trial, as depicted in the Consolidated Standards of Reporting Trials (CONSORT) flow diagram (Figure 2).

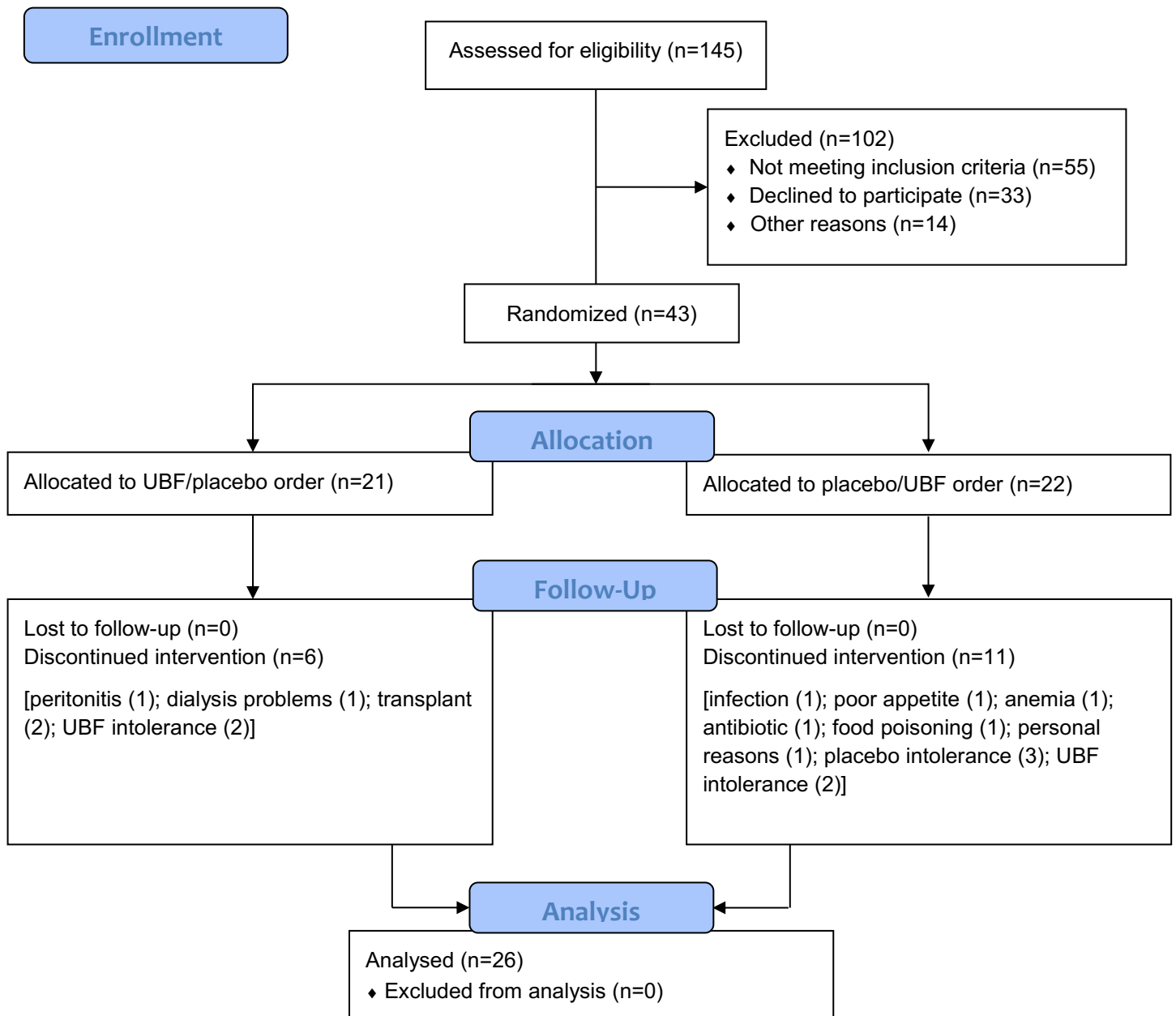


Figure 2. CONSORT flow diagram. UBF- unripe banana flour

In the study population, the causes of CKD were diabetic nephropathy (19.2%), hypertensive nephropathy (3.8%), glomerulonephritis (7.7%), polycystic kidney disease (15.4%), other causes (11.5%) and unknown causes (42.3%). The majority of participants were men (53.8%), 34.6% had diabetes, 84.6% had residual diuresis and 92.3% were undergoing nocturnal intermittent peritoneal dialysis (NIPD). The most common dialysis prescription was 5 cycles per 9 hour cycling session with 10L of total volume infusion using a glucose-based solution. The participants were on antihypertensive medication (96%), insulin (31%), statins (73%) and phosphate binders (65.5%). Table 1 shows that except for GSRS score that was higher in patients who discontinued the study, no other differences were observed between the group of participants who completed the study and the group of participants who discontinued the study.

Adherence, tolerance and gastrointestinal symptoms

Seven patients (26.9%) in the UBF arm and four patients (15.4%) in the placebo arm did not tolerate taking two sachets per day, therefore, they were maintained with the tolerable dose (one sachet/day). The reasons for the intolerance to the initially proposed dose were the large volume of flour (placebo: three patients / UBF: four patients), intolerable increase in flatulence (UBF: two patients) and hardening of the stools (placebo: one patient / UBF: one patient). Taking these dose adjustments into account, the overall adherence was good in both arms [placebo: median adherence 86.7% (67.3-92.6) versus UBF: 83% (64.6-94.5), $p = 0.67$]. The median daily intake of placebo was 9.6 g (6.6-10.4) and UBF 14 g (11.4-18). Therefore, the daily intake of resistant starch in the UBF arm was about $6.8 \text{ g} \pm 2.1$ (48% of UBF).

With regard to gastrointestinal symptoms, no change was observed in the GSRS score between the interventions ($p = 0.30$).

Laboratory parameters and dietary intake

As shown in Table 2 no differences were observed in the majority of laboratory parameters and dietary intake between the arms. A slight increase in the serum levels of IL-6 was observed after supplementation with UBF. At baseline, the protein:fiber ratio was higher in the UBF compared to the placebo.

Uremic toxins

As can be seen in Table 3, UBF did not promote changes in both total and free serum levels of IS, pCS and IAA. The excretion of total IS, pCS and IAA through 24h-urine and dialysate was also not different between the arms during the follow-up.

Subgroup based on adherence to the supplement

Eleven participants (42.3%) were able to take the two sachets during the entire follow-up with adherence greater than 80%. These participants had a median daily intake of placebo of 10.4 g (10-11.6) and UBF of 18.7 g (17.2-19.7) corresponding to about $8.8 \text{ g} \pm 0.6$ of resistant starch daily. The clinical, demographic and dietary characteristics of these participants were not different from the study population (data not shown).

Table 4 shows the impact of UBF on uremic toxins in this subgroup. As shown UBF significantly reduced the serum levels of total IS when compared to placebo (Figure 3). No differences were observed in free serum levels of IS and total and free serum levels of pCS and IAA. The urinary and dialysate excretion of uremic toxins did not differ between the arms during the follow-up.

With regard to inflammatory markers and dietary intake, also no differences were found (data not shown).

Table 1. Baseline characteristics of all randomized patients, patients who discontinued the study and patients who completed the follow up

Variables	All Patients (n= 43)	Patients who discontinued the study (n=17)	Patients who completed the follow up (n=26)	p*
Age (years)	52±18	49±16	55±12	0.16
Male [n (%)]	23 (53.5)	9 (52.9)	14 (53.8)	0.95
BMI (kg/m ²)	25.9±4.1	24.7±3.9	26.7±4.1	0.12
GSRS score	29 (24-41)	35 (29-42)	27.5 (21.2-36.5)	0.03
Diabetes [n (%)]	13 (30)	4 (23.5)	9 (34.6)	0.44
Dialysis vintage (months)	18 (6-42)	18 (11-49)	16 (5-31)	0.22
Residual diuresis [n (%)]	35 (81.5)	13 (76.5)	22 (84.6)	0.69
RRF (mL/min./1.73m ²)	4.3±3.3	4.5±2.4	5.8±3	0.20
Urine volume (mL/24 h)	1,224±543	1,105±532	1,294±549	0.33
Weekly Kt/V	2.12±0.55	2.0±0.5	2.2±0.6	0.22
Daily ultrafiltration (mL)	824.6±444	759±442	867.5±448	0.44
Laboratory data:				
Urea (mg/dL)	124±26	129±27	120±26	0.31
Creatinine (mg/dL)	8.3 (6.5-11.8)	10.3 (7.4-13.1)	7.4 (6-11.6)	0.26
Albumin (g/dL)	3.9±0.34	3.9±0.31	4±0.36	0.48
Hemoglobin (g/dL)	11.6±1.4	11.5±1.7	11.7±1.2	0.60
HbA1C (%)	5.7 (5.3-7)	5.7 (5.2-6)	5.8 (5.3-7.4)	0.52
hsCRP (mg/dL)	0.23 (0.11-0.53)	0.21 (0.1-0.44)	0.24 (0.1-0.59)	0.58

Table 1. Baseline characteristics of all randomized patients, patients who discontinued the study and patients who completed the follow up

Variables	All Patients (n= 43)	Patients who discontinued the study (n=17)	Patients who completed the follow up (n=26)	p*
Uremic toxins				
Serum total IS (μmol/L)	79 (49-150)	84 (55-168)	62 (45-133)	0.24
Serum total pCS (μmol/L)	182±97.7	196±96.3	173±99.4	0.46
Serum total IAA (μmol/L)	8.8 (5.6-14.3)	8.8 (5.7-16.4)	8.8 (5.5-13.3)	0.77
Daily dietary intake:				
Energy (kcal/kg)	22±6	21±6	23±6	0.50
Protein (g/kg)	0.75 (0.55-0.95)	0.73 (0.53-1.1)	0.76 (0.57-0.9)	0.84
Fiber (g)	9 (6.5-13.5)	8.8 (6.4-13.1)	9 (6.2-14.5)	0.80
Protein:fiber ratio	5.1 (3.4-8.3)	5 (3.9-7.6)	5.8 (2.8-8.7)	0.98
PNA (g/kg)	0.69±0.13	0.7±0.13	0.69±0.13	0.81

Data are presented as mean ± SD or as the median (interquartile range). BMI- body mass index; GSRS- Gastrointestinal Symptom Rating Scale; RRF- residual renal function; hsCRP- high sensitivity C-reactive protein; IS- indoxyl sulfate; pCS- p-cresyl sulfate; IAA- indole 3-acetic acid; PNA- protein nitrogen appearance. *Patients who discontinued vs patients who completed the follow-up.

Table 2. Laboratory parameters and dietary intake according to UBF and placebo arms during the follow-up of patients undergoing peritoneal dialysis (n=26)

Variables	UBF		Placebo		p
	Pre	Post	Pre	Post	
Laboratory data:					
Urea (mg/dL)	121±25	126±31	124±24	128±27	0.37
Creatinine (mg/dL)	7.5 (6-11.7)	8.4 (6.2-12) ^a	8 (6.7-12.4)	8.4 (6.5-12.8) ^b	0.01
Sodium (mEq/L)	139±2	139±2	139±2	139±2 ^b	0.02
Potassium (mEq/L)	4.7 (4.3-4.9)	4.8 (4.3-5.2)	4.6 (4.4-5.2)	4.5 (4.3-5.1)	0.60
Ionized calcium (mmol/L)	1.25±0.08	1.24±0.1	1.24±0.08	1.24±0.09	0.93
Phosphorus (mg/dL)	5.8 (4.9-6.5)	5.5 (5.2-6)	5.5 (4.6-5.9)	5.6 (5-6.3)	0.12
Glucose (mg/dL)	85 (79-118)	91 (77-112)	85 (78-104)	91 (83-103)	0.26
Albumin (g/dL)	3.9±0.3	3.9±0.3	3.9±0.4	3.9±0.3	0.93
HbA1C (%)	5.8 (5.5-7.2)	5.7 (5.3-7.7)	5.9 (5.2-8.3)	5.9 (5.3-8.1)	1.0
Urine volume (mL/24 h)	1,272±571	1,235±569	1,211±551	1,312±677	0.60
RRF (mL/min./1.73m²)	5.7±3	5.7±3.3	5.3±2.8	5.9±3.6	0.05
Weekly Kt/V	2.2±0.6	2.1±0.6	2.1±0.5	2.2±0.6	0.17

Table 2. Laboratory parameters and dietary intake according to UBF and placebo arms during the follow-up of patients undergoing peritoneal dialysis (n=26)

Variables	UBF		Placebo		p
	Pre	Post	Pre	Post	
Inflammatory markers					
hsCRP (mg/dL)	0.25 (0.1-0.5)	0.20 (0.08-0.5)	0.22 (0.09-0.4)	0.26 (0.1-0.4)	0.08
IL-6 (pg/mL)	3.6 (2.2-5.8)	3.8 (2.8-7.3) ^b	4 (2-7.1)	4.3 (2.5-7.7) ^b	0.004
IL-10 (pg/mL)	13.3 (9.7-19.3)	13.3 (9.7-19.9)	15.8 (7.5-21.7)	14.1 (9.6-22.6)	0.52
TNF-α (pg/mL)	71.3±28	68.7±21	71.9±27	71.1±21.7	0.74
LPS (EU/mL)	0.07 (0.05-0.1)	0.09 (0.07-0.2)	0.07 (0.05-0.1)	0.1 (0.06-0.1)	0.28
Daily dietary intake:					
Energy (kcal/kg)	21.4±7.1	20.6±7.2	20.8±5.2	20.3±6.1	0.44
Protein (g/kg)	0.74±0.2	0.78±0.3	0.73±0.2	0.74±0.2	0.63
Fiber (g)	7 (5.8-12.2)	9 (6.5-14.6)	10 (6.9-15.2)	9.6 (6.9-13.4)	0.25
Protein:fiber ratio	6 (3.6-9.9) ^c	6.1 (3.6-8.4)	4.7 (3.4-7)	5.7 (3.4-8)	0.002
PNA (g/kg)	0.69±0.13	0.70±0.17	0.69±0.14	0.72±0.16	0.20

Data are presented as mean $\pm$ SD or as the median (interquartile range). RRF- residual renal function; hsCRP- high sensitive C-reactive protein; IL-6- Interleukin-6; IL-10- Interleukin-10; TNF- α - Tumor necrosis factor- α ; LPS- lipopolysaccharide; PNA- protein nitrogen appearance. ^a p < 0.05 versus placebo-post; ^b p < 0.05 versus UBF-pre; ^c p < 0.05 versus placebo-pre.

Table 3. Uremic toxins according to UBF and placebo arms during the follow-up of patients undergoing peritoneal dialysis (n=26)

Variables	UBF		Placebo		p
	Pre	Post	Pre	Post	
Serum total uremic toxins (μmol/L)					
IS	67 (35-141)	63 (35-139)	59 (37-137.5)	72.7 (32.5-136)	0.70
pCS	153.5 (88-283)	171.5 (131-263)	149.5 (95-235)	164 (108-242)	0.70
IAA	8.7 (5.7-13.4)	9 (6-15)	9.7 (5.3-13)	8 (5.8-13.2)	0.74
Serum free uremic toxins (μmol/L)					
IS	1.4 (0.6-4.3)	1.6 (0.7-3.5)	1.7 (0.8-4.2)	1.5 (0.7-3.1)	0.95
pCS	1.8 (0.9-4.7)	2.2 (1-5.5)	2.3 (1-5)	2.3 (1.1-4.6)	0.24
IAA	0.60 (0.2-1.1)	0.65 (0.3-1)	0.68 (0.25-1)	0.62 (0.3-0.8)	0.29
Urinary total uremic toxins (μmol/24h)					
IS	200 (130-290)	199 (64-263)	210 (87-273)	180 (105-285)	0.36
pCS	97 (30-184)	100 (48-286)	117 (49-240)	97 (39-222)	0.25
IAA	5.7 (2.9-8.6)	5.2 (2.7-11.3)	3.6 (2.5-9.3)	3.9 (2.3-7.6)	0.55
Dialysate total uremic toxins (μmol/24h)					
IS	30 (14-78)	29 (15-76)	33.4 (19-68)	28.4 (19-88)	0.45
pCS	24 (10-139)	28 (12-88)	30.4 (10-98)	25 (12-85)	0.90
IAA	8.3 (5-18)	10 (5-19)	11.4 (6-19)	11 (6-15)	0.82

Data are presented as mean ± SD or as the median (interquartile range). IS- indoxyl sulfate; pCS- p-cresyl sulfate; IAA- indole 3-acetic acid.

Table 4. Uremic toxins in adherent patients according to UBF and placebo arms during the follow-up of patients undergoing peritoneal dialysis (n=11)

Variables	UBF		Placebo		p
	Pre	Post	Pre	Post	
Serum total uremic toxins (μmol/L)					
IS	73 (30-136)	62.5 (31-133) ^{a, c}	82 (23-163)	79.5 (31-142)	0.001
pCS	136 (82-240)	144 (75-160)	124 (90-226)	144 (74-175)	0.95
IAA	6.5 (5-10)	8.3 (5.8-10.6)	7.6 (4.9-11.1)	7.5 (5.8-10)	0.88
Serum free uremic toxins (μmol/L)					
IS	0.98 (0.6-2.5)	1.0 (0.5-2.2)	0.86 (0.4-3.2)	1.1 (0.5-1.9)	0.24
pCS	1.1 (0.6-2)	1.3 (0.8-1.6)	1.0 (0.9-3)	1.4 (0.6-2.4)	0.54
IAA	0.4 (0.2-0.7)	0.5 (0.2-0.7)	0.3 (0.2-0.8)	0.4 (0.3-0.8)	0.62
Urinary total uremic toxins (μmol/24h)					
IS	192 (109-240)	176 (49-226)	154 (56-220)	160 (95-238)	0.05
pCS	82 (19-201)	85 (14-232)	60 (25-211)	79 (31-190)	0.76
IAA	4.4 (2.9-7.1)	3.4 (2.7-6)	2.8 (2.2-6.1)	3.1 (2-4.1)	0.14
Dialysate total uremic toxins (μmol/24h)					
IS	19.7 (14.7-66.1)	19.6 (8.4-33.2)	29.8 (10.3-67.5)	27.9 (11-51)	0.27
pCS	23.8 (5.6-66.7)	13.3 (7.5-51.8)	14.9 (3.5-34.3)	22.5 (2.8-40)	0.30
IAA	6.3 (4.1-15.4)	6.1 (3.9-12.2)	5.9 (4.2-14.1)	9.6 (3.9-13.6)	0.40

Data are presented as mean ± SD or as the median (interquartile range). IS- indoxyl sulfate; pCS- p-cresyl sulfate; IAA- indole 3-acetic acid. Adherent patients- consumption ≥ 80% of the sachets offered. ^ap < 0.05 versus placebo-post; ^cp < 0.05 versus placebo-pre.

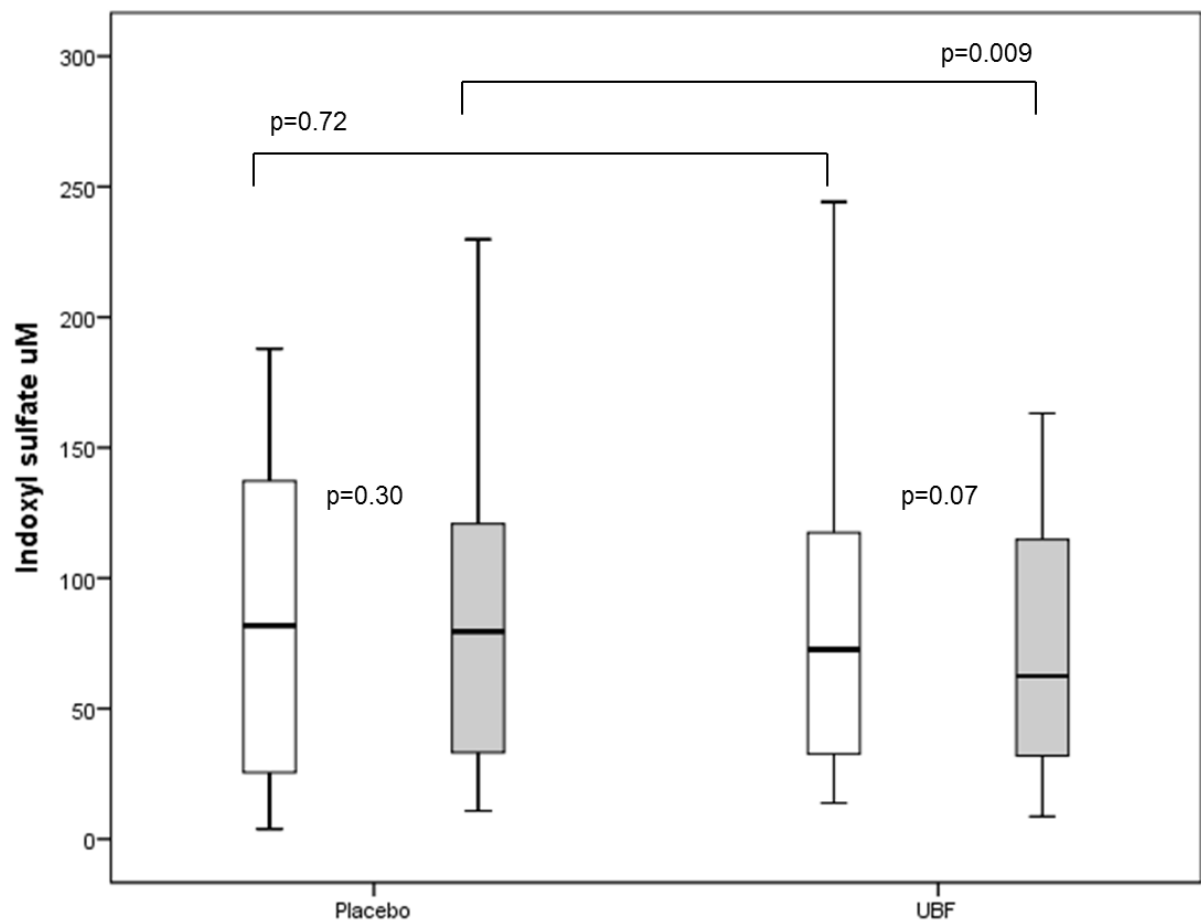


Figure 3. Serum level of total indoxyl sulfate in a subgroup of patients (n=11) undergoing peritoneal dialysis pre (white) and post (gray) the use of placebo and UBF.

Discussion

In the present study, we tested the effect of UBF on the serum levels of gut-derived uremic toxins in patients undergoing peritoneal dialysis. We found that supplementation with UBF for 4 weeks did not affect either the serum levels of IS or pCS and IAA.

UBF contains a large amount of dietary fiber (about 56%) with RS representing approximately 87% of the total fiber. The beneficial effect of RS on uremic toxins has not been clearly demonstrated. In HD patients, while a decrease in serum total IS was found in two studies with the administration of 16-18 g/day of RS [34, 36], in another, with the same prebiotic and dose, no difference was observed in IS [47].

Despite its importance, the adherence to the intervention has not always been carefully assessed or monitored in the studies. In the present study, even though the strategies adopted to favor the regular use of two sachets of UBF, some participants had low adherence, and others did not tolerate the proposed dose, which corresponded to 10 g of RS, and were then maintained in the study with their tolerable dose. Analyzing separately the participants who were able to take more than 80% of the proposed dose ($8.8 \text{ g} \pm 0.6$ of RS daily), serum levels of total IS decreased after UBF compared to placebo. It is important to highlight that the reduction was not due to increased urinary excretion, dialysis removal of IS or changes in usual dietary intake. This finding suggests that the impact of UBF on the serum IS may be dependent on the dose of UBF and probably the amount of RS.

The type and amount of substrate that reach the human colon are key modulators of bacterial composition and metabolism. An increase in carbohydrate available for fermentation in the colon seems to favor carbohydrates fermentation over nitrogenous compounds leading to reduction of specific metabolites such as indole, which is the precursor of IS [25, 26]. It has been suggested that the effect of RS on IS is the result of changes in the composition and metabolism of gut microbiota promoted by selective growth of certain bacterial species [48]. However, in CKD, there is a paucity of studies in which the impact of RS on the composition of the gut microbiota has been evaluated. In a study with CKD rats fed diets supplemented with RS, the reduction of serum IS was accompanied by changes in gut microbiota composition, markedly by an increase in microbial diversity, in the *Bacteroidetes*-to-*Firmicutes* ratio and in the *Ruminococcus bromii*, which seems to be keystone species for the degradation of RS [35, 49, 50]. As far as we know, there is only one study with HD patients that evaluated the impact of RS administration on the fecal microbial profile and the only difference observed was an increase in the *Faecalibacterium prausnitzii* [51], a butyrate-producing specie [52, 53], which appears to be reduced in individuals with CKD [54] and is frequent and abundant in gut microbiota of healthy individuals [55]. However, it is important to highlight that this finding was based on analysis of five specific genera and not on a complete overview of the fecal microbiota composition. Unfortunately, in the present study, the gut microbiome was not assessed.

Regarding the other two gut-derived uremic toxins evaluated (pCS and IAA) no impact of UBF was observed. Similarly, no difference in the serum total pCS was observed in other RS intervention studies with HD patients [34, 36]. In healthy individuals, the production of IS and pCS does not seem to be correlated [28], suggesting that the regulation of their production occurs by different factors. In a study with patients undergoing hemodialysis, high pCS levels were associated with distinct gut microbiota composition when compared to high IS levels [56]. Therefore, it is possible that different types of prebiotics are needed to modulate the production of these uremic toxins. While RS seems to impact the generation of IS, other prebiotics appear to be able to reduce the generation of pCS. In HD patients, the daily intake of 20 g of oligofructose-enriched inulin decreased by about 20% serum levels of pCS, but not IS [57]. In another study with 15 g of inulin plus 10 g of pea hull fiber, a similar reduction only in pCS was observed in non-dialysis-dependent CKD patients [58]. Also in patients in the same stage of the disease, a trend to reduce only serum pCS was found with fructooligosaccharide (FOS) supplementation [59]. Thus, it can be speculated that the combination of specific prebiotics is necessary to modulate the production of these two uremic toxins.

Despite the findings mentioned above, well-designed prebiotic intervention studies in CKD and particularly in PD are scarce. Recently, no changes were also observed in the serum levels of pCS and IS in a well-designed cross-over study in PD, with 10 g of inulin [60]. It is possible that higher doses are required to reduce the serum levels of uremic toxins and the required dose may vary according to the type of prebiotic. In healthy individuals, it was observed that bifidogenic effect of prebiotics is dose dependent and the minimum dose required may vary depending on the type of prebiotic. While for FOS it seems the minimum dose is 10 g/day, for inulin a lower dose seems to be enough (2.5-5 g/day) [61]. As far as we know, there is no study in CKD that evaluated the dose-response effect of prebiotics on the serum level of uremic toxins. In our study, a reduction in serum IS was observed only in the subgroup of participants who consumed approximately 20 g of UBF (10 g of RS)/daily. Although we presume the reduction of serum IS observed in the subgroup was consequence of RS, we cannot rule out the possibility that other components of the UBF have synergistically contributed to this effect.

In the present study, the use of UBF did not result in changes of inflammatory markers evaluated (hsCRP, TNF- α , IL-6 and IL-10), nor in the serum levels of LPS (marker of gut permeability). The slight increase observed in IL-6 after UBF does not appear to be an effect of the intervention, since no difference was found between UBF and placebo. In addition, no difference was observed in the levels of IL-6 in the subgroup that showed greater adherence to the intervention. Several factors contribute to the inflammatory state in CKD, including the uremic toxins [62]. Further, it has been suggested that changes in the composition and metabolism of gut microbiota in CKD impact negatively the intestinal permeability, favoring the chronic inflammatory state. The increase in intestinal permeability allows leakage of bacterial components into the bloodstream, which are recognized by the immune system, triggering pro-inflammatory responses [63]. In this context, the modulation of gut ecosystem also emerges as a possibility to reduce inflammation, both by reducing the production of uremic toxins and by reversing or mitigating the damage in the gut barrier. RS fermentation by gut microbiota produces short-chain fatty acids (SCFA), mainly butyrate [48], which plays an important role in maintaining the integrity of the intestinal barrier, regulating the local immune system [64]. Although some limitations, serum levels of LPS have been used as marker of intestinal permeability in clinical studies. In the current study, the serum levels of LPS found were lower than that of patients on PD in other cohorts [65, 66] and similar to the levels reported in healthy individuals [65]. Therefore it seems unlikely to expect changes in the levels of LPS and consequently in the inflammatory markers, by this pathway, with the intervention. To date, there is a paucity of studies that have investigated the effects of prebiotics on inflammatory status in the context of CKD. In a study with CKD rats, RS attenuated the inflammation [67], however, in clinical studies the results are still discordant. While in one study a reduction in some inflammatory markers was observed (TNF- α and IL-6) [68], in another, with the same dose of RS, no difference was found in the levels of hsCRP and IL-6 of HD patients [36].

Some limitations and strengths of the present study should be acknowledged. The loss of a significant number of participants during the follow-up resulted in a relatively small sample size what may have limited the statistical power for detection of changes in the outcomes. The low tolerability to the UBF may have prevented to find more consistent results. Indeed, a decrease of serum IS was found in the

subgroup of participants who ingested the total dose proposed. Although plausible, this subgroup analysis should be viewed with caution due to potential selection bias introduction. The gut microbioma and their metabolites were not assessed, limiting to in-depth understanding of the impact of UBF on the composition and metabolism of gut microbiota and consequently on the uremic toxins. The strengths are the study design and especially the control of known confounders such as dietary intake (protein and fiber), urinary excretion and dialysis removal of the uremic toxins.

In conclusion, we found that the UBF did not affect either the serum levels of IS or pCS and IAA. A reduction in serum total IS was observed, when about 20 g of UBF was used daily. This finding was independent of dietary intake and urinary excretion and dialysis removal of uremic toxins. No effect of UBF was observed in inflammatory markers and intestinal permeability. Our results highlight the difficulty of implementing the regular use of flours with prebiotics in clinical practice, since a large amount of supplement seems to be required to promote a significant reduction in uremic toxins. This factor should be considered when developing strategies to target the gut microbiota in CKD, since the potential benefits depend on the continuous use of the supplement. Further studies evaluating different doses of prebiotics and especially the combination of prebiotic types may be required for a better understanding of their effect on the production of gut-derived metabolites and consequently on the accumulation of uremic toxins in CKD.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge Dr. Christian Hoffmann and the Food Research Center (FoRC) of the Universidade de São Paulo (USP) for all support in the UBF production, all the volunteers who collaborated in its production, especially Fabiana Lima, Ingredion Incorporated (Ingredion Brasil Ingredientes Industriais Ltda., São Paulo, Brazil) for donating the Amioca, the nurses and all staff from Fundação Oswaldo Ramos (São Paulo, Brazil) for the assistance in data collection and the study participants.

Statement of authorship

The authors made the following contributions: L.S.A., F.A.H.S. and L.C. were responsible for the conception and design of the study; L.S.A., F.A.H.S., N.B.F.P., R.R.T., S.D.R., J.D.L., M.A.D. and L.S.N. contributed to the data acquisition; L.S.A., D.T.A. and L.C. were responsible for the statistical analysis and interpretation of the data; and L.S.A. and L.C. drafted the manuscript and made the final revisions.

Conflict of interest

The authors have nothing to disclose.

Sources of funding

LS. Andrade, FAH. Sardá, NBF. Pereira, RR. Teixeira, JD. Lima received a scholarship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). SD. Rodrigues receives a scholarship from CAPES – Fundação Araucária and L. Cuppari receives a scholarship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (# 302765/2017-4). The production and analysis of UBF were supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) [# 13/07914-8 (FoRC)]. Support for this research was provided by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (# 2018/12122-7).

References

1. Wikoff WR, Anfora AT, Liu J, Schultz PG, Lesley SA, Peters EC, et al. Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(10):3698-703.
2. Mair RD, Sirich TL, Plummer NS, Meyer TW. Characteristics of Colon-Derived Uremic Solutes. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2018;13(9):1398-404.
3. Mafra D, Barros AF, Fouque D. Dietary protein metabolism by gut microbiota and its consequences for chronic kidney disease patients. *Future Microbiol*. 2013;8(10):1317-23.
4. Gao J, Xu K, Liu H, Liu G, Bai M, Peng C, et al. Impact of the Gut Microbiota on Intestinal Immunity Mediated by Tryptophan Metabolism. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018;8:13.
5. Deltombe O, Van Biesen W, Glorieux G, Massy Z, Dhondt A, Eloot S. Exploring Protein Binding of Uremic Toxins in Patients with Different Stages of Chronic Kidney Disease and during Hemodialysis. *Toxins (Basel)*. 2015;7(10):3933-46.
6. Sirich TL, Aronov PA, Plummer NS, Hostetter TH, Meyer TW. Numerous protein-bound solutes are cleared by the kidney with high efficiency. *Kidney Int*. 2013;84(3):585-90.
7. Lin CJ, Chen HH, Pan CF, Chuang CK, Wang TJ, Sun FJ, et al. p-Cresylsulfate and indoxyl sulfate level at different stages of chronic kidney disease. *J Clin Lab Anal*. 2011;25(3):191-7.
8. Sirich TL, Funk BA, Plummer NS, Hostetter TH, Meyer TW. Prominent accumulation in hemodialysis patients of solutes normally cleared by tubular secretion. *J Am Soc Nephrol*. 2014;25(3):615-22.
9. Lesaffer G, De Smet R, Lameire N, Dhondt A, Duym P, Vanholder R. Intradialytic removal of protein-bound uraemic toxins: role of solute characteristics and of dialyser membrane. *Nephrol Dial Transplant*. 2000;15(1):50-7.
10. Wu IW, Hsu KH, Lee CC, Sun CY, Hsu HJ, Tsai CJ, et al. p-Cresyl sulphate and indoxyl sulphate predict progression of chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2011;26(3):938-47.
11. Rossi M, Campbell KL, Johnson DW, Stanton T, Vesey DA, Coombes JS, et al. Protein-bound uremic toxins, inflammation and oxidative stress: a cross-sectional study in stage 3-4 chronic kidney disease. *Arch Med Res*. 2014;45(4):309-17.
12. Borges NA, Barros AF, Nakao LS, Dolenga CJ, Fouque D, Mafra D. Protein-Bound Uremic Toxins from Gut Microbiota and Inflammatory Markers in Chronic Kidney Disease. *J Ren Nutr*. 2016;26(6):396-400.

13. Rossi M, Campbell K, Johnson D, Stanton T, Pascoe E, Hawley C, et al. Uraemic toxins and cardiovascular disease across the chronic kidney disease spectrum: an observational study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2014;24(9):1035-42.
14. Dou L, Sallée M, Cerini C, Poitevin S, Gondouin B, Jourde-Chiche N, et al. The cardiovascular effect of the uremic solute indole-3 acetic acid. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26(4):876-87.
15. Barreto FC, Barreto DV, Liabeuf S, Meert N, Glorieux G, Temmar M, et al. Serum indoxyl sulfate is associated with vascular disease and mortality in chronic kidney disease patients. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009;4(10):1551-8.
16. Lin CJ, Wu V, Wu PC, Wu CJ. Meta-Analysis of the Associations of p-Cresyl Sulfate (PCS) and Indoxyl Sulfate (IS) with Cardiovascular Events and All-Cause Mortality in Patients with Chronic Renal Failure. *PLoS One*. 2015;10(7):e0132589.
17. Shafi T, Meyer TW, Hostetter TH, Melamed ML, Parekh RS, Hwang S, et al. Free Levels of Selected Organic Solutes and Cardiovascular Morbidity and Mortality in Hemodialysis Patients: Results from the Retained Organic Solutes and Clinical Outcomes (ROSCO) Investigators. *PLoS One*. 2015;10(5):e0126048.
18. Vaziri ND, Wong J, Pahl M, Piceno YM, Yuan J, DeSantis TZ, et al. Chronic kidney disease alters intestinal microbial flora. *Kidney Int*. 2013;83(2):308-15.
19. 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(3):230-7.
20. Stadlbauer V, Horvath A, Ribitsch W, Schmerböck B, Schilcher G, Lemesch S, et al. Structural and functional differences in gut microbiome composition in patients undergoing haemodialysis or peritoneal dialysis. *Sci Rep*. 2017;7(1):15601.
21. Hu J, Zhong X, Yan J, Zhou D, Qin D, Xiao X, et al. High-throughput sequencing analysis of intestinal flora changes in ESRD and CKD patients. *BMC Nephrol*. 2020;21(1):12.
22. Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*. 2012;489(7415):220-30.
23. Gryp T, De Paepe K, Vanholder R, Kerckhof FM, Van Biesen W, Van de Wiele T, et al. Gut microbiota generation of protein-bound uremic toxins and related metabolites is not altered at different stages of chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2020;97(6):1230-42.
24. Poesen R, Windey K, Neven E, Kuypers D, De Preter V, Augustijns P, et al. The Influence of CKD on Colonic Microbial Metabolism. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(5):1389-99.

25. Scott KP, Gratz SW, Sheridan PO, Flint HJ, Duncan SH. The influence of diet on the gut microbiota. *Pharmacol Res.* 2013;69(1):52-60.
26. Birkett A, Muir J, Phillips J, Jones G, O'Dea K. Resistant starch lowers fecal concentrations of ammonia and phenols in humans. *Am J Clin Nutr.* 1996;63(5):766-72.
27. Poesen R, Mutsaers HA, Windey K, van den Broek PH, Verweij V, Augustijns P, et al. The Influence of Dietary Protein Intake on Mammalian Tryptophan and Phenolic Metabolites. *PLoS One.* 2015;10(10):e0140820.
28. Patel KP, Luo FJ, Plummer NS, Hostetter TH, Meyer TW. The production of p-cresol sulfate and indoxyl sulfate in vegetarians versus omnivores. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2012;7(6):982-8.
29. Rossi M, Johnson DW, Xu H, Carrero JJ, Pascoe E, French C, et al. Dietary protein-fiber ratio associates with circulating levels of indoxyl sulfate and p-cresyl sulfate in chronic kidney disease patients. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2015;25(9):860-5.
30. Kalantar-Zadeh K, Kopple JD, Deepak S, Block D, Block G. Food intake characteristics of hemodialysis patients as obtained by food frequency questionnaire. *J Ren Nutr.* 2002;12(1):17-31.
31. Schena FP. Management of patients with chronic kidney disease. *Intern Emerg Med.* 2011;6 Suppl 1:77-83.
32. Gibson GR, Hutkins R, Sanders ME, Prescott SL, Reimer RA, Salminen SJ, et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017;14(8):491-502.
33. Jones JM. CODEX-aligned dietary fiber definitions help to bridge the 'fiber gap'. *Nutr J.* 2014;13:34.
34. Sirich TL, Plummer NS, Gardner CD, Hostetter TH, Meyer TW. Effect of increasing dietary fiber on plasma levels of colon-derived solutes in hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2014;9(9):1603-10.
35. Kieffer DA, Piccolo BD, Vaziri ND, Liu S, Lau WL, Khazaeli M, et al. Resistant starch alters gut microbiome and metabolomic profiles concurrent with amelioration of chronic kidney disease in rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2016;310(9):F857-71.
36. Esgalhado M, Kemp JA, Paiva BR, Brito JS, Cardozo LFMF, Azevedo R, et al. Resistant starch type-2 enriched cookies modulate uremic toxins and inflammation in hemodialysis patients: a randomized, double-blind, crossover and placebo-controlled trial. *Food Funct.* 2020;11(3):2617-25.

37. Menezes EW, Tadini CC, Tribess TB, Zuleta A, Binaghi J, Pak N, et al. Chemical composition and nutritional value of unripe banana flour (*Musa acuminata*, var. Nanicão). *Plant Foods Hum Nutr.* 2011;66(3):231-7.
38. Tribess T, Hernández-Urbe J, Méndez-Montealvo M, Menezes E, Bello-Perez L, Tadini C. Thermal properties and resistant starch content of green banana flour (*Musa cavendishii*) produced at different drying conditions. *LWT- Food Science and Technology.* 2009;42(5):1022-5.
39. AOAC. Official methods of analysis of AOAC International. 18th ed: Maryland: AOAC International; 2006.
40. Cordenunsi BR, Lajolo FM. Starch breakdown during banana ripening - Sucrose synthase and sucrose-phosphate synthase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 1995;43:347-51.
41. Clinical practice guidelines for nutrition in chronic renal failure. K/DOQI, National Kidney Foundation. *Am J Kidney Dis.* 2000;35(6 Suppl 2):S1-140.
42. Fouque D, Vennegoor M, ter Wee P, Wanner C, Basci A, Canaud B, et al. EBPG guideline on nutrition. *Nephrol Dial Transplant.* 2007;22 Suppl 2:ii45-87.
43. Rodrigues SD, Santos SS, Meireles T, Romero N, Glorieux G, Pecoits-Filho R, et al. Uremic toxins promote accumulation of oxidized protein and increased sensitivity to hydrogen peroxide in endothelial cells by impairing the autophagic flux. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020;523(1):123-9.
44. van Olden RW, Krediet RT, Struijk DG, Arisz L. Measurement of residual renal function in patients treated with continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J Am Soc Nephrol.* 1996;7(5):745-50.
45. Group PDAW. Clinical practice guidelines for peritoneal dialysis adequacy. *Am J Kidney Dis.* 2006;48 Suppl 1:S98-129.
46. Souza GS, Sardá FA, Giuntini EB, Gumbrevicius I, Morais MB, Menezes EW. TRANSLATION AND VALIDATION OF THE BRAZILIAN PORTUGUESE VERSION OF THE GASTROINTESTINAL SYMPTOM RATING SCALE (GSRS) QUESTIONNAIRE. *Arq Gastroenterol.* 2016;53(3):146-51.
47. Khosroshahi HT, Abedi B, Ghojzadeh M, Samadi A, Jouyban A. Effects of fermentable high fiber diet supplementation on gut derived and conventional nitrogenous product in patients on maintenance hemodialysis: a randomized controlled trial. *Nutr Metab (Lond).* 2019;16:18.
48. Snelson M, Kellow NJ, Coughlan MT. Modulation of the Gut Microbiota by Resistant Starch as a Treatment of Chronic Kidney Diseases: Evidence of Efficacy and Mechanistic Insights. *Adv Nutr.* 2019;10(2):303-20.

49. Zybaïlov BL, Glazko GV, Rahmatallah Y, Andreyev DS, McElroy T, Karaduta O, et al. Metaproteomics reveals potential mechanisms by which dietary resistant starch supplementation attenuates chronic kidney disease progression in rats. *PLoS One*. 2019;14(1):e0199274.
50. Ze X, Duncan SH, Louis P, Flint HJ. *Ruminococcus bromii* is a keystone species for the degradation of resistant starch in the human colon. *ISME J*. 2012;6(8):1535-43.
51. Laffin MR, Tayebi Khosroshahi H, Park H, Laffin LJ, Madsen K, Kafil HS, et al. Amylose resistant starch (HAM-RS2) supplementation increases the proportion of *Faecalibacterium* bacteria in end-stage renal disease patients: Microbial analysis from a randomized placebo-controlled trial. *Hemodial Int*. 2019;23(3):343-7.
52. Hold GL, Schwieritz A, Aminov RI, Blaut M, Flint HJ. Oligonucleotide probes that detect quantitatively significant groups of butyrate-producing bacteria in human feces. *Appl Environ Microbiol*. 2003;69(7):4320-4.
53. Louis P, Flint HJ. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS Microbiol Lett*. 2009;294(1):1-8.
54. Jiang S, Xie S, Lv D, Zhang Y, Deng J, Zeng L, et al. A reduction in the butyrate producing species *Roseburia* spp. and *Faecalibacterium prausnitzii* is associated with chronic kidney disease progression. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2016;109(10):1389-96.
55. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010;464(7285):59-65.
56. Joossens M, Faust K, Gryp T, Nguyen ATL, Wang J, Eloit S, et al. Gut microbiota dynamics and uraemic toxins: one size does not fit all. *Gut*. 2019;68(12):2257-60.
57. Meijers BK, De Preter V, Verbeke K, Vanrenterghem Y, Evenepoel P. p-Cresyl sulfate serum concentrations in haemodialysis patients are reduced by the prebiotic oligofructose-enriched inulin. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;25(1):219-24.
58. Salmean YA, Segal MS, Palii SP, Dahl WJ. Fiber supplementation lowers plasma p-cresol in chronic kidney disease patients. *J Ren Nutr*. 2015;25(3):316-20.
59. Ramos CI, Armani RG, Canziani MEF, Dalboni MA, Dolenga CJR, Nakao LS, et al. Effect of prebiotic (fructooligosaccharide) on uremic toxins of chronic kidney disease patients: a randomized controlled trial. *Nephrol Dial Transplant*. 2019;34(11):1876-84.
60. Li L, Xiong Q, Zhao J, Lin X, He S, Wu N, et al. Inulin-type fructan intervention restricts the increase in gut microbiome-generated indole in patients with peritoneal dialysis: a randomized crossover study. *Am J Clin Nutr*. 2020;111(5):1087-99.

61. Guarino MPL, Altomare A, Emerenziani S, Di Rosa C, Ribolsi M, Balestrieri P, et al. Mechanisms of Action of Prebiotics and Their Effects on Gastro-Intestinal Disorders in Adults. *Nutrients*. 2020;12(4).
62. Akchurin OM, Kaskel F. Update on inflammation in chronic kidney disease. *Blood Purif*. 2015;39(1-3):84-92.
63. Lau WL, Kalantar-Zadeh K, Vaziri ND. The Gut as a Source of Inflammation in Chronic Kidney Disease. *Nephron*. 2015;130(2):92-8.
64. Smith PM, Howitt MR, Panikov N, Michaud M, Gallini CA, Bohlooly-Y M, et al. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science*. 2013;341(6145):569-73.
65. Szeto CC, Kwan BC, Chow KM, Lai KB, Chung KY, Leung CB, et al. Endotoxemia is related to systemic inflammation and atherosclerosis in peritoneal dialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3(2):431-6.
66. McIntyre CW, Harrison LE, Eldehni MT, Jefferies HJ, Szeto CC, John SG, et al. 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.
67. Vaziri ND, Liu SM, Lau WL, Khazaeli M, Nazertehrani S, Farzaneh SH, et al. High amylose resistant starch diet ameliorates oxidative stress, inflammation, and progression of chronic kidney disease. *PLoS One*. 2014;9(12):e114881.
68. Tayebi Khosroshahi H, Vaziri ND, Abedi B, Asl BH, Ghojzadeh M, Jing W, et al. Effect of high amylose resistant starch (HAM-RS2) supplementation on biomarkers of inflammation and oxidative stress in hemodialysis patients: a randomized clinical trial. *Hemodial Int*. 2018;22(4):492-500.

5. CONCLUSÃO

5. Conclusão

No presente estudo, o uso da FBV não promoveu mudanças nos níveis séricos de IS, pCS e IAA. Somente em um subgrupo de participantes com a dose plena foi observada redução nos níveis séricos de IS. Os resultados do estudo evidenciam a dificuldade de inserir na alimentação diária a dose proposta de FBV. Essa dificuldade deve ser levada em consideração no desenvolvimento de estratégias dietéticas que visam reduzir a produção de toxinas urêmicas pela microbiota intestinal, uma vez que, caso haja benefício, o mesmo será dependente de uma prática contínua da estratégia em questão.



UNIFESP - HOSPITAL SÃO
PAULO - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO DA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito do uso da farinha da banana verde sobre a microbiota intestinal e toxinas urêmicas em pacientes em diálise peritoneal.

Pesquisador: Laila Santos de Andrade

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 81598017.8.0000.5505

Instituição Proponente: Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP/IEPM

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.468.821

Apresentação do Projeto:

CEP 1576/2017

Vários metabólitos que normalmente fazem parte do metaboloma sérico dos mamíferos são provenientes da microbiota colônica (20). Dentre eles estão o p-cresol e o indol que são gerados a partir da fermentação bacteriana de tirosina/fenilalanina e triptofano, respectivamente. O p-cresol após ser sulfatado na mucosa colônica ou no fígado resulta no p-cresil sulfato, enquanto a sulfatação de indol no fígado resulta na formação de indoxil sulfato (21). A excreção desses solutos é dependente do funcionamento renal, sendo assim a redução da função renal leva ao acúmulo desses compostos. Realmente, a concentração sérica de p-cresil sulfato e indoxil sulfato é marcadamente elevada em todos os estágios da DRC, com aumento gradual à medida que a função renal diminui. O acúmulo dessas duas toxinas urêmicas tem sido associado à inflamação, doença cardiovascular (22), calcificação vascular e mortalidade por doença cardiovascular e por todas as causas em indivíduos com DRC. Devido ao fato dessas toxinas se ligarem a proteínas plasmáticas elas são moléculas de difícil remoção, sendo assim pouco removidas no processo de diálise. Nesse contexto, estudos têm sido desenvolvidos a fim de encontrar estratégias que possam modular positivamente a composição e atividade metabólica da microbiota intestinal e por consequência atenuar complicações associadas à DRC. Uma das possíveis estratégias que vem sendo estudada é a suplementação com fibra alimentar facilmente fermentável, também chamada de prebiótico. Uma relação maior entre a ingestão de fibra e proteína tem sido associada a

Endereço: Rua Francisco de Castro, 55

Bairro: VILA CLEMENTINO

CEP: 04.020-090

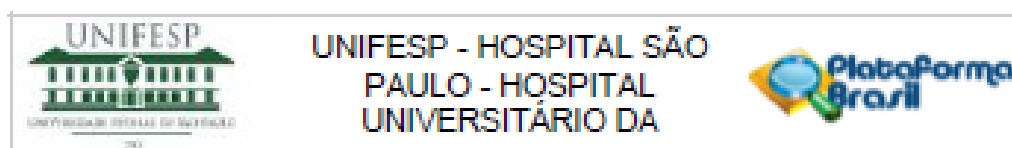
UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)5571-1052

Fax: (11)5539-7162

E-mail: cep@unifesp.edu.br



Continuação do Parecer: 2.468.821

menores concentrações séricas e/ou urinárias de p-cresil sulfato e indoxil sulfato tanto em indivíduos saudáveis como em indivíduos com DRC. Uma maior disponibilidade de fibras no cólon permite que as proteínas e aminoácidos disponíveis possam ser utilizados preferencialmente para o crescimento microbiano ao invés de produção de energia (fermentação), reduzindo assim a produção dos compostos resultantes da fermentação de aminoácidos. A disponibilidade de amido resistente no cólon parece favorecer a manutenção de uma microbiota intestinal saudável, modulando positivamente a composição e atividade metabólica dessa microbiota. Entre os produtos com quantidade significativa de amido resistente, destaca-se a farinha da banana verde (FBV) que apresenta cerca de 50% desse carboidrato.

Objetivo da Pesquisa:

Nesse contexto, nossa hipótese é que a suplementação com FBV promoverá um efeito benéfico sobre a composição e atividade microbiana intestinal com consequente redução dos níveis séricos de p-cresil sulfato e indoxil sulfato em indivíduos com DRC em diálise peritoneal.

Avaliar o impacto do uso de farinha de banana verde (FBV) sobre os níveis séricos de p-cresil sulfato e indoxil sulfato em indivíduos com DRC em diálise peritoneal.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Baixo risco.

Será utilizado um suplemento alimentar: farinha de banana verde. Sem aparentes efeitos nocivos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de projeto de Doutorado de Laila Santos de Andrade. Orientadora: Profa. Lillian Cuppari. Projeto vinculado ao Departamento de Medicina, EPM, UNIFESP.

TIPO DE ESTUDO: Trata-se de um ensaio clínico cruzado, controlado por placebo, duplo-cego, randomizado com duração de 8 semanas e washout de 4 semanas.

LOCAL: ambulatório de Diálise Peritoneal do Hospital do Rim da Fundação Oswaldo Ramos.

PARTICIPANTES: Serão incluídos no estudo 50 pacientes que estão em diálise peritoneal. -Critérios de

Inclusão: - Idade entre 18 e 80 anos; Tempo em diálise

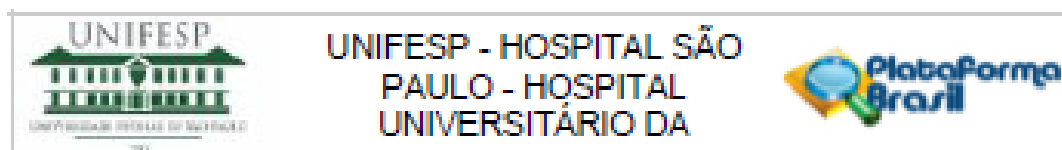
peritoneal - 3 meses. -Critérios de exclusão: - Uso de prebióticos, probióticos, simbióticos e antibióticos

dentro do período de 30 dias anterior ao início do estudo; - Doença de Crohn ou Colite ulcerativa; -

Hepatopatia grave; - Câncer; - Soro positivo ao Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV); - Peritonite; -

Ressecção de estômago ou intestino; - Complicações no acesso

Endereço: Rua Francisco de Castro, 55
 Bairro: VILA CLEMENTINO CEP: 04.020-050
 UF: SP Município: SÃO PAULO
 Telefone: (11)5571-1052 Fax: (11)5539-7152 E-mail: cep@unifesp.edu.br



Continuação do Protocolo: 2-466.021

peritoneal; - Gestação ou amamentação. Também participarão, voluntários saudáveis (acompanhantes ou parentes saudáveis dos pacientes).

PROCEDIMENTOS: INTERVENÇÃO: Será utilizada para o tratamento a farinha da banana verde (FBV), que contém cerca de 60% de amido resistente. A FBV será produzida na Universidade de São Paulo (USP), no Centro de Pesquisa em Alimentos (Food Research Center- FoRC). Como placebo será utilizado a maltodextrina. Estes suplementos serão envasados em pequenos pacotes de 9 g, em farmácia de manipulação. As doses iniciais de ambos os suplementos será de 9g/dia. A cada dois dias, na ausência de efeitos

adversos, a dose será dobrada até que se chegue à dose final de 36g/dia para os dois suplementos. Caso algum participante apresente desconforto gastrointestinal após o aumento da dose, a dose anterior será retomada e mantida. Os suplementos serão utilizados ao longo do dia no momento da alimentação. -

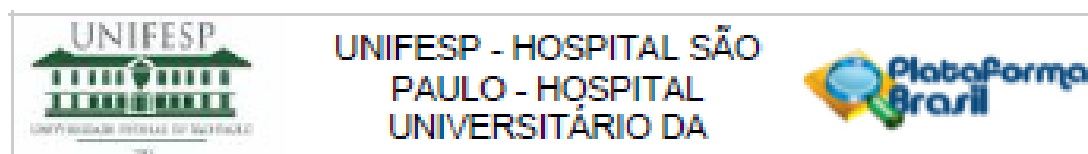
VOLUNTÁRIOS COM DRC EM

DIÁLISE PERITONEAL: Os pacientes que atenderem aos critérios de elegibilidade serão convidados, durante a rotina do ambulatório, a participarem do estudo. Após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) o participante receberá as informações necessárias para o preenchimento da escala de Bristol e do registro alimentar de três dias e será agendada uma data para coleta de sangue, fezes, dialisato drenado e urina de 24 horas para os pacientes que não forem anúricos. Nesse momento também será agendada uma primeira consulta com a nutricionista responsável pelo estudo, na qual o paciente será orientado sobre a suplementação e receberá o suplemento. Os participantes serão aleatoriamente alocados para o grupo prebiótico (FBV) ou placebo. Na primeira consulta, antes das orientações para suplementação, será realizada a avaliação nutricional, aplicação do questionário de Roma III e da escala de avaliação de sintomas gastrointestinais e será recolhida a escala de Bristol e o registro alimentar de três dias preenchidos. Como trata-se de um estudo cruzado todos os voluntários receberão a farinha da banana verde em um

determinado período do estudo. Os participantes serão aleatoriamente alocados para o grupo prebiótico (FBV) ou placebo. Ao final das primeiras oito semanas, os participantes passarão por um período de quatro semanas de washout para assim iniciarem a outra alternativa de suplementação (FBV ou placebo). -

Mensalmente os participantes passarão em consulta com o nefrologista, enfermeira e nutricionista e realizarão os exames bioquímicos de rotina do ambulatório de diálise peritoneal. Na 8ª semana os participantes serão novamente submetidos à coleta de sangue, urina de 24 horas e dialisato drenado e fezes e reavaliados conforme a primeira avaliação. A fim de auxiliar no

Endereço: Rua Francisco de Castro, 55
 Bairro: VILA CLEMENTINO CEP: 04.020-060
 UF: SP Município: SÃO PAULO
 Telefone: (11)5571-1062 Fax: (11)5539-7162 E-mail: cep@unifesp.edu.br



Continuação do Parecer: 2-466.621

aumento gradativo da dose serão realizados contatos telefônicos no 2º, 4º e 6º dia de intervenção. Ao longo da intervenção, na 2ª e na 6ª semanas um contato telefônico será realizado com a finalidade de verificar o aparecimento de sintomas adversos, alterar a dose caso haja necessidade, esclarecer possíveis dúvidas e incentivar o uso regular do suplemento. - VOLUNTÁRIOS SAUDÁVEIS: Com o objetivo de avaliar se há diferenças no perfil da microbiota intestinal de indivíduos

com DRC em diálise peritoneal os acompanhantes ou parentes saudáveis dos pacientes, com a mesma faixa etária e sexo do paciente, serão convidados a participarem dessa parte do estudo. O participante será orientado a preencher o registro alimentar de três dias e será agendada uma data para coleta de sangue (dosagem de creatinina e PCR, hemoglobina glicada), fezes, registro alimentar e avaliação do hábito intestinal por meio da aplicação do questionário de Roma III.

-ANÁLISES: As concentrações de p-cresil sulfato e indoxil sulfato serão determinadas por HPLC. Os marcadores de endotoxemia e inflamação serão determinados no soro por ELISA. A sensibilidade à insulina será avaliada a partir dos níveis plasmáticos de glicose e insulina por meio do modelo HOMA. Os sintomas gastrointestinais e

o hábito intestinal serão avaliados por meio da Escala de Avaliação de Sintomas Gastrointestinais, da Escala de Bristol e do Critério de Roma III. O perfil microbiano das fezes será avaliado por meio de técnica independente de cultivo, de alto rendimento, em plataforma Illumina MiSeq.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos obrigatórios apresentados adequadamente

1- Foram apresentados os principais documentos: folha de rosto; projeto completo; cópia do cadastro CEP/UNIFESP, orçamento financeiro e cronograma apresentados adequadamente. 2-TCLE a ser aplicado aos participantes 3- outros documentos importantes anexados na Plataforma Brasil: a)- autorização do HRim (Pasta: outrosSubmissão 1; Documento: Declaracao_hrIm.pdf) 4-Orçamento financeiro: R\$ 95.900,00. Patrocínio: FAPESP

Recomendações:

Nada consta

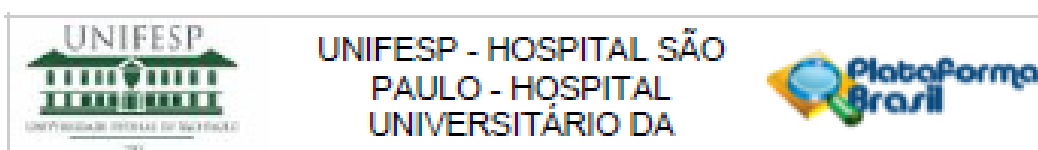
Conclusões ou Pendências e Lista de inadequações:

aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

Parecer do relator acatado pelo colegiado

Endereço: Rua Francisco de Castro, 55
 Bairro: VILA CLEMENTINO CEP: 04.020-050
 UF: SP Município: SÃO PAULO
 Telefone: (11)5571-1052 Fax: (11)5533-7162 E-mail: cep@unifesp.edu.br



Continuação do Parecer: 2.466.821

O CEP informa que a partir desta data de aprovação, é necessário o envio de relatórios parciais (anualmente), e o relatório final, quando do término do estudo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	FB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1055910.pdf	22/12/2017 19:06:57		Acelto
Outros	Declaracao_hrim.pdf	22/12/2017 18:58:32	Laila Santos de Andrade	Acelto
Outros	cep_unifesp.pdf	22/12/2017 18:55:32	Laila Santos de Andrade	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_pesquisa.pdf	22/12/2017 18:54:00	Laila Santos de Andrade	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	voluntarios_saudeaveis.pdf	22/12/2017 18:48:51	Laila Santos de Andrade	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	voluntarios_em_dialise_peritoneal.pdf	22/12/2017 18:48:34	Laila Santos de Andrade	Acelto
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	22/12/2017 18:35:38	Laila Santos de Andrade	Acelto

Situação do Parecer:

Aprovado

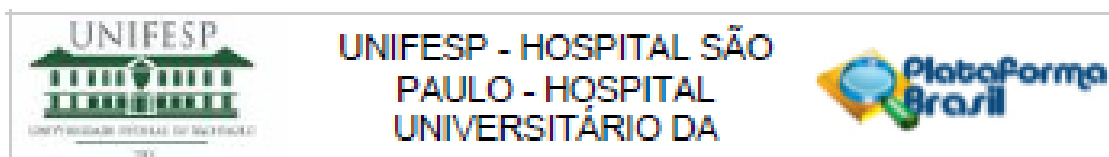
Necessita Aprovação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 17 de Janeiro de 2018

Assinado por:
Miguel Roberto Jorge
(Coordenador)

Endereço: Rua Francisco de Castro, 55
Bairro: VILA CLEMENTINO CEP: 04.030-060
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)5571-1062 Fax: (11)5539-7142 E-mail: cep@unifesp.edu.br



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Efeito do uso da farinha da banana verde sobre a microbiota intestinal e toxinas urêmicas em pacientes em diálise peritoneal.

Pesquisador: Laila Santos de Andrade

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 81598017.8.0000.5505

Instituição Proponente: Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP/IEPM

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.621.891

Apresentação do Projeto:

emenda ao protocolo

CEP 1576/2017

Vários metabólitos que normalmente fazem parte do metaboloma sérico dos mamíferos são provenientes da microbiota colônica (20). Dentre eles estão o p-cresol e o indol que são gerados a partir da fermentação bacteriana de tirosina/fenilalanina e triptofano, respectivamente. O p-cresol após ser sulfatado na mucosa colônica ou no fígado resulta no p-cresil sulfato, enquanto a sulfatação de indol no fígado resulta na formação de indoxil sulfato (21). A excreção desses solutos é dependente do funcionamento renal, sendo assim a redução da função renal leva ao acúmulo desses compostos. Realmente, a concentração sérica de p-cresil sulfato e indoxil sulfato é marcadamente elevada em todos os estágios da DRC, com aumento gradual à medida que a função renal diminui. O acúmulo dessas duas toxinas urêmicas tem sido associado à inflamação, doença cardiovascular (22), calcificação vascular e mortalidade por doença cardiovascular e por todas as causas em indivíduos com DRC. Devido ao fato dessas toxinas se ligarem a proteínas plasmáticas elas são moléculas de difícil remoção, sendo assim pouco removidas no processo de diálise. Nesse contexto, estudos têm sido desenvolvidos a fim de encontrar estratégias que possam

Endereço: Rua Francisco de Castro, 55

Bairro: VILA CLEMENTINO

CEP: 04.020-060

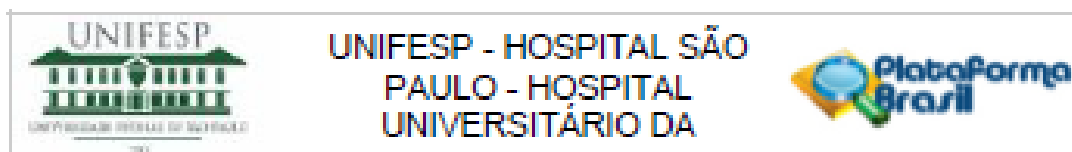
UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)5571-1062

Fax: (11)5539-7142

E-mail: cep@unifesp.edu.br



Continuação do Parecer: 3.021.061

modular positivamente a composição e atividade metabólica da microbiota intestinal e por consequência atenuar complicações associadas à DRC. Uma das possíveis estratégias que vem sendo estudada é a suplementação com fibra alimentar facilmente fermentável, também chamada de prebiótico. Uma relação maior entre a ingestão de fibra e proteína tem sido associada a menores concentrações séricas e/ou urinárias de p-cresil sulfato e Indoxil sulfato tanto em indivíduos saudáveis como em indivíduos com DRC. Uma maior disponibilidade de fibras no cólon permite que as proteínas e aminoácidos disponíveis possam ser utilizados preferencialmente para o crescimento microbiano ao invés de produção de energia (fermentação), reduzindo assim a produção dos compostos resultantes da fermentação de aminoácidos. A disponibilidade de amido resistente no cólon parece favorecer a manutenção de uma microbiota intestinal saudável, modulando positivamente a composição e atividade metabólica dessa microbiota. Entre os produtos com quantidade significativa de amido resistente, destaca-se a farinha da banana verde (FBV) que apresenta cerca de 50% desse carboidrato.

Objetivo da Pesquisa:

Nesse contexto, nossa hipótese é que a suplementação com FBV promoverá um efeito benéfico sobre a composição e atividade microbiana intestinal com consequente redução dos níveis séricos de p-cresil sulfato e Indoxil sulfato em indivíduos com DRC em diálise peritoneal.

Avaliar o impacto do uso de farinha de banana verde (FBV) sobre os níveis séricos de p-cresil sulfato e Indoxil sulfato em indivíduos com DRC em diálise peritoneal

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

conforme descrito no parecer inicial

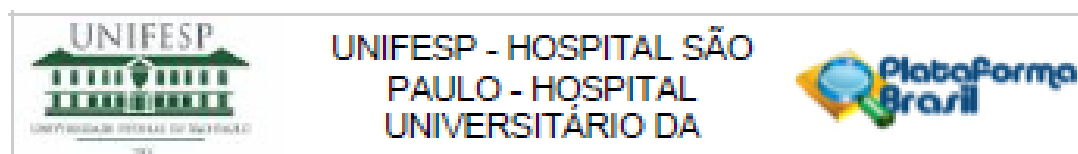
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se do envio de emenda ao protocolo - Justificativa:

- Redução da dose diária dos dois suplementos (FBV/placebo)

Após alguns testes preliminares observamos que a dose inicial proposta implicaria no uso dos suplementos em várias refeições do dia, o que poderia dificultar a alimentação dos voluntários e a adesão dos mesmos ao uso dos suplementos. Considerando que estudos com a população geral têm demonstrado efeitos benéficos do uso da FBV em quantidades menores a proposta

Endereço: Rua Francisco de Castro, 55
 Bairro: VILA CLEMENTINO CEP: 04.020-050
 UF: SP Município: SÃO PAULO
 Telefone: (11)5571-1062 Fax: (11)5533-7162 E-mail: cep@unifesp.edu.br



Continuação do Parecer: 2.021.091

Inicialmente em nosso estudo, optamos por reduzir a dose.

- Redução do período de intervenção

A fim de reduzir o risco de perda de voluntários ao longo do seguimento por peritonite ou infecção do local de saída, complicações comuns a indivíduos em diálise peritoneal. Há evidências na literatura científica de que um período de quatro semanas de intervenção dietética é capaz de alterar a composição e metabolismo da microbiota intestinal.

- Alteração do placebo que será utilizado

Considerando que o amido de milho ceroso tem mais características em comum com a FBV do que a maltodextrina (placebo proposto inicialmente), optamos por utilizá-lo como placebo. Essas mudanças no protocolo de estudo não geram riscos aos participantes da pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

documentos apresentados de forma adequada

Conclusões ou Pendências e Lista de inadequações:

emenda aprovada

Considerações Finais a critério do CEP:

parecer revisado

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PE_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_108026_9_E1.pdf	09/04/2018 19:47:17		Acelto
Outros	Carta_Emenda.docx	09/04/2018 19:45:58	Lalia Santos de Andrade	Acelto
Outros	Carta_emenda.pdf	03/04/2018 23:02:58	Lalia Santos de Andrade	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	voluntarios_em_dialise_peritoneal.pdf	13/03/2018 21:12:51	Lalia Santos de Andrade	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_pesquisa.pdf	13/03/2018 21:12:31	Lalia Santos de Andrade	Acelto
Outros	Declaracao_hrim.pdf	22/12/2017 18:58:32	Lalia Santos de Andrade	Acelto

Endereço: Rua Francisco de Castro, 55

Bairro: VILA CLEMENTINO

CEP: 04.020-050

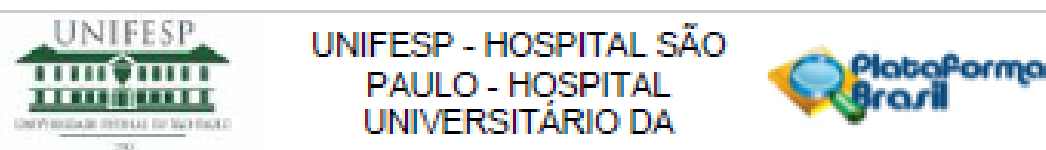
UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)5571-1062

Fax: (11)5533-7162

E-mail: cep@unifesp.edu.br



Continuação do Parecer: 2.021.891

Outros	cep_unifesp.pdf	22/12/2017 18:55:32	Laila Santos de Andrade	Acelto
TGLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	voluntarios_saudaveis.pdf	22/12/2017 18:48:51	Laila Santos de Andrade	Acelto
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	22/12/2017 18:35:38	Laila Santos de Andrade	Acelto

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 25 de Abril de 2018

Assinado por:
Miguel Roberto Jorge
(Coordenador)

Endereço: Rua Francisco de Castro, 55
Bairro: VILA CLEMENTINO CEP: 04.020-050
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)5571-1062 Fax: (11)5533-7162 E-mail: cep@unifesp.edu.br