

ALESSANDRA ZANIN ZAMBOM DE SOUZA

**“A SUPLEMENTAÇÃO VIA ORAL COM L-GLUTAMINA ALTERA
A COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL DE
INDIVÍDUOS SOBREPESOS E OBESOS”**

Limeira

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS APLICADAS

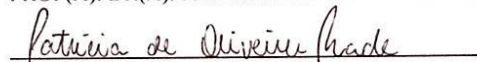
ALESSANDRA ZANIN ZAMBOM DE SOUZA

**“SUPLEMENTAÇÃO VIA ORAL COM L-GLUTAMINA ALTERA A
COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL DE INDIVÍDUOS
SOBREPESOS E OBESOS”**

Dissertação apresentada a Faculdade de
Ciências Aplicadas para obtenção do
Título de Mestra em Ciências da
Nutrição e do Esporte e Metabolismo,
na área de concentração Nutrição.

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia de Oliveira Prada

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DISSERTAÇÃO/TESE DEFENDIDA PELO ALUNO
ALESSANDRA ZANIN ZAMBOM DE SOUZA, E ORIENTADA PELO(A)
PROF(A). DR(A). PATRÍCIA DE OLIVEIRA PRADA.


(assinatura do(a) orientador(a))

**LIMEIRA,
2014**

Ficha catalográfica
 Universidade Estadual de Campinas
 Biblioteca da Faculdade de Ciências Aplicadas
 Sueli Ferreira Júlio de Oliveira - CRB 8/2380

So89s	Souza, Alessandra Zanin Zambom de, 1987- A suplementação via oral com l-glutamina altera a composição da microbiota intestinal de indivíduos sobrepesos e obesos / Alessandra Zanin Zambom de Souza. – Campinas, SP : [s.n.], 2014. Orientador: Patricia de Oliveira Prada. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas. 1. Microbiota intestinal. 2. Glutamina. 3. Actinobacteria. 4. Sobrepeso. 5. Obesidade. I. Prada, Patricia de Oliveira. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. III. Título.
-------	---

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Impact of oral supplementation with l-glutamine on gut microbiota of obese and overweight human adults

Palavras-chave em inglês:

Microbiota

Glutamine

Actinobacteria

Overweight

Obesity

Área de concentração: Nutrição

Titulação: Mestra em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Banca examinadora:

Patricia de Oliveira Prada [Orientador]

Rosângela Maria Neves Bezerra

Luiz Roberto Lopes

Data de defesa: 15-08-2014

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Autor(a): ALESSANDRA ZANIN ZAMBOM DE SOUZA

Título: "SUPLEMENTAÇÃO VIA ORAL COM L-GLUTAMINA ALTERA A COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL DE INDIVÍDUOS SOBREPESOS E OBESOS"

Natureza: MESTRADO

Instituição: FACULDADE DE CIÊNCIAS APLICAS - UNICAMP

Data da Defesa: Limeira, 15/08/2014

BANCA EXAMINADORA

Prof(a). Dr(a). Patrícia de Oliveira Prada (Orientadora)


Assinatura

Prof(a). Dr(a). Rosângela Maria Neves Bezerra


Assinatura

Prof(a). Dr(a). Luiz Roberto Lopes


Assinatura

RESUMO

Introdução: Inúmeros fatores contribuem para o aumento da obesidade em todo o mundo. Recentemente, a microbiota intestinal ganhou destaque devido ao seu poder de predispor ou inibir o ganho de peso. Alguns nutrientes são capazes de alterar a composição da microbiota intestinal, o que pode trazer efeitos benéficos ou maléficos, como a obesidade. O aminoácido L-glutamina, além de suas inúmeras funções orgânicas e imunológicas, é conhecido por desempenhar importante papel no trofismo intestinal. O objetivo do presente estudo foi investigar alterações na composição da microbiota intestinal de indivíduos com sobrepeso ou obesidade após suplementação oral com L-glutamina.

Métodos: Voluntários com sobrepeso ou obesidade foram selecionados para ingerir 30g de L-glutamina (GLN) por via oral ao dia, por um período de quatorze dias. O grupo controle recebeu L-alanina (ALA) no mesmo tempo e proporção. Amostras de sangue e fezes foram coletadas para análises. Para classificação taxonômica das bactérias intestinais, foi realizado sequenciamento do gene 16S RNA ribossomal. Análises de bioinformática foram conduzidas com base no banco de dados RDP (Ribosomal Database Project). Para análise dos dados, estratégias estatísticas variadas foram utilizadas.

Resultados: Após quatorze dias de suplementação, os participantes do grupo GLN exibiram diferenças significativas nos filos Actinobacteria e Firmicutes e nos gêneros *Dialister*, *Dorea*, *Pseudobutyrvibrio* e *Veillonella*, comparados com o grupo ALA. A razão F / B (Firmicutes / Bacteroidetes), um bom biomarcador para a obesidade, reduziu de 0,85 para 0,57 no grupo GLN e ao contrário, aumentou de 0,91 para 1,12 no grupo ALA.

Conclusão: A suplementação oral do aminoácido L-glutamina, em humanos com sobrepeso e obesidade, por um período de quatorze dias, promove alterações na composição da microbiota intestinal similares às promovidas pela perda de peso.

Palavras chave: Microbiota intestinal, glutamina, actinobacteria, sobrepeso, obesidade.

ABSTRACT

Introduction: Several factors contribute to the increase of obesity worldwide. Recently, the gut microbiota gained prominence due to its power to predispose or inhibit weight gain. Some nutrients are able to change the composition of the gut microbiota, what can bring beneficial or harmful effects, such as obesity. The amino acid L-glutamine, in addition to its numerous organic and immune functions, is known to play an important role in intestinal tropism. The aim of this study was to investigate changes in the composition of the gut microbiota of overweight or obese adults after oral supplementation with L-glutamine.

Methods: Overweight or obese subjects were selected to orally ingest 30g of L-glutamine (GLN) daily for a period of fourteen days. The control group received L-alanine (ALA) in the same period and proportion. Blood and feces were collected for analysis. The 16S rRNA gene sequence was performed for taxonomic classification of intestinal bacteria. Bioinformatics analysis was conducted based on RDP (Ribosomal Database Project). For data analysis, varied statistical strategies were used.

Results: After fourteen days of supplementation, participants in the GLN group showed significant differences in the Firmicutes and Actinobacteria phyla and Dialister, Dorea, Pseudobutyrvibrio and Veillonella genera, compared with the ALA group. The F / B (Firmicutes / Bacteroidetes) ratio, a good biomarker for obesity, decreased from 0.85 to 0.57 in GLN group and, as opposed, increased from 0.91 to 1.12 in the ALA group.

Conclusion: Oral supplementation with the amino acid L-glutamine in overweight and obese humans, for a period of fourteen days, alters the composition of the gut microbiota in a similar way to weight loss.

Keywords: Microbiota, glutamine, actinobacteria, overweight, obesity.

SUMÁRIO

Resumo	vii
Abstract	ix
1- Introdução	17
1.1 - A microbiota intestinal e a influência da dieta.....	19
1.2 - Glutamina.....	20
2- Objetivos	22
3- Artigo	24
3.1- Impact of Oral Supplementation with L-Glutamine on Gut Microbiota of Obese and Overweight Human Adults	
4- Discussão	39
5- Considerações Finais	45
6- Conclusão	47
7- Referências.....	49
8- Anexos	53
Anexo 1. Declaração Hospital Estadual Sumaré.....	54
Anexo 2. Parecer Consubstanciado do CEP.....	56
Anexo 3. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	60
Anexo 4. Comparação ALA e GLN nível Filo.....	63
Anexo 5. Comparação ALA e GLN nível Gênero.....	65
Anexo 6. Alterações individuais na Microbiota nível Filo.....	67
Anexo 7. Alterações individuais na Microbiota nível Gênero.....	73
Anexo 8. Consumo calórico.....	77
Anexo 9. Gráficos da microbiota intestinal Grupo ALA nível Filo.....	79
Anexo 10. Gráficos da microbiota intestinal Grupo GLN nível Filo.....	82
Anexo 11. Gráficos da microbiota intestinal Grupo ALA nível Gênero.....	86
Anexo 12. Gráficos da microbiota intestinal Grupo GLN nível Gênero.....	89

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a todos que me ajudaram e tornaram possível o desenvolvimento deste trabalho. Em especial, aos meus pais, Carlos e Rosângela, por toda formação pessoal e acadêmica e pelo apoio e amor incondicional que me possibilitaram chegar até aqui.

Ao Marcel, meu esposo, pelo amor, respeito e compreensão e por ter me ajudado e apoiado nos momentos mais difíceis, tornando minha vida mais leve e feliz a cada dia.

Ao meu irmão Adriano, pelo amor e paciência e pelas inúmeras discussões científicas e contribuições estatísticas, mesmo quando estava fora do país.

À Professora Patrícia de Oliveira Prada, pela sua orientação, apoio, confiança e pelas opiniões e críticas tão importantes para a realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos também a todos do Hospital Estadual Sumaré que possibilitaram a realização do estudo *in loco*, em especial à gerente de serviços de apoio Luciana Gullo, à supervisora da nutrição Alessandra Marega, ao gerente administrativo Waldir Prado, à gerente e à coordenadora de enfermagem Joyce e Marcela, às enfermeiras da medicina do trabalho Tamires e Gilda, a então coordenadora do Centro de Ensino e Pesquisa Dra. June Freire, ao gerente geral Wagner Lourenço, à gerente financeira Cláudia Monegatte, ao diretor de assistência Dr. Maurício Perroud e ao ex-superintendente Dr. Lair Zambon, por incentivarem o crescimento acadêmico, pelo total apoio, compreensão e ajuda essenciais no desenvolvimento deste trabalho.

Às minhas colegas de trabalho Luísa, Ana Claudia e Mayara, por me escutarem e me apoiarem nos momentos difíceis e por vibrarem nos momentos alegres.

Às colegas de mestrado Fabiana, Kahlile e Sabrina, pela ajuda e trabalho em equipe.

Em especial à todos os participantes da pesquisa, funcionários do Hospital Estadual Sumaré, pela disponibilidade e confiança. Sem eles, nada disso seria possível.

Ao CNPq e CAPES, pelo apoio financeiro para a execução desse projeto.

LISTA DE ABREVIATURAS

ALA – grupo Alanina

CC – Circunferência da Cintura

CHO – Carboidrato

F / B – Firmicutes / Bacteroidetes

FISH - Hibridação in situ fluorescente (Fluorescence in situ hybridization)

GLN – grupo Glutamina

HOMA-IR - Índice de resistência à insulina – (Homeostasis model assessment -insulin resistance index).

IMC – Índice de Massa Corporal

Kcal – Kilocalorias

LIP- Lipídeo

PCR - Reação em cadeia da polimerase (Polymerase chain reaction)

PTN – Proteína

qRT PCR - PCR quantitativo em tempo real.

RDP – Banco de dados ribossomais “Ribosomal Database Project”

rRNA - Ácido ribonucleico ribossômico (Ribosomal ribonucleic acid)

A obesidade é um grave problema de saúde pública que afeta milhões de indivíduos em todo o mundo (1). Esta patologia altera a diversidade da microbiota intestinal e a forma como os indivíduos extraem a energia a partir de nutrientes e armazenam estas calorias no tecido adiposo (2). Nota-se que quando uma população é submetida ao mesmo estresse nutricional, alguns indivíduos são menos suscetíveis ao ganho de peso e à hiperglicemia, sugerindo que outros mecanismos, que não estão diretamente relacionados ao genoma humano, podem estar envolvidos na pandemia da obesidade (3). Pesquisas recentes demonstram que a obesidade pode estar relacionada com um desequilíbrio na microbiota intestinal. Este é um campo de pesquisa em franco crescimento e ao longo dos últimos anos, a investigação do *link* entre a microbiota intestinal e a obesidade tornou-se destaque na comunidade acadêmica (4). Estudos do grupo conduzido por Jeffrey Gordon em 2004 e nos anos seguintes foram os primeiros a expor que alterações na composição da microbiota intestinal estão associadas com a obesidade, ao demonstrarem que existem diferenças taxonômicas no filo das bactérias intestinais entre magros e obesos (5-7). Ainda é muito pouco conhecido como a composição da microbiota intestinal pode ser alterada pela dieta ou por outros fatores, porém sua influência no estado de saúde ou doença tem sido mais aceita à medida que os esforços nesta área de pesquisa vão se fortalecendo (8).

O papel fundamental da microbiota era esquecido, mas agora foi revelado com um forte impacto na saúde e bem estar. Existem dez vezes mais células bacterianas do que humanas no corpo (9). Comunidades bacterianas especializadas habitam a pele, mucosa e trato gastrointestinal, em uma relação de simbiose com intensas contribuições para o desenvolvimento, metabolismo e imunidade do hospedeiro (10). Recentemente, a microbiota intestinal ganhou reconhecimento como um verdadeiro órgão, dado seu potencial metabólico, sua habilidade de interagir com outros tecidos, incluindo células imunes e neurais e ainda mais, sua receptividade ao transplante (11). Estudos sugerem que ao transferir a microbiota intestinal de animais obesos para animais *germ-free*, há uma alteração na microbiota intestinal, com concomitante alterações no gasto energético, ingestão e absorção (4), o que resulta na transferência

de características associadas à síndrome metabólica, do doador para o destinatário (12, 13).

O intestino humano abriga uma complexa comunidade de microrganismos, em sua maioria bactérias anaeróbias. A grande maioria das bactérias pertencem a quatro principais filos: Bacteroidetes (compreende os gêneros gram-negativos *Bacteroides*, *Prevotella*, entre outros), Firmicutes (compreende os gêneros gram-positivos *Clostridium*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Faecalibacterium*, entre outros), Actinobacteria (compreende o gênero gram-positivo *Bifidobacterium*) e Proteobacteria (compreende o gênero *Enterobacteriaceae* com *Escherichia coli* como o representante mais predominante). Esses correspondem a mais de 90% de toda a comunidade bacteriana (8, 12, 13).

Ao nascer, os seres humanos são praticamente livres de micro-organismos. O estabelecimento de uma microbiota estável é moldado durante o primeiro ano de vida (14), e depende da via do parto (vaginal ou cesariana), alimentação na primeira infância e o desmame, que são fatores fundamentais que impactam a diversidade e riqueza da microbiota intestinal, com profundo impacto na saúde (15-17). A concentração fecal de *Bifidobacterias* é maior em crianças com peso normal do que em crianças com tendência à obesidade, o que mostra que determinadas composições da microbiota intestinal podem preceder o ganho de peso (18, 19). O processo de colonização bacteriana continua na vida adulta, formando uma microbiota intestinal complexa, relativamente estável e peculiar a cada indivíduo. Esta microbiota e seus metabólitos fornecem uma enorme diversidade de genes e funções metabólicas, capazes de aumentar a extração de energia, modular o sistema imunológico e alterar o metabolismo lipídico (20).

A microbiota intestinal e a influência da dieta

A microbiota intestinal é um fantástico reservatório de enzimas que permite a degradação de nutrientes e sua utilização. A maioria das bactérias intestinais obtém energia a partir da fermentação de substratos não digeríveis, tais como os carboidratos complexos (fibra dietética) (12). As escolhas alimentares impactam fortemente a composição bacteriana e consequentemente suas funções (11). Este impacto já foi

demonstrado por estudos comparativos de crianças na Europa com a África Rural e dos Estados Unidos com Bangladesh, ao sugerirem que a composição das bactérias intestinais é diferente em países desenvolvidos, quando comparados com países em desenvolvimento, principalmente pelas diferenças alimentares encontradas nestes locais (21, 22).

O grande desafio dos estudos nesta área é identificar membros específicos da microbiota intestinal que sejam mais relevantes em desempenhar um papel causador e/ou inibidor da obesidade, além de determinar quais nutrientes podem influenciar benéficamente a composição microbiana (23, 24).

Nos últimos anos tem crescido o interesse em estudos com aminoácidos, que estão diretamente ligados à saúde e/ou doença dos seres humanos e outros animais. Pesquisas na área de nutrição mostram que a suplementação com determinados aminoácidos é capaz de modular a expressão gênica, melhorar o crescimento do intestino delgado e músculo esquelético e reduzir a adiposidade corporal (25). Um aminoácido que se destaca por seu potencial funcional é a L-glutamina, que além de ser precursora de um número considerável de vias metabólicas, ainda contribui com uma parcela nutricionalmente importante para geração de energia intestinal. A glutamina desempenha um papel fisiológico no intestino, porém, sua síntese endógena exerce função ainda não totalmente caracterizada na mucosa intestinal (26).

Glutamina

A glutamina ($C_5H_{10}N_2O_3$) é um aminoácido que pode ser sintetizada por todos os tecidos do organismo. Possui característica hidrofílica, sendo facilmente hidrolisada por ácidos ou bases (27). É classificada como um aminoácido não essencial, uma vez que pode ser sintetizada pelo organismo a partir de outros aminoácidos. Entretanto, esta classificação tem sido questionada, pois em situações críticas, tais como cirurgias, traumas e exercícios físicos exaustivos, a síntese de glutamina não supre a demanda exigida pelo organismo, tornando-a um aminoácido condicionalmente essencial (28, 29). A glutamina é o aminoácido livre mais abundante no plasma e no tecido muscular, sendo também encontrada em concentrações relativamente elevadas em outros diversos tecidos corporais (30). Quantitativamente, o principal tecido de síntese,

estoque e liberação de glutamina é o tecido muscular esquelético (31). Algumas das funções mais importantes que envolvem a glutamina são a proliferação e desenvolvimento de células, em especial do sistema imune, o balanço ácido-básico, o transporte da amônia entre os tecidos e a doação de carbono para a gliconeogênese (32). Além disto, este aminoácido também é eficaz na proteção de células do epitélio intestinal (enterócitos) (33).

A glutamina é amplamente disponível como suplemento. Há evidências que sua adição via enteral ou parenteral são benéficas para manter a integridade intestinal (26, 34, 35). É comum ser administrada por via oral em doses altas durante tratamentos de quimio e radioterapia (36, 37).

Um estudo intervencionista, realizado com 24 adultos com ou sem *diabetes mellitus*, mostrou que a suplementação de L-glutamina foi associada com o aumento da tolerância à glicose (38). Outra intervenção dietética, com suplemento de L-glutamina, reduziu em cinquenta por cento o depósito de gordura central de ratos alimentados com uma dieta rica em gorduras e melhorou a sensibilidade à insulina nestes animais (39). Entretanto, ainda não foi investigado se a suplementação com L-glutamina altera o perfil bacteriano da microbiota intestinal. Estudos são necessários para melhorar a compreensão do papel da microbiota intestinal na homeostase energética e esclarecer como a sua manipulação pode ser alvo para a intervenção nutricional e farmacológica no tratamento da obesidade.

O objetivo do estudo é investigar se há alteração na composição da microbiota intestinal, de indivíduos com sobrepeso e obesidade, após a suplementação oral com L-glutamina por um período de quatorze dias.

3.1 Manuscript

Elsevier Editorial System (tm) for NUTRITION

Article title: Impact of Oral Supplementation with L-Glutamine on Gut Microbiota of Obese and Overweight Human Adults

Journal title: Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)

Current Indexing Status: Currently indexed for MEDLINE.

Corresponding author: Prof. Patricia O. Prada

First author: Alessandra Zanin Zambom de Souza

Impact of Oral Supplementation with L-Glutamine on Gut Microbiota of Obese and Overweight Human Adults

Alessandra Zanin Zambom de Souza¹, Adriano Zanin Zambom, Ph.D.², Kahlile Youssef Abboud¹, Sabrina Karen Reis¹, Fabiana Tannihão¹, Patrícia de Oliveira Prada, Ph.D.^{1,3}

¹School of Applied Sciences; ²Department of Statistics; ³Department of Internal Medicine, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

Please address correspondence to: Patricia O. Prada, PhD., School of Applied Sciences, University of Campinas – UNICAMP - Rua Pedro Zaccaria, 1300 - Jd. Sta Luiza 13484-350, Limeira, SP, Brazil. Phone/Fax: +55 19 35218950, e-mail: pprada@fcm.unicamp.br

Word count: 4168

Number of figures and tables: 5

Abstract

Objective: The goal of the present study was to determine whether an oral supplementation with L-glutamine modifies gut microbiota composition in overweight and obese adults.

Methods: Thirty three overweight and obese adults were randomly assigned to either orally ingest 30g of L-alanine (ALA group-control) or 30g of L-glutamine (GLN group) daily for a period of fourteen days. We analyzed the gut microbiota composition with new generation sequencing techniques and bioinformatics analysis.

Results: After fourteen days of ingestion, subjects in the GLN group exhibited statistically significant difference in Firmicutes and Actinobacteria phyla compared with those in the ALA group. The F/B (Firmicutes/Bacteroidetes) ratio, a good biomarker for obesity, decreased in the GLN group from 0.85 to 0.57, while increased from 0.91 to 1.12 in the ALA group. At the genus level, *Dialister*, *Dorea*, *Pseudobutyrvibrio* and *Veillonella*, belonging to the Firmicutes phylum, had statistically significant reduction.

Conclusion: Oral supplementation with L-glutamine promotes beneficial changes in the composition of the gut microbiota in overweight and obese humans, which resembled the weight loss programs already seen in the literature.

Keywords: Microbiota, glutamine, actinobacteria, overweight, obesity.

Introduction

Obesity is a serious public health problem that affects millions of individuals worldwide (1). This condition alters the diversity of the gut microbiota and consequently how individuals extract energy from nutrients and store these calories in adipose tissue (2). It is well known that gut microbiota plays an important role in modulating digestive, endocrine, and immune systems (3). For a healthy individual, the microorganisms that reside in the gut assist the capture of energy from food through the fermentation of non-digestible food components. Moreover, they provide protective effects on the intestinal epithelium and the immune system (4). However, an imbalance

of these microbial communities can lead to negative consequences including intestinal inflammation, allergies, infection, cancer, gastrointestinal disorders and obesity (5, 6).

Studies suggest that the transplantation of gut microbiota from obese to nonobese germ-free mice, yields changes in expenditure, intake and absorption of energy (6, 7), resulting in the transfer of metabolic syndrome-associated features from the donor to the recipient (5, 8). Over the last few years, researchers have extensively investigated the link between gut microbiota and obesity (6, 9-12). While the details of this relationship are still unclear, recent research in this area demonstrate the existence of an interaction between microbiota and diet (11). For example, it is known that the amino acid L-glutamine plays a physiological role in the gut and contributes to a nutritionally important portion of intestinal energy generation (13, 14). However, so far there has been no thorough investigation of the effects of L-glutamine on the gut microbiota.

Consequently, interventional studies are needed to improve the understanding of the role of gut microbiota in energy homeostasis and hence, decipher how its manipulation can be targeted for nutritional and pharmacological intervention in the treatment of obesity. Therefore, the aim of this study was to investigate whether oral supplementation with L-glutamine alters the composition of the gut microbiota of overweight and obese human adults.

Methods

All procedures were approved by the Ethics Committee of the College of Medical Sciences at State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil, and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki (1964). All participants provided written consent prior to their enrollment.

Study Design

The study was conducted at the State Hospital of Sumare, in Sumare, São Paulo, Brazil. All volunteers were employees in the hospital and were randomly recruited under the following criteria: age between 20 and 60 years and body mass index (BMI) ≥ 25.0 kg/m². The exclusion criteria included renal or thyroid disease, hormonal problems, pregnancy, use of antidepressant, laxative or anorectic drugs and/or use of antibiotics within two months prior to enrollment.

In this double-blind, 14-day study, participants were randomly divided into two groups: Glutamine (GLN) (N=21) and Alanine (ALA) (N=12). They received a kit containing small

packs with 15g of amino acid (GLN or ALA) each, with varying artificial flavors, to be diluted in 200 ml of water at the time of intake. They were instructed to take two packs per day, totaling 30g of amino acid per day. All volunteers were instructed to maintain their diets and physical activities as usual.

Clinical Measurements and Biochemical Analysis

Overnight fasted volunteers came to the hospital in the morning on 2 separate days, baseline (day 0) and 14th day, for blood sample collection and body measurements. Body weight and height were measured using a Filizola scale with an anthropometer (PL 200 model). The Body Mass Index (BMI) was calculated dividing weight by height squared (kg/m²) and waist circumference was measured in centimeters.

The blood samples from the volunteers were collected into tubes, which were then placed on ice and immediately centrifuged at 1500 rpm for 15 min at 18°C using a Centrifuge BiofugeStratos (Hereaus, DijkstraVereenigde, Lelystad, Netherlands). Glucose concentration was determined by the glucose oxidase method and serum insulin was determined using the Human Insulin ELISA kit (EMD Millipore Ezhi-14K) from Millipore®, St. Charles, Missouri, United States. The HOMA-IR test (Homeostasis Model Assessment) was calculated to determine insulin resistance.

A 24-hour food record was documented before and after the supplementation, together with the food diary of three consecutive days half way into the study. Dietary data were computed using Dietpro Nutrition ® 4.0 software.

Gut Microbiota Analysis (New generation Sequencing)

To assess gut microbiota, samples of approximately 5 g of feces were collected from all participants at baseline and after the 14-day treatment, using sterile stool containers and gloves. All samples were stored in sterile tubes at -80 °C until use. Total bacterial DNA was extracted from the fecal samples using the QIAamp DNA Stool Mini kit (QIAGEN, GmbH, Germany) according to the manufacturer's protocol. DNA concentration and quality in the extracts were determined by agarose gel electrophoresis and with a NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA).

Twenty-two primers were designed to sequence the V3 region of the 16S rRNA gene, using the Forward 338 F and Reverse 533 R positions. The primers were used to amplify the DNA sequence using *Platinum Taq High Fidelity PCR*. The preparation of the genomic sample was made with *Nextera XT kit*, and the sequencing was run on *IlluminaMiSeq®* platform. The experiment was designed to obtain overlapping fragments paired end 250 base pairs and generated an output of 5 Gb. To determine which organism the sequence originated, we used *rdp_classifier Software* and database *RDP* (Ribosomal Database Project) and adopt the percentage of similarity of 80%.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using the statistical software *R* (www.r-project.com) and SAS (SAS Institute Inc.) while the data were processed using Excel software. Continuous variables were expressed as the mean and standard deviation. Comparisons for continuous variables between the groups were performed with Student t-test for parameters with a normal distribution, which was tested with the Anderson-Darling normality test. If the normality was not satisfied, comparisons between groups were made with the Wilcoxon Mann–Whitney test. In addition, we performed an advanced statistical procedure proposed by Aban, Cutter and Mavinga (2008) (15). We considered the counts of bacteria at each time point, baseline and 14th day, as two random samples and specified the null hypothesis H_0 as: the mean count of bacteria is the same in both time periods. The counts were modeled by Negative Binomial distributions to deal with overdispersion. Then, the likelihood under the null and alternative hypothesis was computed and a generalized likelihood ratio test (GLRT) was performed for GLN and ALA groups separately. A $P < 0.05$ was considered significant.

Results

A total of 33 patients with a mean age of 38.5 (23–59) years were enrolled in the study. Both ALA and GLN groups were comparable in all clinical and laboratory characteristics at baseline and at the end of study (Table 1). There were no significant differences in body weight, BMI, WC, fasting glucose, insulin and HOMA-IR between the groups. Furthermore, Kcal, lipids, proteins and carbohydrates consumption did not differ statistically between groups (Table 2).

Table 1

Subjects Metabolic Characterization

	ALA GROUP		GLN GROUP		P
	Before	After	Before	After	
Height (m)	1.62 ± 0.07		1.59 ± 0.06		0.15
Weight (kg)	78.3 ± 16.0	78.4 ± 15.66	86.7 ± 15.17	86.66 ± 15.25	0.59
BMI (kg/m ²)	29.3 ± 4.38	29.4 ± 4.25	34.45 ± 5.91	34.42 ± 5.95	0.57
WC(cm)	90.2 ± 9.2	88 ± 7.8	96.9 ± 11.87	94.8 ± 11.62	0.84
Fasting glucose (mg /dl)	84.12 ± 7.95	84.82 ± 8.98	79.63 ± 9.1	83.94 ± 10.47	0.11
Insulin (mU/l)	1.51 ± 2.21	2.51 ± 3.56	2.44 ± 2.0	2.75 ± 3.11	0.40
HOMA-IR	2.24 ± 1.59	2.26 ± 2.08	2.33 ± 1.32	2.61 ± 1.40	0.36

ALA: alanine (n=12); GLN: glutamine (n=21); BMI: body mass index; WC: waist circumference.

Data are expressed as mean ± SD. P-value from unpaired Student t-test under normality and Wilcoxon Mann-Whitney test otherwise.

Table 2

Daily dietary macronutrient intakes in ALA and GLN groups

	ALA GROUP	GLN GROUP	P
Kcal	1520 ± 409.3	1756 ± 482.5	0.24
CHO (%)	54.9 ± 9.6	50.5 ± 8.1	0.28
LIP (%)	30.6 ± 6.7	34.8 ± 10.7	0.28
PTN (%)	19.8 ± 18.5	19.9 ± 9.6	0.98

ALA: alanine (n=12); GLN: glutamine (n=21); Kcal: kilocalories; CHO: carbohydrate; LIP: lipids; PTN: proteins;

Data are expressed as mean ± SD. P-value from unpaired Student t-test under normality and Wilcoxon Mann-Whitney test otherwise.

Gut Microbiota Composition

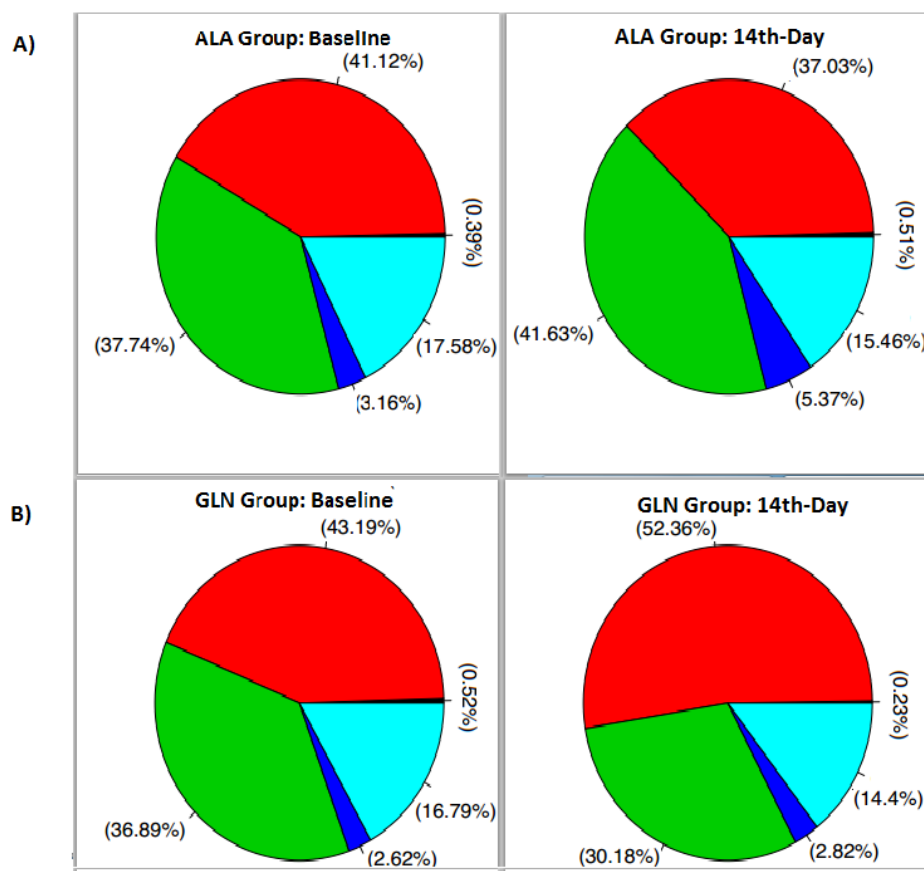
Twelve phyla and 210 genera were observed in the gut microbiota of most volunteers. Certain groups of dominant bacteria were detected, mainly Bacteroidetes and Firmicutes phyla, and *Alistipes*, *Bacteroides*, *Megasphaera*, *Prevotella*, *Phascolarctobacterium* and *Succinivibrio* genera.

Figure 1 displays the relative proportions of the most relevant phyla at baseline and the 14th day for ALA and GLN groups. After ALA treatment we observed a decreasing trend of the Bacteroidetes phylum and an increasing trend in the relative proportion of Firmicutes and

Actinobacteria phyla (Figure 1A). In contrast, there was an increasing trend in the relative proportion of the Bacteroidetes phylum and a reduction of Firmicutes and Actinobacteria phyla after 14 days of GLN treatment (Figure 1B). The proportion of Proteobacteria slightly increased in both groups. These trends in the relative proportions were close, but did not reach statistical significance, perhaps due to the reduced number of subjects.

Figure 1

Gut Microbiota Profile



Data were collected before and after 14 days of supplementation with ALA: alanine (n=12) or GLN: glutamine (n=21); Relative percentage of major phyla found in the gut microbiota of subjects in ALA Group (Figure A) and in the GLN Group (Figure B) at Baseline and 14th-Day. Major phyla found were Actinobacteria (black), Bacteroidetes (red), Firmicutes (green), Proteobacteria (blue), and others (cyan).

However, when we analyzed the comparison between the differences in phylum abundance (14th day minus baseline) of ALA and GLN groups, we observed that Actinobacteria and Firmicutes statistically differed between groups, most likely due to the steep decrease of these

phyla in the GLN group. There were no significant differences between groups for the Acidobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria/ Chloroplast, Fusobacteria, Lentisphaerae, Proteobacteria, Synergistetes, TM7, Tenericutes and Verrucomicrobia phyla (Table 3).

Table 3

Fecal microbiota composition at phylum level in ALA and GLN treated subjects

Phylum	Mean difference (14 th -day – baseline)		P
	ALA group	GLN group	
Acidobacteria	0 ± 2.08	-0.71 ± 2.65	0.34
Actinobacteria	65.66 ± 1020.5	-165309 ± 3400.1	0.01*
Bacteroidetes	-34679.66 ± 126210.5	-33471.47 ± 86117.4	0.51
Cyanobacteria/Chloroplast	-2.66 ± 6.86	0.38 ± 5.28	0.32
Firmicutes	-13238.75 ± 33010.3	-74831.19 ± 100202.6	0.01*
Fusobacteria	-84.08 ± 285.0	-3.23 ± 7.05	0.27
Lentisphaerae	-65.41 ± 214.9	-12.80 ± 133.46	0.50
Proteobacteria	3479.58 ± 12029.5	-3151.95 ± 12020.5	0.12
Synergistetes	-30.66 ± 97.56	-155 ± 466.6	0.75
TM7	7.41 ± 12.57	-3.52 ± 12.69	0.38
Tenericutes	11.91 ± 42.23	0.47 ± 1.24	0.08
Verrucomicrobia	-1.58 ± 25.81	2.28 ± 76.01	0.58

Data were collected before and after 14 days of supplementation with ALA: alanine (n=12) or GLN: glutamine (n=21). Data are expressed as mean ± SD. Student t-test was used for Firmicutes phylum (normal distribution) and Wilcoxon Mann–Whitney tests were used for the other phyla. * P ≤ 0.05.

Table 4 shows a comparison between the difference in the most important genera expression (14thday minus baseline) of ALA and GLN treatments. There were no significant differences between groups for the *Bifidobacterium*, *Alistipes*, *Bacteroides*, *Barnesiella*, *Parabacteroides*, *Prevotella*, *Blautia*, *Clostridium* XIVa, *Faecalibacterium*, *Lachnospiraceaincertaedis*, *Megasphaera*, *Phascolarctobacterium*, *Roseburia*, *Ruminococcus*, *Gemmiger* and *Succinivibrio* genera. However, differences of *Dialister*, *Dorea*, *Pseudobutyrvibrio* and *Veillonella* genera statistically differed between groups. Moreover, all genera belonging to the Firmicutes phylum, showed a decreasing trend in the GLN group, while only 4 of them showed a decreasing trend in the ALA group.

The results obtained using the GLRT with Negative Binomial distributions showed that only the mean counts of Actinobacteria and Firmicutes at the 14th day were significantly different from those of their baseline (p-values 0.006 and 0.002 respectively) for the GLN group. On the other hand, no significant difference was found, except for the Lentisphaerae phylum (p-value 0.043) for the ALA group. These conclusions support the previous results in the sense that, the mean counts of the GLN group that statistically differ (GLRT) from baseline to the 14th day, induce the significant differences between the groups found by the t and Wilcoxon tests.

We found significant differences by using the GLRT in the abundance of *Alistipes* (p-value 0.02), *Bacteroides* (p-value 0.00) and *Prevotella* (p-value 0.00) genera, for the Bacteroidetes phylum, and of *Blautia* (p-value 0.02), *Dialister* (p-value 0.01), *Dorea* (p-value 0.003), *Faecalibacterium* (p-value 0.002), *Lachnospiraceaincertaedis* (p-value 0.01), *Phascolarctobacterium* (p-value 0.02), *Roseburia* (p-value 0.04) and *Ruminococcus* (p-value 0.001) genera that belong to the Firmicutes phylum, after GLN treatment. Thereby, these results corroborated the findings of the reduction on the entire Firmicutes phylum.

On the other hand, only *Bacteroides* (p-value 0.00), *Faecalibacterium* (p-value 0.01) and *Pseudobutyrvibrio* (p-value 0.01) were significantly different after ALA treatment, but these differences were not enough to statistically alter the composition of any phylum.

Table 4

Fecal microbiota composition at genus level in ALA and GLN treated subjects

Genus	Mean difference (14 th -day – baseline)		P
	ALA group	GLN group	
(A) Bifidobacterium	-60.66 ± 483.4	-715.47 ± 2124.3	0.29
(B) Alistipes	-2510.41 ± 2644.9	-5980.95 ± 12273.4	0.54
(B) Bacteroides	-17979.33 ± 45051.7	-19079.42 ± 45773.4	0.98
(B) Barnesiella	-1185.33 ± 4295.2	-21.42 ± 867.4	0.42
(B) Parabacteroides	-1390.08 ± 4604.4	-1785.66 ± 7924.2	0.83
(B) Prevotella	-13513.16 ± 67303.7	11435.33 ± 66240.5	0.98
(F) Blautia	49 ± 2573.1	-2073.19 ± 6131.1	0.42
(F) Clostridium XIVa	-1136.91 ± 2177.8	-742.95 ± 7146.7	0.99
(F) Dialister	2.91 ± 69.28	-1390.71 ± 2579.5	0.03*
(F) Dorea	517.91 ± 1657.0	-1845.85 ± 4480.2	0.05*

(F) Faecalibacterium	-3078.91 ± 11534.9	-10716.80 ± 21398.7	0.36
(F) Lachnospiracea_incertae_sedis	-1608.16 ± 3591.8	-5392.04 ± 12101.1	0.89
(F) Megasphaera	4051.33 ± 14804.6	-198.04 ± 853.8	0.17
(F) Phascolarctobacterium	3747.41 ± 11990.8	-1144.71 ± 2861.7	0.26
(F) Pseudobutyrvibrio	10.91 ± 17.85	-5.85 ± 16.78	0.007*
(F) Roseburia	725.58 ± 2953.7	-2896.95 ± 6880.9	0.08
(F) Ruminococcus	-409.91 ± 1280.3	-1851.61 ± 7181.1	0.60
(F) Veillonella	66.41 ± 150.48	-106.23 ± 447.5	0.03*
(P) Gemmiger	203.5 ± 3461.1	-1462.04 ± 9319.2	0.44
(P) Succinivibrio	2930.83 ± 10125.3	-11.76 ± 119.7	0.62

Data were collected before and after 14 days of supplementation with ALA: alanine (n=12) or GLN: glutamine (n=21); A: Actinobacteria; B: Bacteroidetes; F: Firmicutes; P: Proteobacteria. Data are expressed as mean ± SD. P-value from Wilcoxon Mann–Whitney test. * $P \leq 0.05$.

Discussion

In the present study, the supplementation with L-glutamine was able to alter the gut microbiota of overweight and obese individuals. Ley *et al.* observed that the gut microbiota of obese mice had a significantly higher proportion of Firmicutes and lower proportion of Bacteroidetes when compared to lean controls (16). Similar results were observed in human (17, 18) and animal (16, 19-21) studies. A higher Firmicutes/Bacteroidetes ratio (F/B ratio) is considered a good biomarker for obesity (19). In fact, Turnbaugh *et al.* observed a reduction of F/B ratio in obese animals after weight loss (19). Here, GLN supplementation decreased the abundance of Firmicutes phylum and reduced F/B ratio from 0.85 to 0.57, while it increased from 0.91 to 1.12 in the ALA group. Nevertheless, we did not observe a reduction on body weight and WC in the GLN group, suggesting that microbiota alteration occurs before metabolic changes. In addition, this finding suggests that oral ingestion of L-glutamine has similar effects on gut microbiota as weight loss.

It is interesting to note that in our study there was no significant difference in Bacteroidetes between groups. This may be due to a similar reduction of Bacteroidetes abundance in both ALA and GLN groups. However, the increase in proportion of Bacteroidetes (43% to 52%) after GLN treatment observed in Figure 1 occurs because, even though the total number of bacteria in both groups decreased, the number of Firmicutes in the GLN group decreased more sharply.

The significant reduction on Firmicutes and Actinobacteria phyla observed by using the t and Wilcoxon tests was reinforced with the generalized likelihood ratio test with Negative Binomial distributions. All significantly different genera of bacteria observed in our study belong to the Firmicutes phylum. Graessler et al. showed that *Dialister* genus decreased after bariatric surgery in obese patients (22). Here, we observed a similar result with GLN supplementation. Increased levels of *Veillonella* genus are associated with self-limiting colitis and Crohn's disease (23, 24). This genus decreased significantly after GLN treatment, suggesting that glutamine plays an anti-inflammatory and trophic protection role in the gut. We also observed a reduction of *Dorea* and *Pseudobutyrvibrio* genera, but both have only recently been described as part of the microbiota and their importance to host physiology is not well known (25). Nevertheless, we see that the largest decreasing differences at the genus level did not statistically differ from GLN to ALA groups due to the large variability between individuals, but these contributed the most for the difference found in the overall phylum.

Increased abundance of *Prevotella* genus has been described as a shield against inflammation and non-infectious diseases of the colon (26). After GLN supplementation, but not after ALA, *Prevotella* genus had a tendency to increase, suggesting the protective effect of glutamine on the gut. Moreover, this aminoacid was also associated with a reduction of proinflammatory cytokines TNF- α and IL-6, increased glucose tolerance, improved insulin sensitivity and reduced central fat deposit (27, 28).

We did not observe differences in body weight, WC, serum glucose and insulin levels between ALA and GLN groups, which was expected from the experimental design due to its short duration. Therefore, we consider that additional research with a longer period of intervention is needed to possibly induce metabolic changes.

In conclusion, our study demonstrated that oral supplementation with L-glutamine for fourteen days induced significant changes in the gut microbiota composition in overweight and obese subjects. The finding that L-glutamine promotes changes in the gut microbiota composition provides support for the importance of some nutrients in modulating the intestinal bacterial profile. These changes resembled the weight loss programs established in the literature.

Competing interests

No competing interests.

Acknowledgments

This work was supported by FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) São Paulo, Brazil: Auxílio Regular 2012/10338-6 and CEPID 2013/07607-8. CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico): INCT (Instituto Nacional Ciência e Tecnologia em Obesidade e Diabetes) 573856/2008-7 and UNIVERSAL 481084/2013-4.

The authors would like to thank L. Gullo, A. Marega, W. Prado and L. Zambon (State Hospital of Sumaré) for allowing the execution of this work in the hospital, and L. Janeri, J. Pinheiro (Department of Internal Medicine, UNICAMP, Campinas, São Paulo) for their technical assistance.

References

1. Raoult D. Obesity pandemics and the modification of digestive bacterial flora. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2008;27(8):631-4.
2. DiBaise JK, Zhang H, Crowell MD, Krajmalnik-Brown R, Decker GA, Rittmann BE. Gut microbiota and its possible relationship with obesity. *Mayo Clin Proc*. 2008;83(4):460-9.
3. Di Bella JM, Bao Y, Gloor GB, Burton JP, Reid G. High throughput sequencing methods and analysis for microbiome research. *J Microbiol Methods*. 2013.
4. Pimentel GD, Micheletti TO, Pace F, Rosa JC, Santos RV, Lira FS. Gut-central nervous system axis is a target for nutritional therapies. *Nutr J*. 2012;11:22.
5. Alonso V, Guarner F. Linking the gut microbiota to human health. *British Journal of Nutrition*. 2013;109:S21-S6.
6. Flint HJ, Scott KP, Louis P, Duncan SH. The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2012;9(10):577-89.
7. Blottiere H, de Vos W, Ehrlich S, Dore J. Human intestinal metagenomics: state of the art and future. *Current Opinion in Microbiology*. 2013;16(3):232-9.
8. Blaut M, Klaus S. Intestinal microbiota and obesity. *Handb Exp Pharmacol*. 2012(209):251-73.
9. Geurts L, Lazarevic V, Derrien M, Everard A, Van Roye M, Knauf C, et al. Altered gut microbiota and endocannabinoid system tone in obese and diabetic leptin-resistant mice: impact on apelin regulation in adipose tissue. *Front Microbiol*. 2011;2:149.
10. Mahowald M, Rey F, Seedorf H, Turnbaugh P, Fulton R, Wollam A, et al. Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(14):5859-64.
11. Turnbaugh P, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel B, Duncan A, Ley R, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*. 2009;457(7228):480-U7.
12. Million M, Lagier JC, Yahav D, Paul M. Gut bacterial microbiota and obesity. *Clin Microbiol Infect*. 2013;19(4):305-13.
13. Wu G. Functional amino acids in nutrition and health. *Amino Acids*. 2013;45(3):407-11.
14. Reeds PJ, Burrin DG. Glutamine and the bowel. *J Nutr*. 2001;131(9 Suppl):2505S-8S; discussion 23S-4S.

15. Aban IB, Cutter GR, Mavinga N. Inferences and Power Analysis Concerning Two Negative Binomial Distributions with An Application to MRI Lesion Counts Data. *Comput Stat Data Anal.* 2008;53(3):820-33.
16. Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(31):11070-5.
17. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature.* 2006;444(7122):1022-3.
18. Zhang H, DiBaise JK, Zuccolo A, Kudrna D, Braidotti M, Yu Y, et al. Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(7):2365-70.
19. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature.* 2006;444(7122):1027-31.
20. Hildebrandt MA, Hoffmann C, Sherrill-Mix SA, Keilbaugh SA, Hamady M, Chen YY, et al. High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. *Gastroenterology.* 2009;137(5):1716-24.e1-2.
21. Murphy EF, Cotter PD, Healy S, Marques TM, O'Sullivan O, Fouhy F, et al. Composition and energy harvesting capacity of the gut microbiota: relationship to diet, obesity and time in mouse models. *Gut.* 2010;59(12):1635-42.
22. Graessler J, Qin Y, Zhong H, Zhang J, Licinio J, Wong ML, et al. Metagenomic sequencing of the human gut microbiome before and after bariatric surgery in obese patients with type 2 diabetes: correlation with inflammatory and metabolic parameters. *Pharmacogenomics J.* 2013;13(6):514-22.
23. Swidsinski A, Weber J, Loening-Baucke V, Hale LP, Lochs H. Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Microbiol.* 2005;43(7):3380-9.
24. Keighley MR, Arabi Y, Dimock F, Burdon DW, Allan RN, Alexander-Williams J. Influence of inflammatory bowel disease on intestinal microflora. *Gut.* 1978;19(12):1099-104.
25. Bailey MT, Dowd SE, Galley JD, Hufnagle AR, Allen RG, Lyte M. Exposure to a social stressor alters the structure of the intestinal microbiota: implications for stressor-induced immunomodulation. *Brain Behav Immun.* 2011;25(3):397-407.
26. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(33):14691-6.
27. Greenfield JR, Farooqi IS, Keogh JM, Henning E, Habib AM, Blackwood A, et al. Oral glutamine increases circulating glucagon-like peptide 1, glucagon, and insulin concentrations in lean, obese, and type 2 diabetic subjects. *Am J Clin Nutr.* 2009;89(1):106-13.
28. Prada P, Hirabara S, de Souza C, Schenka A, Zecchin H, Vassallo J, et al. L-glutamine supplementation induces insulin resistance in adipose tissue and improves insulin signalling in liver and muscle of rats with diet-induced obesity. *Diabetologia.* 2007;50(9):1949-59.

Os resultados do presente estudo demonstram que a suplementação oral com L-glutamina altera a composição da microbiota intestinal de indivíduos com sobrepeso ou obesidade de forma diferente da observada no grupo suplementado com L-alanina. Para o grupo GLN, houve aumento do filo Bacteroidetes de 43,1% para 52,3% e redução do filo Firmicutes de 36,8% para 30,1%, com consequente redução da razão F / B (Firmicutes / Bacteroidetes) de 0,85 para 0,57. Do outro lado, no grupo ALA, houve redução do filo Bacteroidetes de 41,1% para 37,0% e aumento do filo Firmicutes de 37,7% para 41,6%.

A razão F / B pode ser considerada um bom biomarcador para a obesidade. A redução desta razão no grupo GLN foi dada principalmente pelo aumento dos gêneros *Bacteroides* e *Prevotella* (filo Bacteroidetes) e redução dos gêneros *Phascolarctobacterium* e *Megasphaera* (filo Firmicutes) (Anexos 4 e 5). Turnbaugh e colaboradores observaram a mesma redução da razão F / B em animais obesos, em associação com a redução no peso corporal (6). O mesmo não aconteceu com o grupo ALA, que teve a razão F / B aumentada de 0,91 para 1,12 após a suplementação. Estes dados sugerem que a suplementação oral com L-glutamina e a redução de peso corporal possuem efeito semelhante na microbiota intestinal.

Resultados similares foram observados em estudos com sujeitos humanos. Doze voluntários obesos foram divididos para receber dois tipos de dietas restritas por um ano: restrita em gorduras ou restrita em carboidratos. A microbiota intestinal foi analisada por sequenciamento do gene 16S rRNA. Antes de iniciar a restrição dietética, os voluntários obesos apresentavam menos Bacteroidetes e mais Firmicutes do que os controles com peso normal. Após o período de um ano de restrição dietética, a proporção de Bacteroidetes nos sujeitos obesos aumentou de 3% para 18% em resposta à restrição energética (40). Gordon e colaboradores propuseram uma composição padrão da microbiota intestinal associada à obesidade. Eles observaram que a microbiota intestinal de obesos tinha uma proporção significativamente maior dos membros do filo Firmicutes para os membros do filo Bacteroidetes (razão F / B), quando comparados aos controles magros (5). Zhang e colaboradores demonstraram que a proporção de Firmicutes foi significativamente reduzida após a cirurgia de *bypass* gástrico, acompanhado da perda peso (41). Turnbaugh et al. (2006) demonstraram que

transferir a microbiota intestinal de camundongos obesos *ob/ob* para camundongos *germ-free*, resultou em um aumento significativo da gordura corporal, quando comparado com a transferência da microbiota intestinal de camundongos com peso normal para camundongos *germ-free*. Foi notado nos camundongos *ob/ob* e nos camundongos *germ-free* que receberam sua microbiota, uma maior proporção dos membros Firmicutes e menor proporção de Bacteroidetes do que os camundongos com peso normal ou os que receberam a microbiota destes. Os autores concluíram que a microbiota dos camundongos obesos tinham maior capacidade de aproveitar energia da dieta (6).

Estes resultados estão em desacordo com dois outros estudos mais recentes. O primeiro, comparou a microbiota intestinal de vinte e três sujeitos obesos e quatorze não obesos através do método de FISH (*fluorescence in situ hybridization*) e qRT-PCR (PCR quantitativo em tempo real). Não foi encontrada nenhuma diferença significativa em Bacteroidetes e nenhuma correlação com IMC, mesmo após quatro semanas de restrição calórica (42). O segundo estudo, que utilizou o método de qRT-PCR, encontrou uma proporção de Bacteroidetes de 23% em sujeitos com peso normal (n=30), 47% nos sujeitos com sobrepeso (n=35) e 45% em sujeitos obesos (n=33) (18). Este resultado contradiz os primeiros estudos conduzidos pelo grupo de Gordon (40).

Estas diferenças nas observações provavelmente foram ocasionadas pelas diferenças metodológicas empregadas. Enquanto Ley et al. (2006) utilizaram o método de sequenciamento do gene 16S rRNA, Duncan et al. (2008) e Schwartz et al. (2010) utilizaram FISH e qRT-PCR respectivamente. Os métodos de FISH e qRT-PCR necessitam de *probes* e *primers*, que vão determinar qual bactéria será o alvo. É possível que algumas bactérias do grupo de interesse não sejam detectadas por falhas no método. Espera-se que o método de sequenciamento do gene 16S rRNA detecte qualquer linhagem de bactéria contida nas regiões conservadas do gene 16S rRNA (13).

Uma investigação recente, utilizou o método de sequenciamento do gene 16S rRNA para avaliar alterações na composição da microbiota intestinal após uma dieta rica em gorduras por três meses em duas linhagens camundongos (*germ-free* e RELMB *knockout*). As duas linhagens apresentaram redução de Bacteroidetes de 55% para

13% e aumento de Firmicutes de 10% para 30%, Proteobactéria de 29% para 45% e Actinobacteria de 3% para 8%. Os autores concluíram que a dieta, ao invés da obesidade, altera a composição da microbiota intestinal (43). Resultados similares também foram encontrados por Murphy et al. 2010, observando que as mudanças na microbiota intestinal estavam relacionadas com dieta rica em gorduras, mais do que relacionadas com a obesidade geneticamente induzida (44).

Nossos dados também mostraram que o número absoluto de Bacteroidetes diminuiu em ambos os grupos após a suplementação, porém o número relativo, ou seja, a porcentagem, aumentou no grupo GLN e reduziu no grupo ALA. Isto se deu porque, em média, o número total de bactérias encontradas na microbiota intestinal dos indivíduos reduziu após a suplementação em ambos os grupos (GLN: de 462865,2 desvio padrão 168562,2 para 317809,7 desvio padrão 136460,2 e ALA: de 330863,1 desvio padrão 174215,5 para 243343,4 desvio padrão 117161,2). Foi observado que o número de Firmicutes teve uma redução bem mais acentuada no grupo GLN, fazendo com que a porcentagem do filo Bacteroidetes aumentasse em relação ao total de bactérias intestinais.

Estudo que comparou a microbiota intestinal de crianças com dieta ocidental moderna da Europa e crianças da África rural, observou que uma dieta essencialmente vegetariana e rica em fibras, encontrada na população da África rural, foi associado com aumento de Bacteroidetes, especialmente *Prevotella* e *Xylanibacter* e redução de Firmicutes e *Enterobacteriaceae* (*Shigella* e *Escherichia*). Os autores sugeriram que estas alterações na microbiota intestinal são adaptativas à esta população e permitem sua sobrevivência, seja maximizando o consumo de energia a partir das fibras ou protegendo-os contra inflamações e doenças do cólon não-infecciosas. (21). Os nossos resultados, demonstraram um aumento da proporção de Bacteroidetes, especialmente do gênero *Prevotella*, o que nos faz hipotetizar sobre o potencial anti-inflamatório e de proteção trófica que a glutamina desempenhou em nossa amostra. Percebemos uma relação inversa com o grupo ALA, fato que nos faz elucidar sobre a L-glutamina como um potencial alvo terapêutico para as doenças relacionadas ao intestino e microbiota intestinal, inclusive a obesidade.

Os resultados também apontam que a composição da microbiota intestinal é particular a cada indivíduo, o que torna difícil definir um perfil intestinal padrão para todas as pessoas, como já demonstrado por Turnbaugh et al. (24). Apesar das tendências apresentadas, algumas pessoas pareceram ser resistentes às alterações na microbiota (Anexos 6 e 7). Esta peculiaridade também pode ser verificada através dos gráficos de linha, que representam uma “foto” das alterações ocorridas na microbiota intestinal de cada indivíduo (Anexos 9 - 12).

Uma espécie de bactéria, a *Akkermansia muciniphila*, identificada no trato intestinal, tem sido estudada a fim de explorar sua relação com a saúde humana. Um estudo recente demonstrou que esta espécie desempenha papel importante na integridade da mucosa intestinal e protege contra a obesidade e diabetes tipo 2 (45). Em contradição, nossos resultados não demonstraram nenhuma diferença do gênero *Akkermansia* entre os grupos estudados, talvez por ter sido uma suplementação por um curto período de tempo. Todos os gêneros que apresentaram diferenças significativas pertencem ao filo Firmicutes: *Dialister*, *Dorea*, *Pseudobutyrvibrio* e *Veillonella*. Graessler et al. (46), revelaram uma forte tendência de redução do gênero *Dialister* em pacientes obesos em pós operatório de cirurgia bariátrica. Observamos resultados semelhantes após a suplementação de L-glutamina. O gênero *Veillonella* está associado com colites inflamatórias e doença de *Crohn* (47). O grupo GLN apresentou redução deste gênero, o que pode estar relacionado com o papel anti-inflamatório que a glutamina exerce no intestino. Acreditamos que mais estudos nesta área são necessários para melhorar a compreensão e identificar o perfil de uma microbiota intestinal saudável, que seja capaz de prevenir doenças e melhorar a qualidade de vida dos seres humanos.

Todas as variáveis antropométricas e bioquímicas analisadas (peso, IMC, circunferência da cintura, glicemia de jejum, insulinemia e HOMA-IR) não demonstraram diferenças entre os grupos. Tal fato já era esperado devido ao curto período de tempo do tratamento (14 dias). Mesmo em estudos com maior período de tempo, é difícil obter diferenças estatisticamente significantes neste tipo de variáveis, principalmente em sujeitos humanos. Outro dado interessante, que correspondeu às expectativas, foi a grande variação do consumo calórico e da distribuição de macro-nutrientes entre os

indivíduos e entre os próprios sujeitos ao longo dos dias analisados. É do conhecimento popular, que cada ser humano tem suas preferências e hábitos alimentares e, além disto, o padrão alimentar modifica-se constantemente ao longo dos dias, principalmente comparando dias de finais de semana, dias de trabalho e dias de folga. Aqui, o objetivo não foi padronizar a alimentação dos participantes, visto que esta é uma estratégia extremamente complicada quando tratamos de sujeitos humanos, mas sim, que estes participantes mantivessem seus hábitos normais, com as variações no consumo ao longo dos dias já esperadas nesta população. O que torna os dados da pesquisa mais fiéis é que ambos os grupos apresentaram comportamentos semelhantes nas análises dos cardápios, o que nos faz sugerir que as alterações encontradas na microbiota intestinal são mesmo resultados da suplementação realizada, e não das variações alimentares (Anexo 8).

O achado que a suplementação com L-glutamina promove alterações na composição da microbiota intestinal fornece suporte para o conceito mais geral de que alguns nutrientes são capazes de modular a composição bacteriana do intestino e assim, podem contribuir para o controle de peso corporal. Portanto, a microbiota intestinal deve ser considerada como um fator contribuinte para a fisiopatologia da obesidade, e a sua manipulação através de determinados nutrientes, como por exemplo, a glutamina, deve ser considerada como coadjuvante no tratamento desta doença.

Obviamente, entre os indivíduos estudados deve haver diferenças na dieta e estilo de vida, o que pode influenciar as diferenças nas microbiotas intestinais encontradas. Além disto, na literatura, as abordagens usadas para caracterizar a microbiota intestinal varia muito entre os trabalhos publicados, e isto explica, em parte, porque as observações encontradas da microbiota na obesidade ou na perda de peso divergem bastante.

O desenvolvimento de novas tecnologias de sequenciamento gênico, permitiram uma proliferação rápida dos trabalhos de investigação sobre a microbiota intestinal. Em grande escala, fornecem uma visão mais aprofundada sobre as comunidades microbianas que normalmente habitam o intestino humano e ajudam a definir uma composição da microbiota intestinal que trás benefícios à saúde ou que apresenta potencial maléfico.

Este estudo tem limitações. O *N* foi reduzido devido às várias faltas e desistências nos dias dos exames e incluiu pessoas de um único hospital. Outras pesquisas com um maior período de intervenção devem ser conduzidas a fim de esclarecer como a manipulação da microbiota intestinal pode prevenir o ganho de peso ou facilitar o emagrecimento. Apesar disto, este trabalho contribui com importantes dados que ajudam a identificar um perfil de composição da microbiota intestinal saudável, o que pode se útil para a prevenção de doenças e trazer melhorias para qualidade de vida da humanidade.

A suplementação via oral do aminoácido L-glutamina, em adultos com sobrepeso ou obesidade, por um período de quatorze dias, alterou a composição da microbiota intestinal de forma semelhante à programas de emagrecimento já vistos na literatura.

1. Raoult D. Obesity pandemics and the modification of digestive bacterial flora. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2008;27(8):631-4.
2. DiBaise JK, Zhang H, Crowell MD, Krajmalnik-Brown R, Decker GA, Rittmann BE. Gut microbiota and its possible relationship with obesity. *Mayo Clin Proc*. 2008;83(4):460-9.
3. Tsukumo DM, Carvalho BM, Carvalho-Filho MA, Saad MJ. Translational research into gut microbiota: new horizons in obesity treatment. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2009;53(2):139-44.
4. Flint HJ, Scott KP, Louis P, Duncan SH. The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2012;9(10):577-89.
5. Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(31):11070-5.
6. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*. 2006;444(7122):1027-31.
7. Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(44):15718-23.
8. Angelakis E, Armougom F, Million M, Raoult D. The relationship between gut microbiota and weight gain in humans. *Future Microbiol*. 2012;7(1):91-109.
9. Di Bella JM, Bao Y, Gloor GB, Burton JP, Reid G. High throughput sequencing methods and analysis for microbiome research. *J Microbiol Methods*. 2013.
10. Dethlefsen L, Huse S, Sogin M, Relman D. The Pervasive Effects of an Antibiotic on the Human Gut Microbiota, as Revealed by Deep 16S rRNA Sequencing. *Plos Biology*. 2008;6(11):2383-400.
11. Blottiere H, de Vos W, Ehrlich S, Dore J. Human intestinal metagenomics: state of the art and future. *Current Opinion in Microbiology*. 2013;16(3):232-9.
12. Alonso V, Guarner F. Linking the gut microbiota to human health. *British Journal of Nutrition*. 2013;109:S21-S6.
13. Blaut M, Klaus S. Intestinal microbiota and obesity. *Handb Exp Pharmacol*. 2012(209):251-73.
14. Lozupone C, Stombaugh J, Gordon J, Jansson J, Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*. 2012;489(7415):220-30.
15. Azad MB, Konya T, Maughan H, Guttman DS, Field CJ, Chari RS, et al. Gut microbiota of healthy Canadian infants: profiles by mode of delivery and infant diet at 4 months. *CMAJ*. 2013;185(5):385-94.
16. Biasucci G, Rubini M, Riboni S, Morelli L, Bessi E, Retetangos C. Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut. *Early Hum Dev*. 2010;86 Suppl 1:13-5.
17. Huurre A, Kalliomäki M, Rautava S, Rinne M, Salminen S, Isolauri E. Mode of delivery - effects on gut microbiota and humoral immunity. *Neonatology*. 2008;93(4):236-40.
18. Schwartz A, Taras D, Schäfer K, Beijer S, Bos NA, Donus C, et al. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity (Silver Spring)*. 2010;18(1):190-5.
19. Kalliomäki M, Collado MC, Salminen S, Isolauri E. Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight. *Am J Clin Nutr*. 2008;87(3):534-8.
20. Harris K, Kassis A, Major G, Chou CJ. Is the gut microbiota a new factor contributing to obesity and its metabolic disorders? *J Obes*. 2012;2012:879151.

21. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(33):14691-6.
22. Lin A, Bik EM, Costello EK, Dethlefsen L, Haque R, Relman DA, et al. Distinct distal gut microbiome diversity and composition in healthy children from Bangladesh and the United States. *PLoS One*. 2013;8(1):e53838.
23. Zhao L. The gut microbiota and obesity: from correlation to causality. *Nat Rev Microbiol*. 2013;11(9):639-47.
24. Turnbaugh P, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel B, Duncan A, Ley R, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*. 2009;457(7228):480-U7.
25. Wu G. Functional amino acids in nutrition and health. *Amino Acids*. 2013;45(3):407-11.
26. Reeds PJ, Burrin DG. Glutamine and the bowel. *J Nutr*. 2001;131(9 Suppl):2505S-8S; discussion 23S-4S.
27. Moreira A, Kekkonen RA, Delgado L, Fonseca J, Korpela R, Haahtela T. Nutritional modulation of exercise-induced immunodepression in athletes: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Clin Nutr*. 2007;61(4):443-60.
28. Wray CJ, Mammen JM, Hasselgren PO. Catabolic response to stress and potential benefits of nutrition support. *Nutrition*. 2002;18(11-12):971-7.
29. Santos RV, Caperuto EC, Costa Rosa LF. Effects of acute exhaustive physical exercise upon glutamine metabolism of lymphocytes from trained rats. *Life Sci*. 2007;80(6):573-8.
30. Rowbottom DG, Keast D, Morton AR. The emerging role of glutamine as an indicator of exercise stress and overtraining. *Sports Med*. 1996;21(2):80-97.
31. van de Poll MC, Soeters PB, Deutz NE, Fearon KC, Dejong CH. Renal metabolism of amino acids: its role in interorgan amino acid exchange. *Am J Clin Nutr*. 2004;79(2):185-97.
32. Newsholme P, Lima MM, Procopio J, Pithon-Curi TC, Doi SQ, Bazotte RB, et al. Glutamine and glutamate as vital metabolites. *Braz J Med Biol Res*. 2003;36(2):153-63.
33. Wischmeyer PE, Musch MW, Madonna MB, Thisted R, Chang EB. Glutamine protects intestinal epithelial cells: role of inducible HSP70. *Am J Physiol*. 1997;272(4 Pt 1):G879-84.
34. van der Hulst RR, van Kreel BK, von Meyenfeldt MF, Brummer RJ, Arends JW, Deutz NE, et al. Glutamine and the preservation of gut integrity. *Lancet*. 1993;341(8857):1363-5.
35. Tremel H, Kienle B, Weilemann LS, Stehle P, Fürst P. Glutamine dipeptide-supplemented parenteral nutrition maintains intestinal function in the critically ill. *Gastroenterology*. 1994;107(6):1595-601.
36. Anderson PM, Schroeder G, Skubitz KM. Oral glutamine reduces the duration and severity of stomatitis after cytotoxic cancer chemotherapy. *Cancer*. 1998;83(7):1433-9.
37. Ward E, Picton S, Reid U, Thomas D, Gardener C, Smith M, et al. Oral glutamine in paediatric oncology patients: a dose finding study. *Eur J Clin Nutr*. 2003;57(1):31-6.
38. Greenfield JR, Farooqi IS, Keogh JM, Henning E, Habib AM, Blackwood A, et al. Oral glutamine increases circulating glucagon-like peptide 1, glucagon, and insulin concentrations in lean, obese, and type 2 diabetic subjects. *Am J Clin Nutr*. 2009;89(1):106-13.
39. Prada P, Hirabara S, de Souza C, Schenka A, Zecchin H, Vassallo J, et al. L-glutamine supplementation induces insulin resistance in adipose tissue and improves insulin signalling in liver and muscle of rats with diet-induced obesity. *Diabetologia*. 2007;50(9):1949-59.
40. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*. 2006;444(7122):1022-3.
41. Zhang H, DiBaise JK, Zuccolo A, Kudrna D, Braidotti M, Yu Y, et al. Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(7):2365-70.

42. Duncan SH, Lobley GE, Holtrop G, Ince J, Johnstone AM, Louis P, et al. Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *Int J Obes (Lond)*. 2008;32(11):1720-4.
43. Hildebrandt MA, Hoffmann C, Sherrill-Mix SA, Keilbaugh SA, Hamady M, Chen YY, et al. High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. *Gastroenterology*. 2009;137(5):1716-24.e1-2.
44. Murphy EF, Cotter PD, Healy S, Marques TM, O'Sullivan O, Fouhy F, et al. Composition and energy harvesting capacity of the gut microbiota: relationship to diet, obesity and time in mouse models. *Gut*. 2010;59(12):1635-42.
45. Everard A, Belzer C, Geurts L, Ouwerkerk JP, Druart C, Bindels LB, et al. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(22):9066-71.
46. Graessler J, Qin Y, Zhong H, Zhang J, Licinio J, Wong ML, et al. Metagenomic sequencing of the human gut microbiome before and after bariatric surgery in obese patients with type 2 diabetes: correlation with inflammatory and metabolic parameters. *Pharmacogenomics J*. 2013;13(6):514-22.
47. Swidsinski A, Weber J, Loening-Baucke V, Hale LP, Lochs H. Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Microbiol*. 2005;43(7):3380-9.



DECLARAÇÃO

Pelo presente instrumento declaramos que foi aprovada pela Comissão de Ensino e Pesquisa do Hospital Estadual Sumaré o desenvolvimento do projeto de mestrado intitulado **"EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM L-GLUTAMINA NA COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL DE INDIVÍDUOS SOBREPESOS E OBESOS."** sob responsabilidade de **ALESSANDRA Z. Z. DE SOUZA**, porém sendo autorizado o início da pesquisa nesta instituição a partir da aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – UNICAMP.

Na oportunidade, renovamos nossos laços de elevada estima e consideração.

Sumaré, 24 de janeiro de 2013.

Cordialmente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'June Barreiros Freire', is written over a faint, stylized graphic element.

Dra. June Barreiros Freire.
Coord. Centro de Ensino e Pesquisa
Hospital Estadual Sumaré.

FACULDADE DE CIÊNCIAS
MÉDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM L-GLUTAMINA NA COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL DE INDIVÍDUOS SOBREPESO E OBESOS

Pesquisador: Alessandra Zanin Zambom de Souza

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 08838812.3.0000.5404

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Aplicadas - FCA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 187.779

Data da Relatoria: 25/01/2013

Apresentação do Projeto:

A pesquisadora esclarece que a obesidade é considerada um problema de saúde pública e uma epidemia mundial. Como consequência algumas doenças metabólicas, associadas à obesidade, como resistência à insulina, hipertensão e dislipidemias, levam a um risco aumentado de morbidade e mortalidade. Estudos recentes mostram que outros fatores, além da genética e do meio ambiente, podem influenciar o fenótipo da obesidade. Evidências demonstraram que a composição da microbiota intestinal pode ser diferente em humanos magros e obesos, com um aumento relativo do filo Firmicutes e uma possível redução dos filos Bacteroidetes e Proteobactérias. Assim, especulou-se se a microbiota intestinal pode participar na fisiopatologia da obesidade, resultando em um fenótipo semelhante à Síndrome Metabólica. Em estudos experimentais, este fenótipo foi revertido com intervenções que alteraram a composição da microbiota intestinal, causando consequente perda de gordura corporal, melhora da resistência à insulina e tolerância à glicose, e menor inflamação subclínica. A suplementação de glutamina por via oral em reduziu em 50% o depósito de gordura central de ratos alimentados com uma dieta rica em gorduras e melhorou a sensibilidade à insulina nestes animais. Entretanto, ainda não foi investigado se a suplementação com glutamina altera a composição da microbiota intestinal, induzindo a perda de peso e melhora da sensibilidade à insulina. Metodologia: Os voluntários receberão suplementação de 30 gramas de glutamina por via oral, uma vez ao dia durante um período de 14 dias. O grupo controle receberá suplementação de alanina na mesma proporção eno

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

FACULDADE DE CIENCIAS
MEDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)



mesmo período. Além disso, os grupos serão orientados a manterem suas dietas e atividades físicas. Os parâmetros antropométricos e bioquímicos, serão avaliados no início e no final do período de suplementação. Serão utilizadas estratégias nutricionais como anamnese, recordatório 24h, diário alimentar de 3 dias, além das medidas antropométricas (peso, altura, circunferência da cintura) e exames laboratoriais como glicemia e insulina de jejum, para determinação da resistência à insulina através do teste de HOMA. Por fim, será realizada análise da microbiota intestinal, através de sequenciamento genético, a partir do DNA extraído das amostras de fezes coletadas. Os dados serão submetidos ao servidor do MG-RAST e comparadas por filo prevalência.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Investigar se a suplementação oral com glutamina altera a composição da microbiota intestinal de indivíduos sobrepeso e obesos. Objetivo Secundário: Investigar se a possível alteração da composição da microbiota intestinal após a suplementação oral com glutamina influencia o estado nutricional de indivíduos sobrepeso e obesos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos significativos. Quanto a desconfortos, refere-se ao tempo despendido para os procedimentos do estudo (anamnese, recordatório 24h, diário alimentar de 3 dias, medidas antropométricas e exames laboratoriais como glicemia e insulina de jejum). Em termos de benefícios diretos, há a possibilidade de alteração da microbiota intestinal e melhora do estado nutricional, com possível emagrecimento e melhora da sensibilidade à insulina.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma pesquisa de Mestrado. O PLACEBO (suplementação com alanina) será dada a 20 indivíduos e suplementação com glutamina será dada a 20 indivíduos, totalizando 40 indivíduos. Critério de Inclusão: Voluntários adultos, com idade maior ou igual a vinte anos ou menor igual sessenta anos, com diagnóstico nutricional de sobrepeso ou obesidade (IMC ≥ 25 e ≥ 30 kg/m² para sobrepeso e ≥ 30 kg/m² para obesidade), tanto do sexo feminino como masculino. Critério de Exclusão: Serão excluídas do estudo indivíduos que relataram insuficiência renal, bem como, os que façam uso de medicamentos antidepressivos, anorexígenos e laxativos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta folha de rosto assinada pela pesquisadora principal e pelo responsável da instituição proponente (FCA/Unicamp), além de carta de aprovação pelo responsável da coordenação de pesquisa da FCA/Unicamp. Há autorização do responsável pelo local onde será recrutados os sujeitos de pesquisa e realizados os procedimentos do estudo (Hospital Estadual de Sumaré). O projeto de pesquisa gerado pela Plataforma Brasil contém todos os itens preenchidos, incluindo cronograma atualizado. O TCLE foi revisto com as considerações indicadas na relatoria, contendo o que foi anteriormente solicitado.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

FACULDADE DE CIENCIAS
MEDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)



Recomendações:

1. Lembramos que o TCLE deve ser elaborado em duas vias, sendo uma retida pelo sujeito da pesquisa ou por seu representante legal e uma arquivada pelo pesquisador (resolução 196/96 CNS/MS, artigo IV.2 *et seq.*).
2. Se o TCLE tiver mais de uma página, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, e o pesquisador responsável deverão rubricar todas as folhas desse documento, apondo suas assinaturas na última página do referido termo (Carta Circular nº. 003/2011/CONEP/CNS).
3. No cronograma, observar que o início do estudo somente poderá ser realizado após aprovação pelo CEP, conforme compromisso do pesquisador com a resolução 196/96 CNS/MS (artigo IX.2 letra *a*).
4. Lembramos também que dúvidas referentes aos procedimentos do estudo deverão ser encaminhadas ao(s) pesquisador(es), sendo que o objetivo da divulgação das formas de contato do CEP visam propiciar ao sujeito de pesquisa a eventual possibilidade de esclarecimento de dúvidas ou reclamações e denúncias referentes aos aspectos éticos do estudo.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 22 de Janeiro de 2013

Assinador por:
Carlos Eduardo Steiner
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo (a) à participar da pesquisa **“EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM L-GLUTAMINA NA COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL DE INDIVÍDUOS SOBREPESO E OBESOS”**, que será realizada no Hospital Estadual Sumaré. O objetivo da pesquisa é investigar se a suplementação oral com glutamina influencia o estado nutricional de indivíduos sobrepeso e obesos e também altera a composição da microbiota intestinal destes indivíduos.

Para o cumprimento dos objetivos desta pesquisa os voluntários serão submetidos a um questionário referente à avaliação nutricional. Para realizar avaliação nutricional, os voluntários serão pesados, a altura será aferida, bem como a circunferência da cintura e do pulso. Também haverá coleta de sangue, que será realizada por profissionais do Hospital Estadual Sumaré, para avaliar glicose e insulina de jejum. E coleta de fezes para avaliar a composição da microbiota intestinal. Estes exames serão realizados duas vezes, uma no início da pesquisa, antes da suplementação, e outra no fim da pesquisa. Os voluntários serão divididos em dois grupos, que receberão suplementação de L-Glutamina ou L-Alanina, que será ingerida uma vez ao dia (30g/dia diluída em 250ml de água). Este procedimento poderá causar algum desconforto ao voluntário e não há riscos previsíveis.

Alguns benefícios são esperados com a pesquisa, sendo eles: melhora do estado nutricional, diminuição da massa adiposa, melhora da sensibilidade à insulina e dos indicadores inflamatórios e consequentemente da inflamação associada à obesidade.

Os voluntários terão assistência e acompanhamento dos responsáveis pela pesquisa. Serão acompanhados diariamente através de encontros e contato telefônico. Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos sobre a pesquisa, pode nos contatar (Alessandra Zanin Zambom de Souza, Fone: (19) 9148-0580, e-mail: alessandrzz@hotmail.com); ou (Prof. Dra. Patrícia de Oliveira Prada, Fone: (19) 3521-

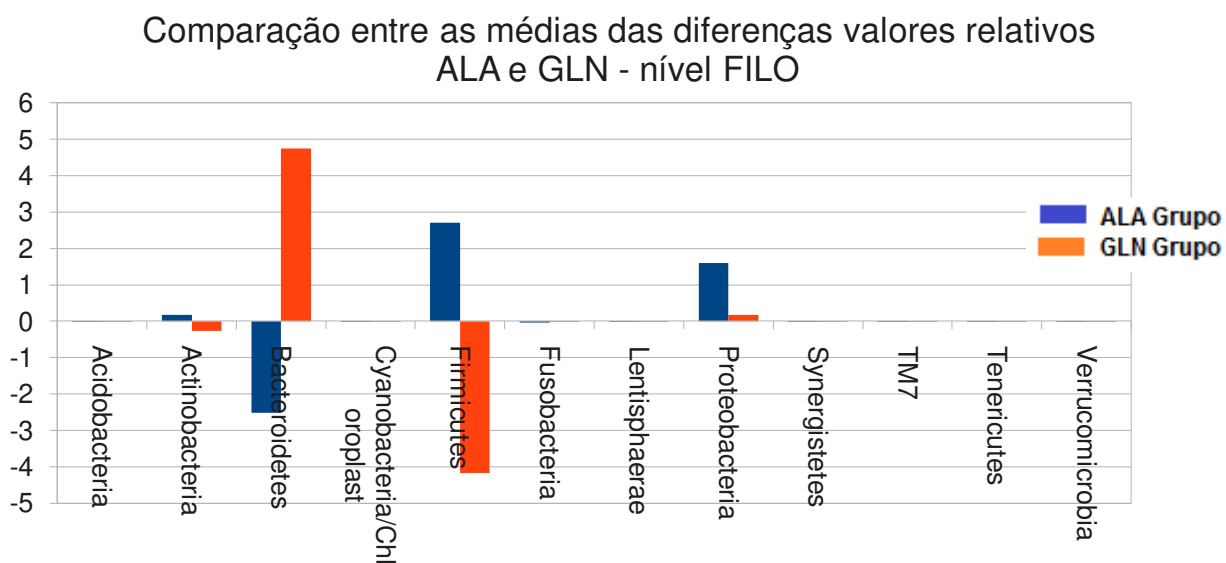
8026 ou e-mail: pprada@fcm.unicamp.br ou patricia.prada@fca.unicamp.br). Eventuais dúvidas, denúncias ou reclamações referentes aos aspectos éticos da pesquisa, deverão ser direcionadas ao Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126 – CEP 13083-887 Campinas – SP, Fone (019) 3521-8936 ou 3521-7187 e-mail: cep@fcm.unicamp.br).

Informamos que o(a) senhor(a) não pagará nem será remunerado por sua participação. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente de sua participação na pesquisa.

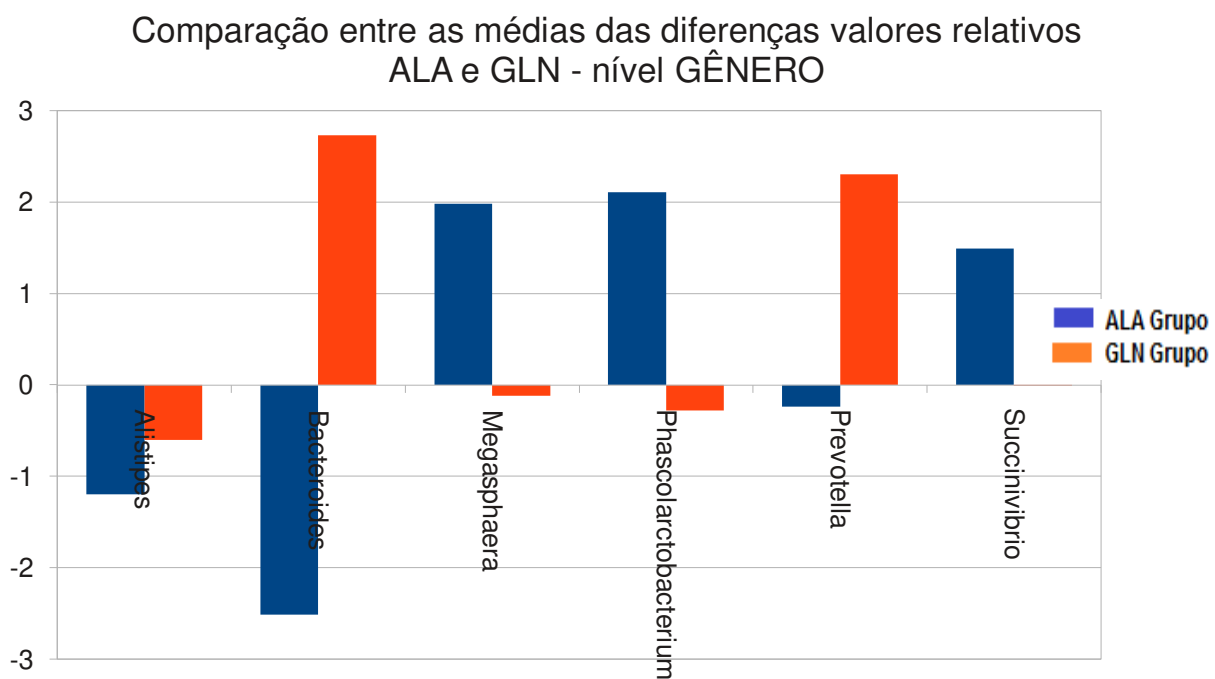
Gostaríamos de esclarecer que sua participação é totalmente voluntária, podendo você: recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Informamos ainda que as informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade.

Assinatura do Voluntário (Favor rubricar todas as vias deste termo)

Assinatura do Pesquisador (Favor rubricar todas as vias deste termo)

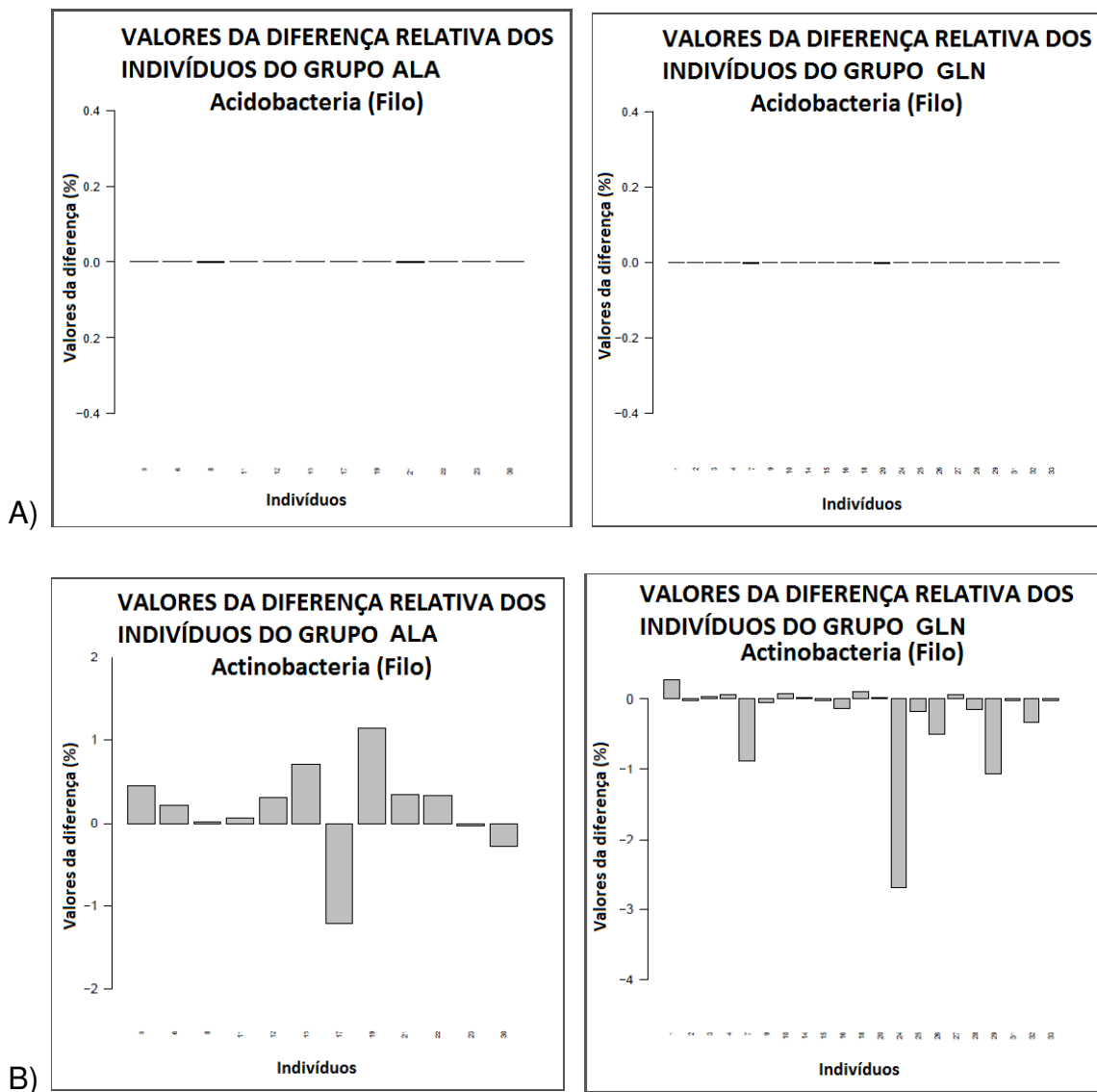


Anexo 4. Gráfico das médias das diferenças relativas (%) dos grupos ALA e GLN por filo de bactérias encontradas na microbiota intestinal.

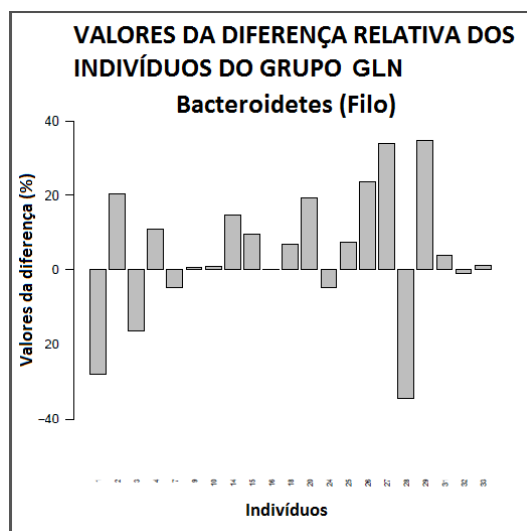
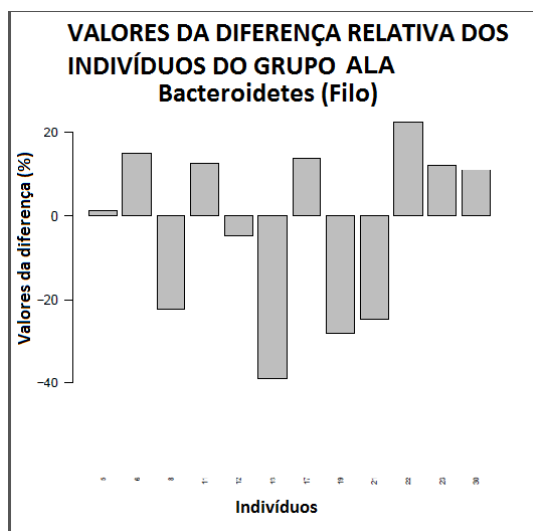


Anexo 5. Gráfico das médias das diferenças relativas (%) dos grupos ALA e GLN por gênero de bactérias encontradas na microbiota intestinal.

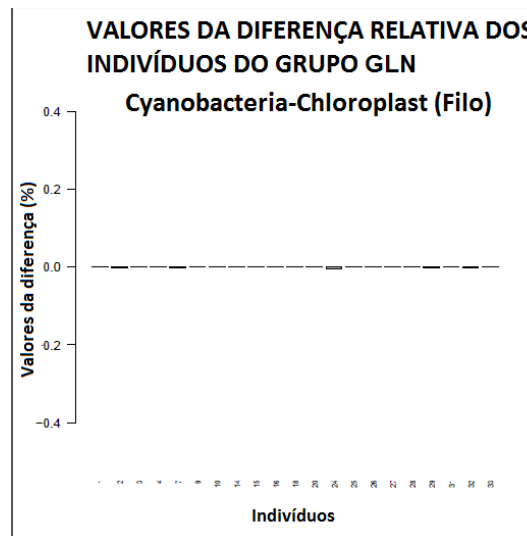
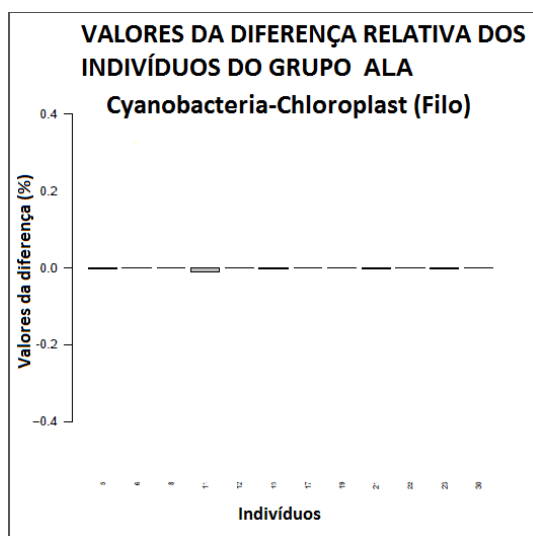
Alterações individuais da microbiota intestinal – FILO



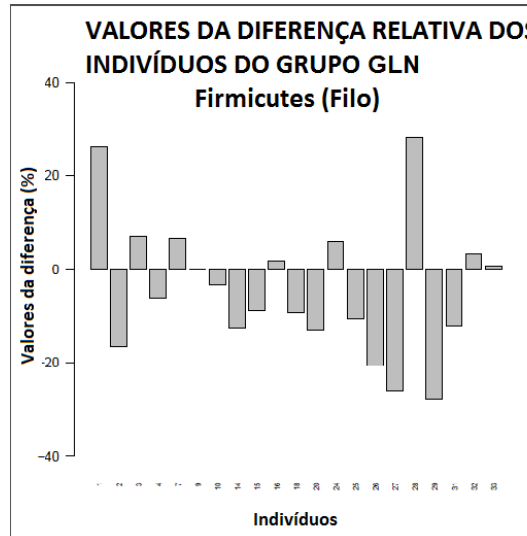
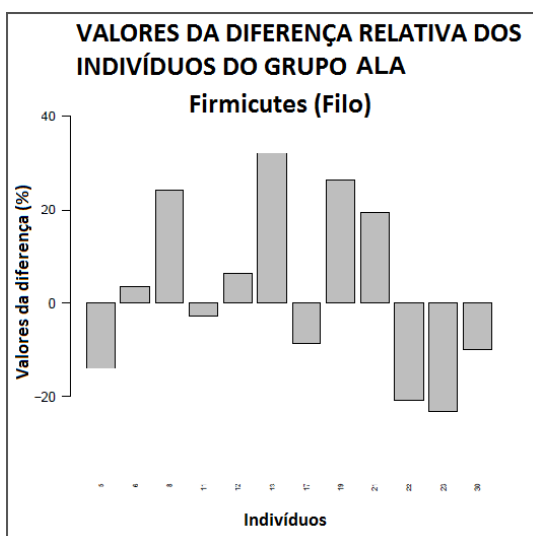
C)



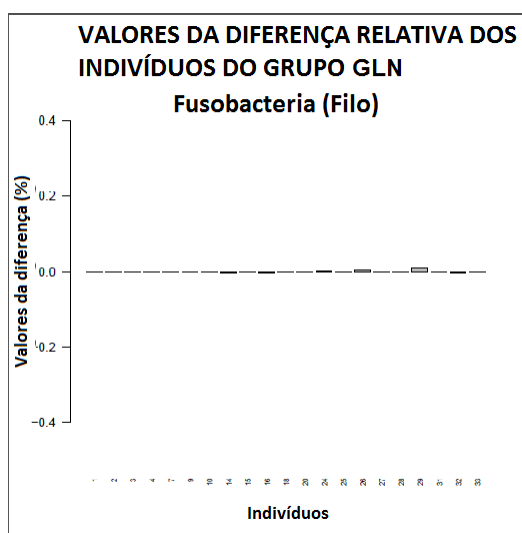
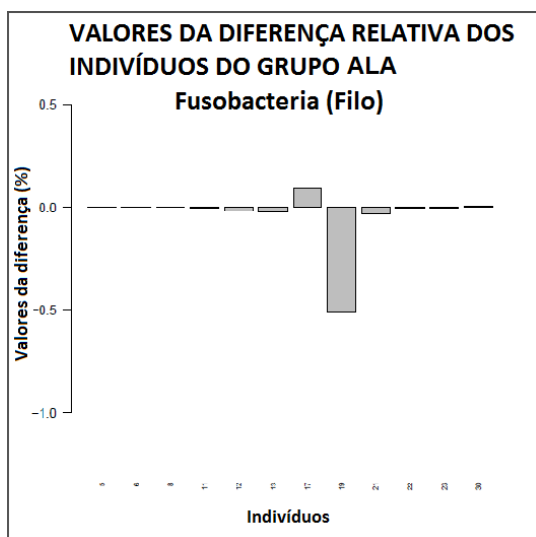
D)



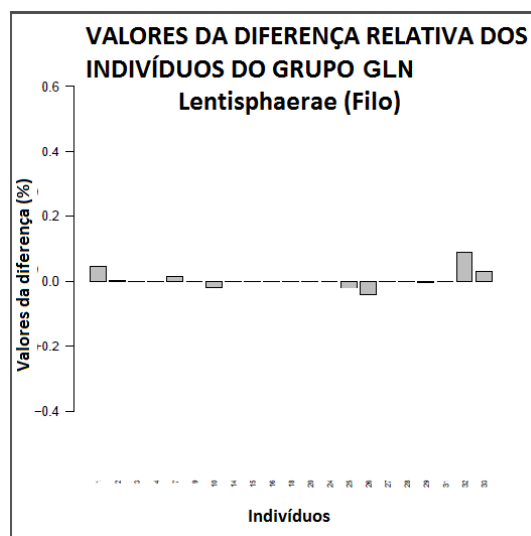
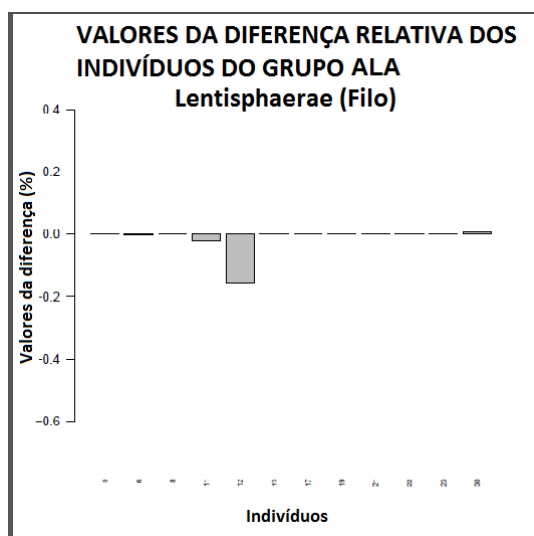
E)



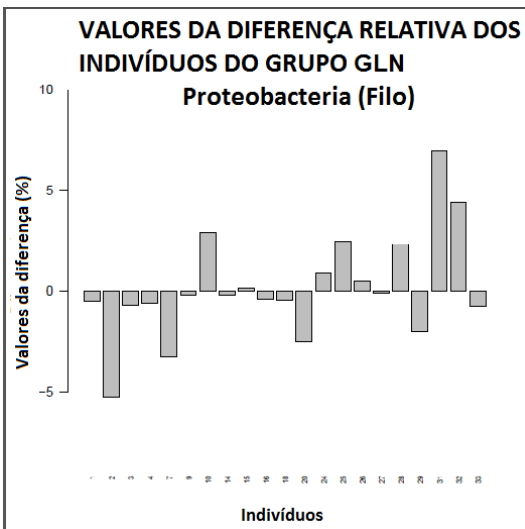
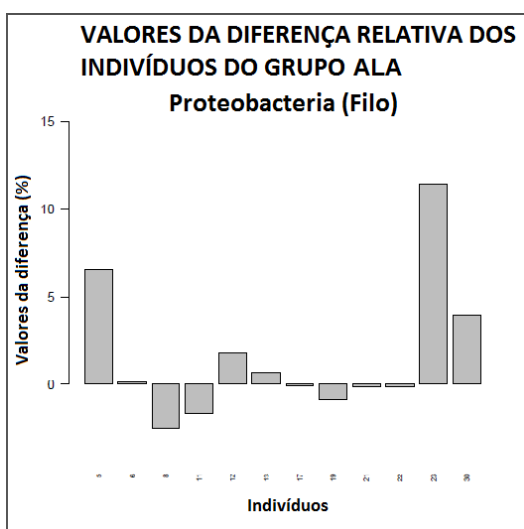
F)



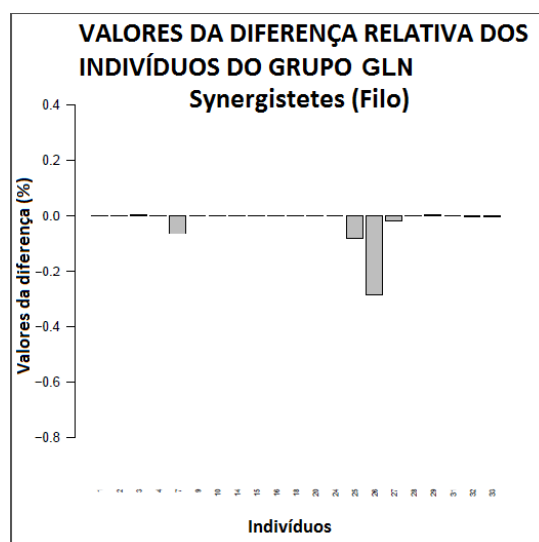
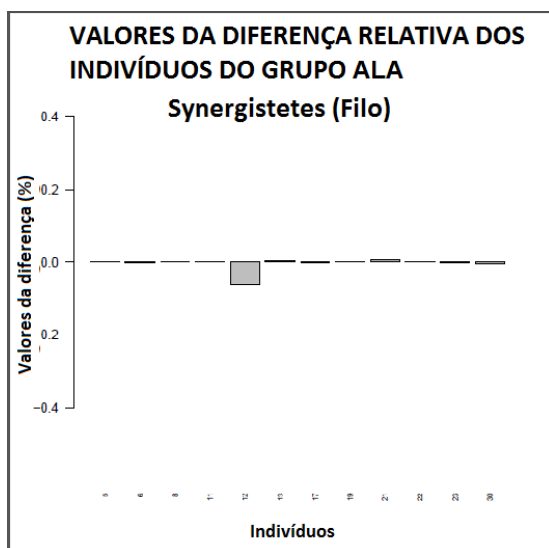
G)



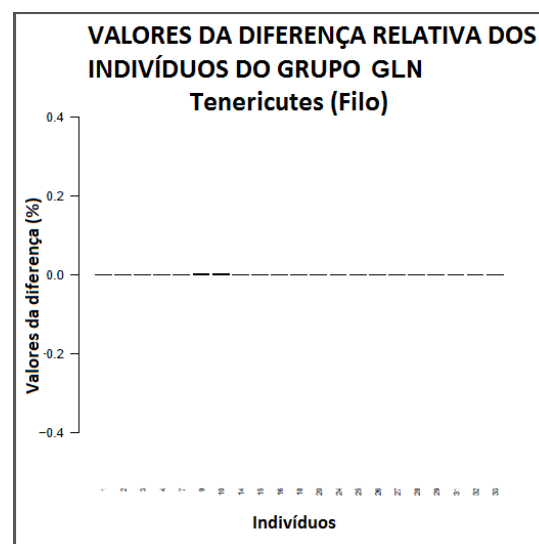
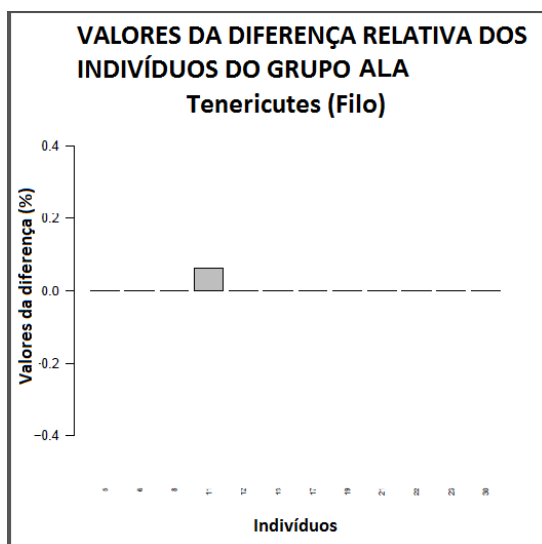
H)



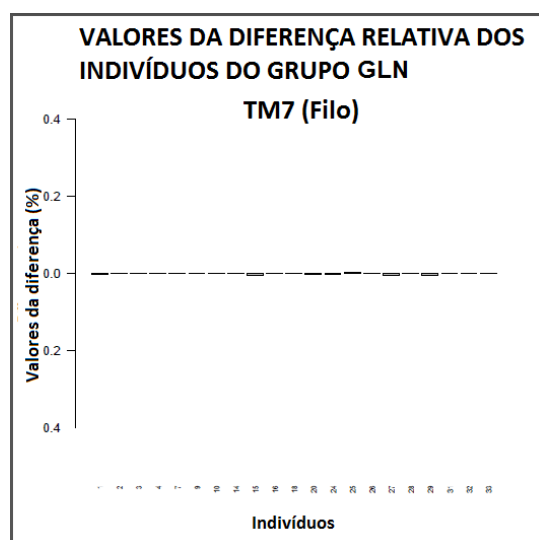
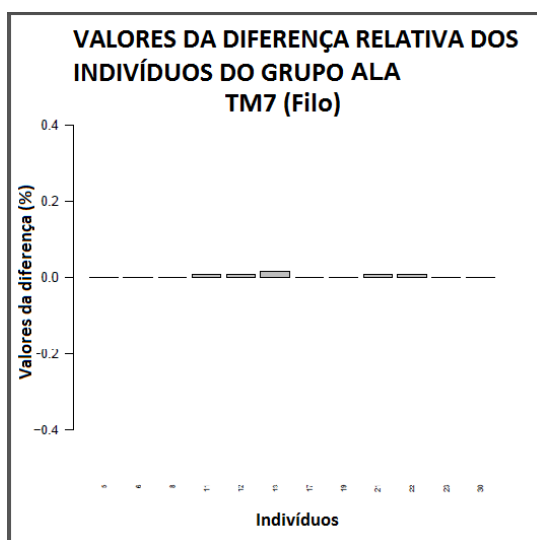
I)

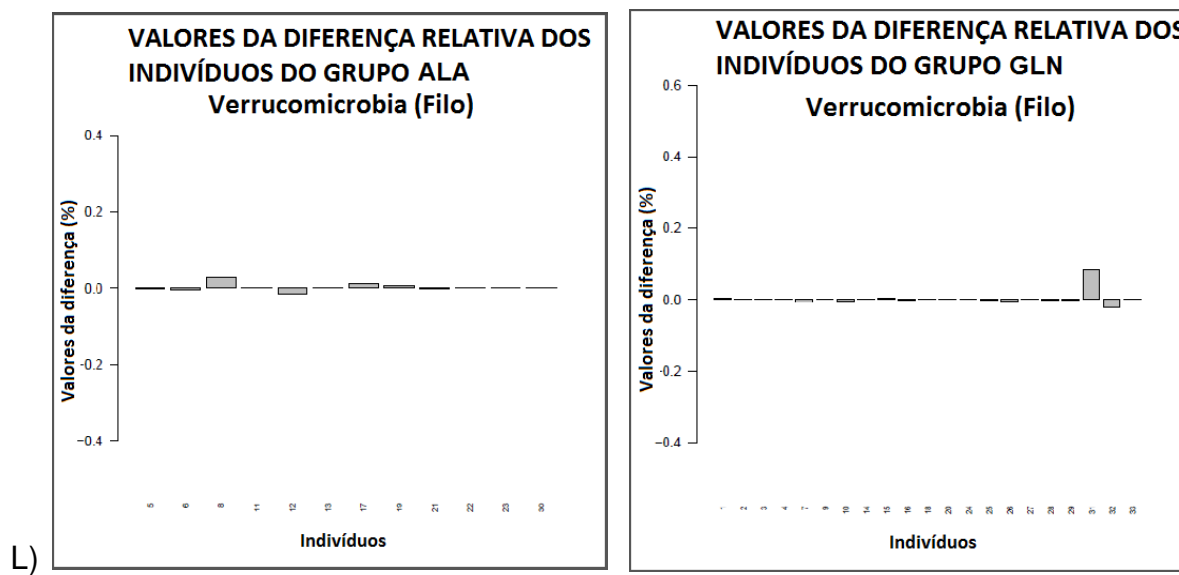


J)



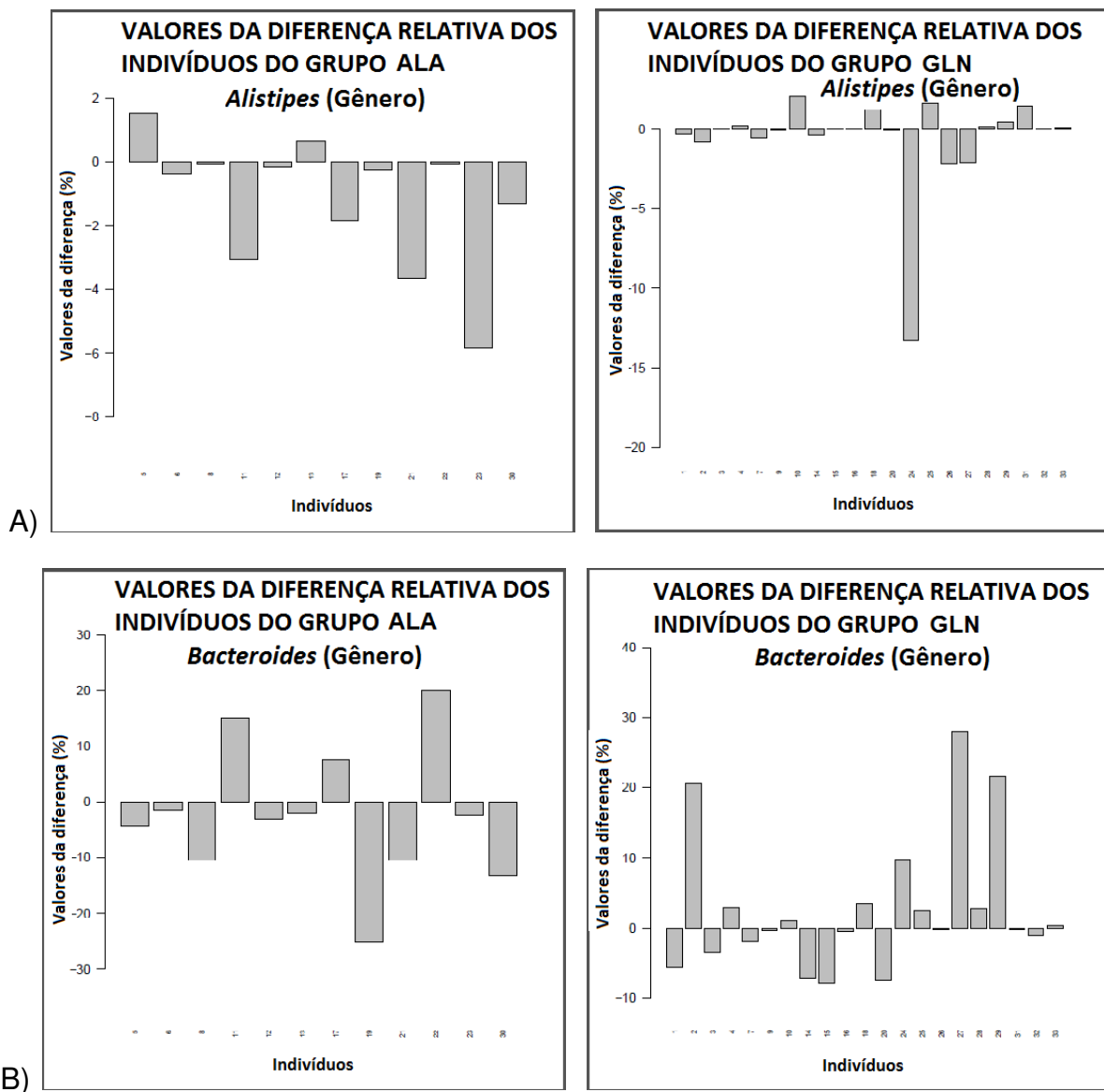
K)



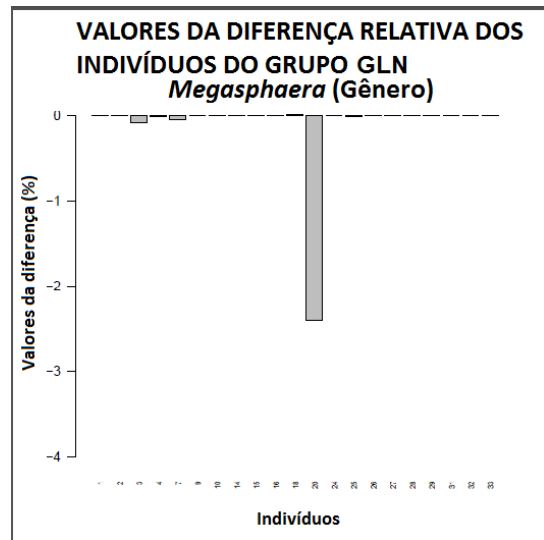
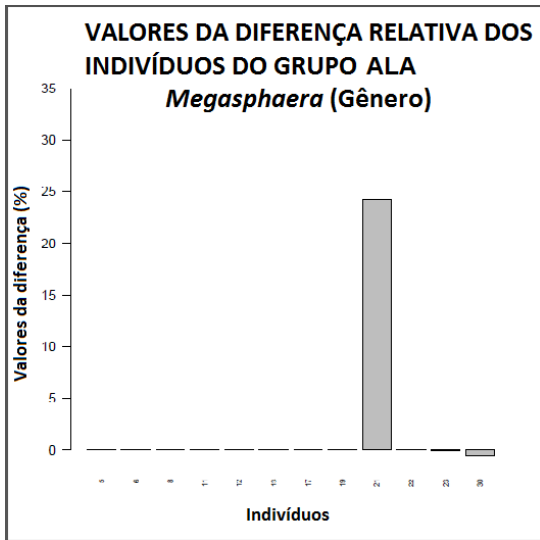


Anexo 6. Gráficos representativos das diferenças relativas (%) individuais por filo de bactérias encontradas na microbiota intestinal. (A) representa as variações individuais do grupo ALA e do grupo GLN para o filo Acidobactéria; (B) ALA e GLN, filo Actinobacteria; (C) ALA e GLN, filo Bacteroidetes; (D) ALA e GLN, filo Cyanobacteria; (E) ALA e GLN, filo Firmicutes; (F) ALA e GLN, filo Fusobacteria; (G) ALA e GLN, filo Lentisphaerae; (H) ALA e GLN, filo Proteobacteria; (I) ALA e GLN, filo Synergistetes; (J) ALA e GLN, filo TM7; (K) ALA e GLN, filo Tenericutes; (L) ALA e GLN, filo Verrucomicrobia.

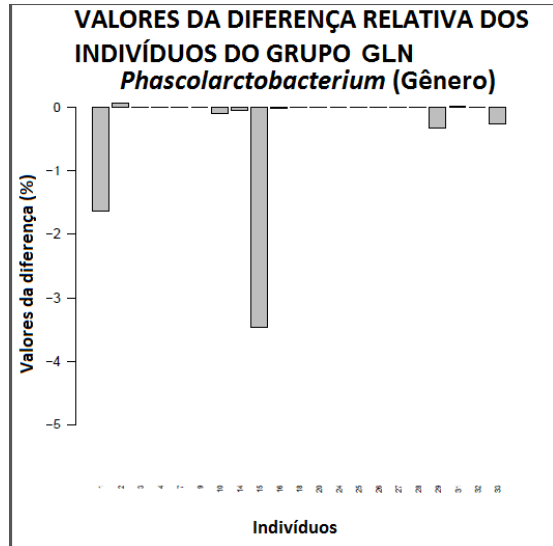
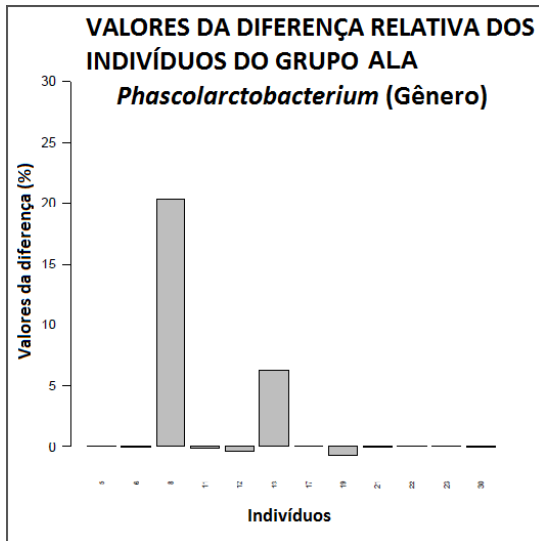
Alterações individuais da microbiota intestinal – GÊNERO



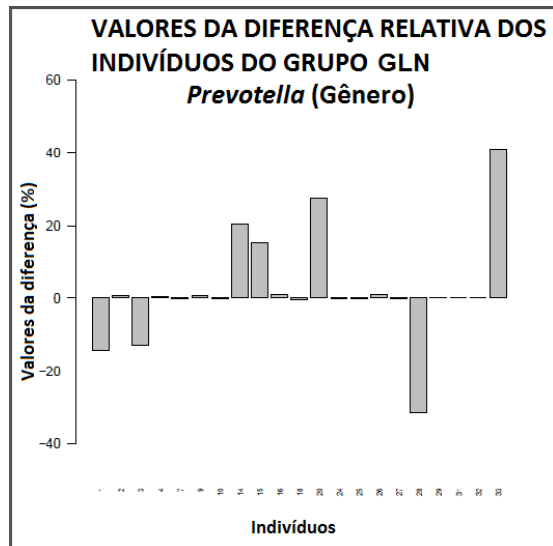
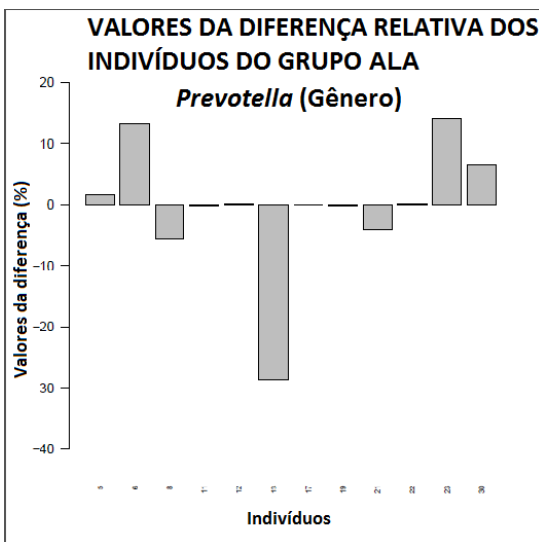
C)

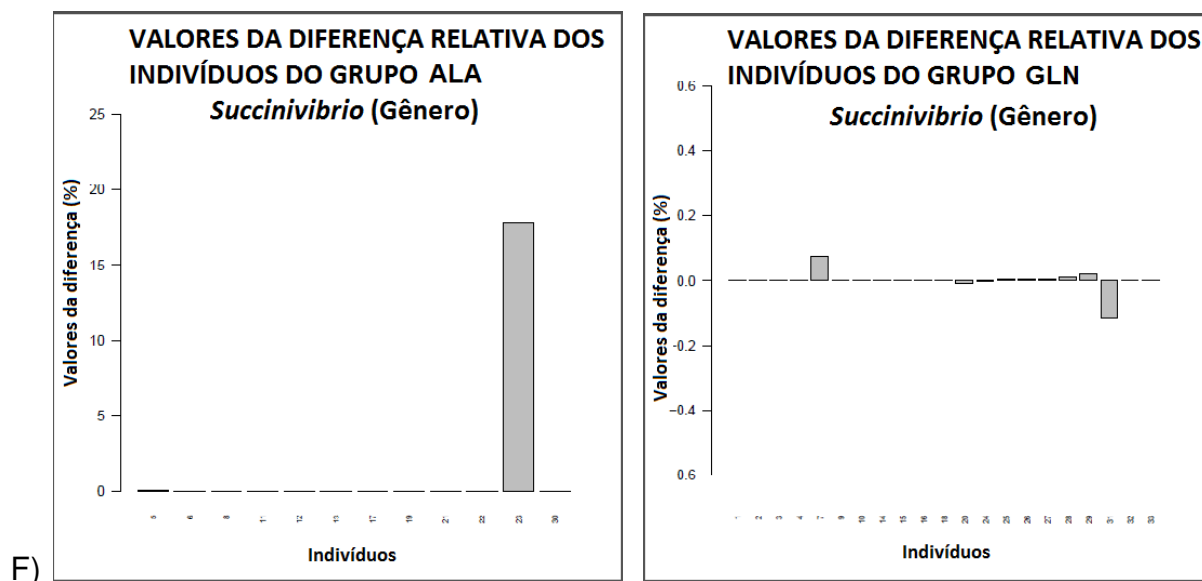


D)

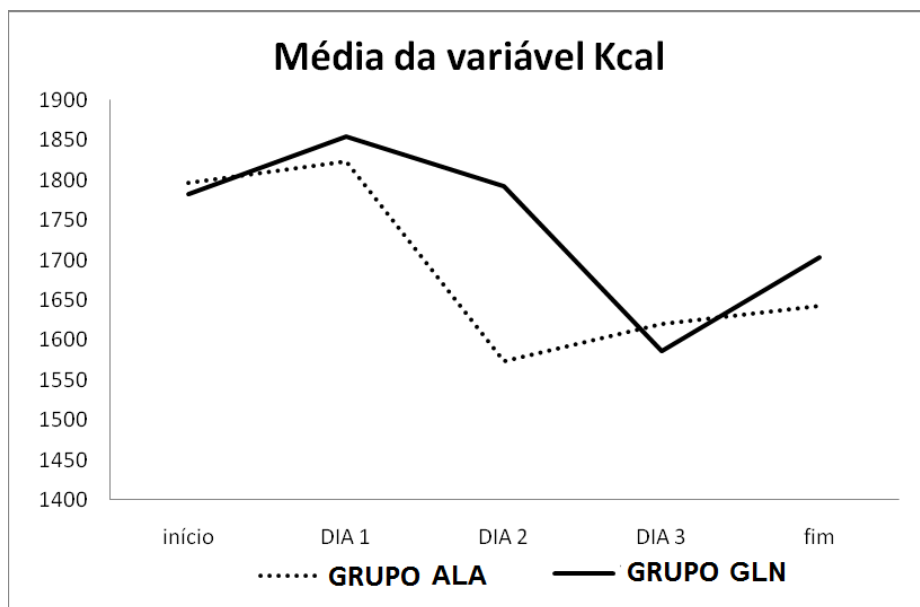


E)





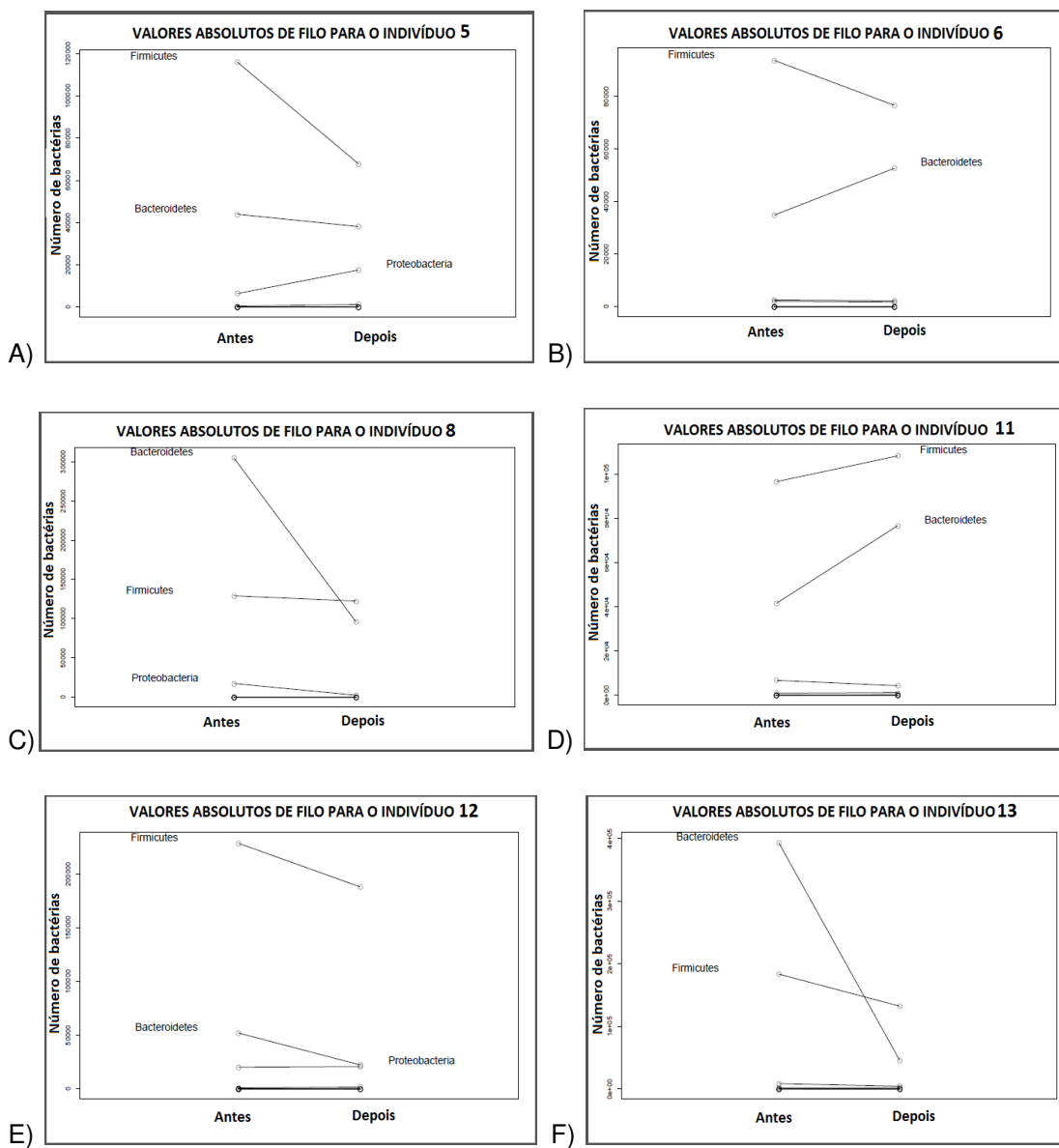
Consumo calórico

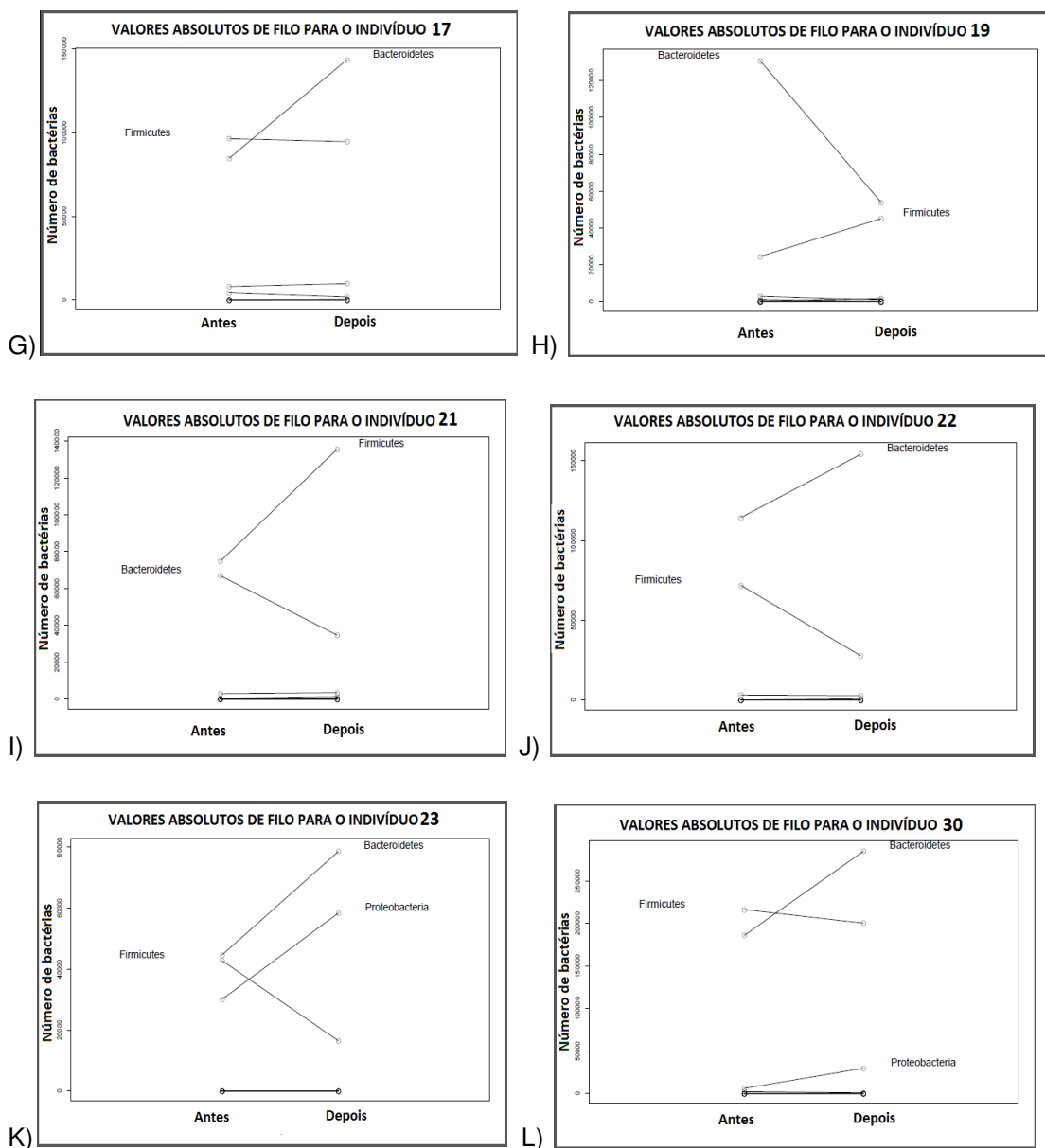


Anexo 8: Gráfico das médias da variável Kcal por dia.

Alterações na microbiota intestinal após a suplementação

Grupo ALA – Nível Filo

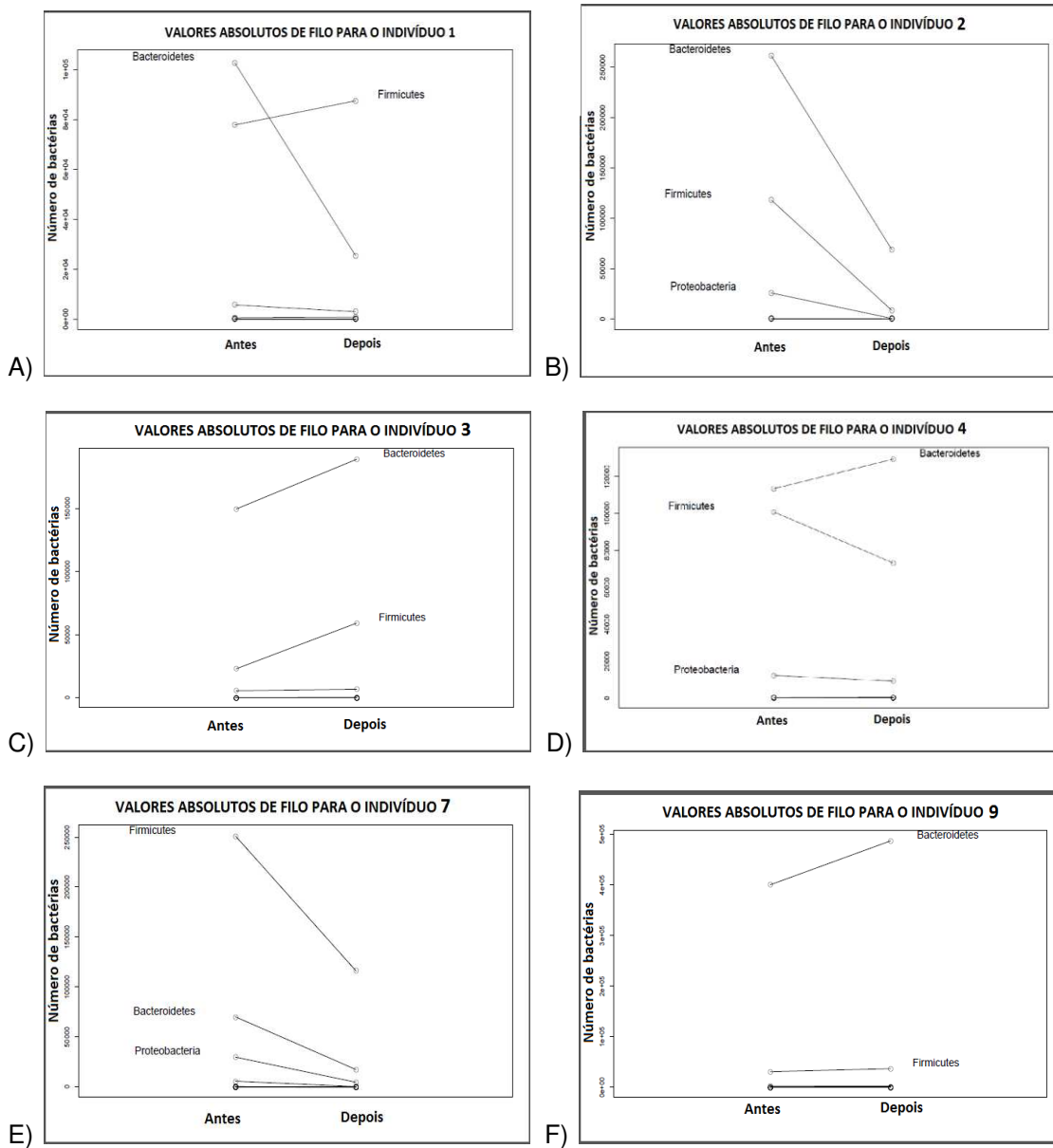


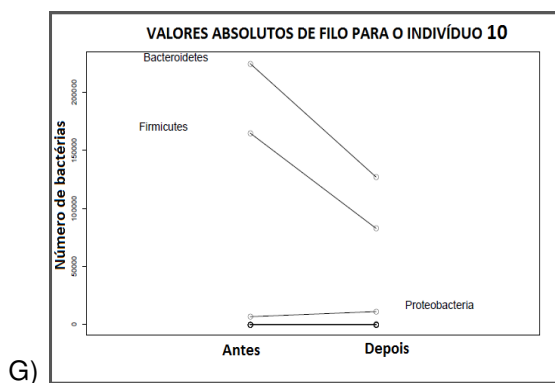


Anexo 9. Gráficos representativos da contagem de bactérias intestinais em números absolutos (nível filo), antes e depois da suplementação no grupo ALA. Cada indivíduo é representado por um gráfico do A ao L.

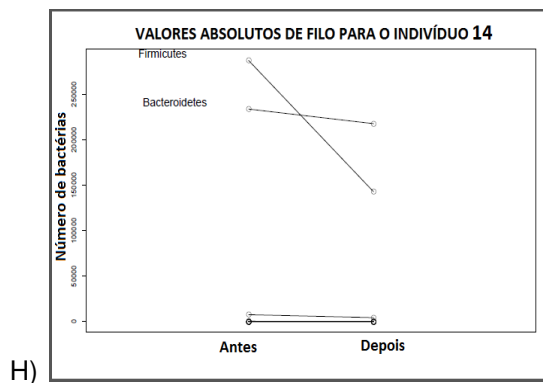
Alterações na microbiota intestinal após a suplementação

Grupo GLN – Nível Filo

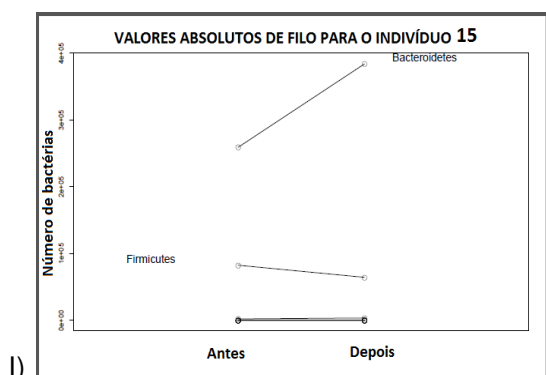




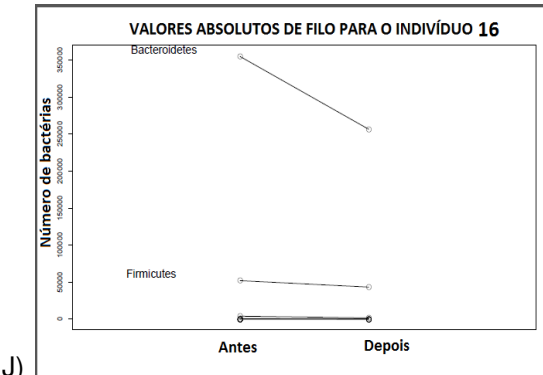
G)



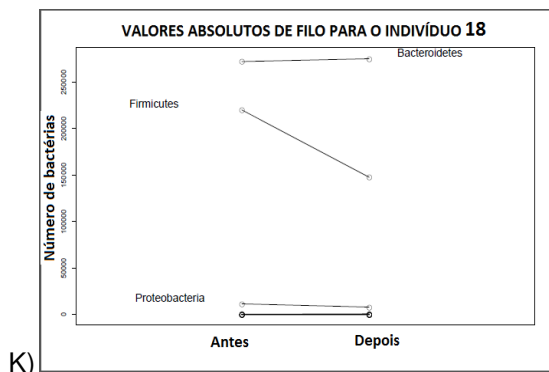
H)



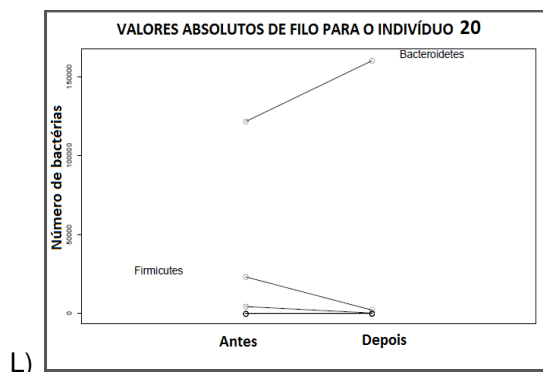
I)



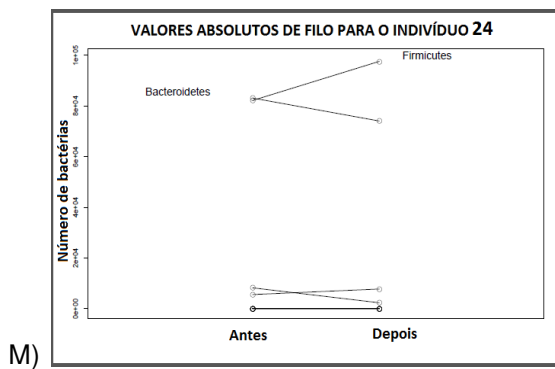
J)



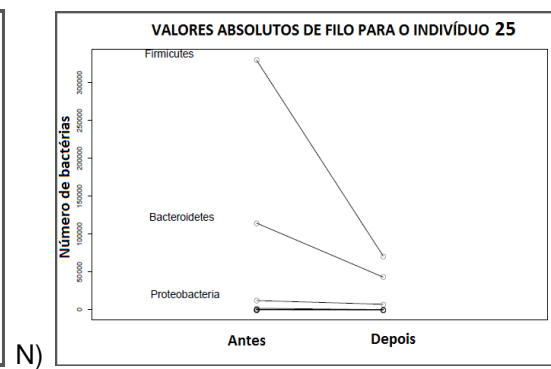
K)



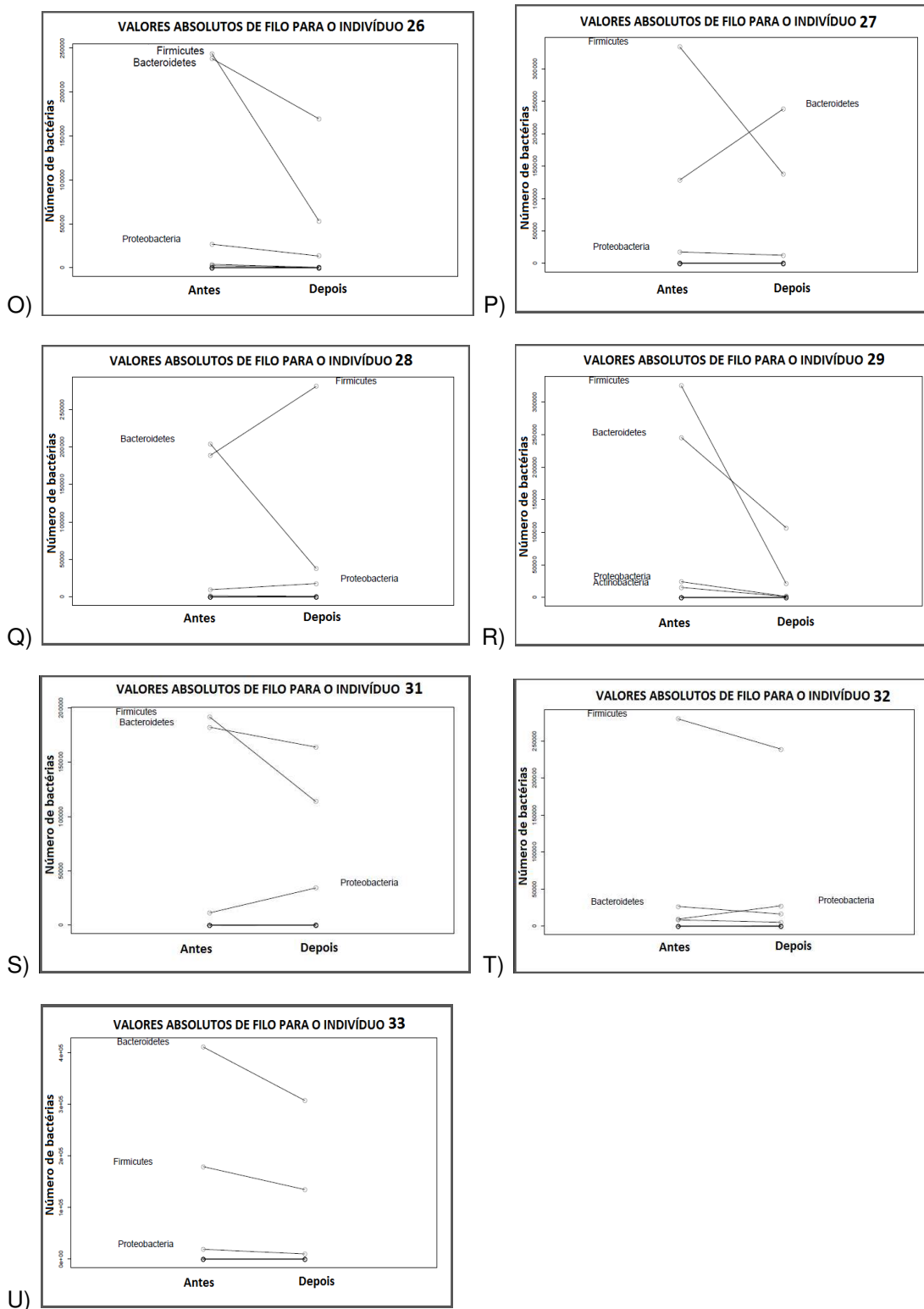
L)



M)



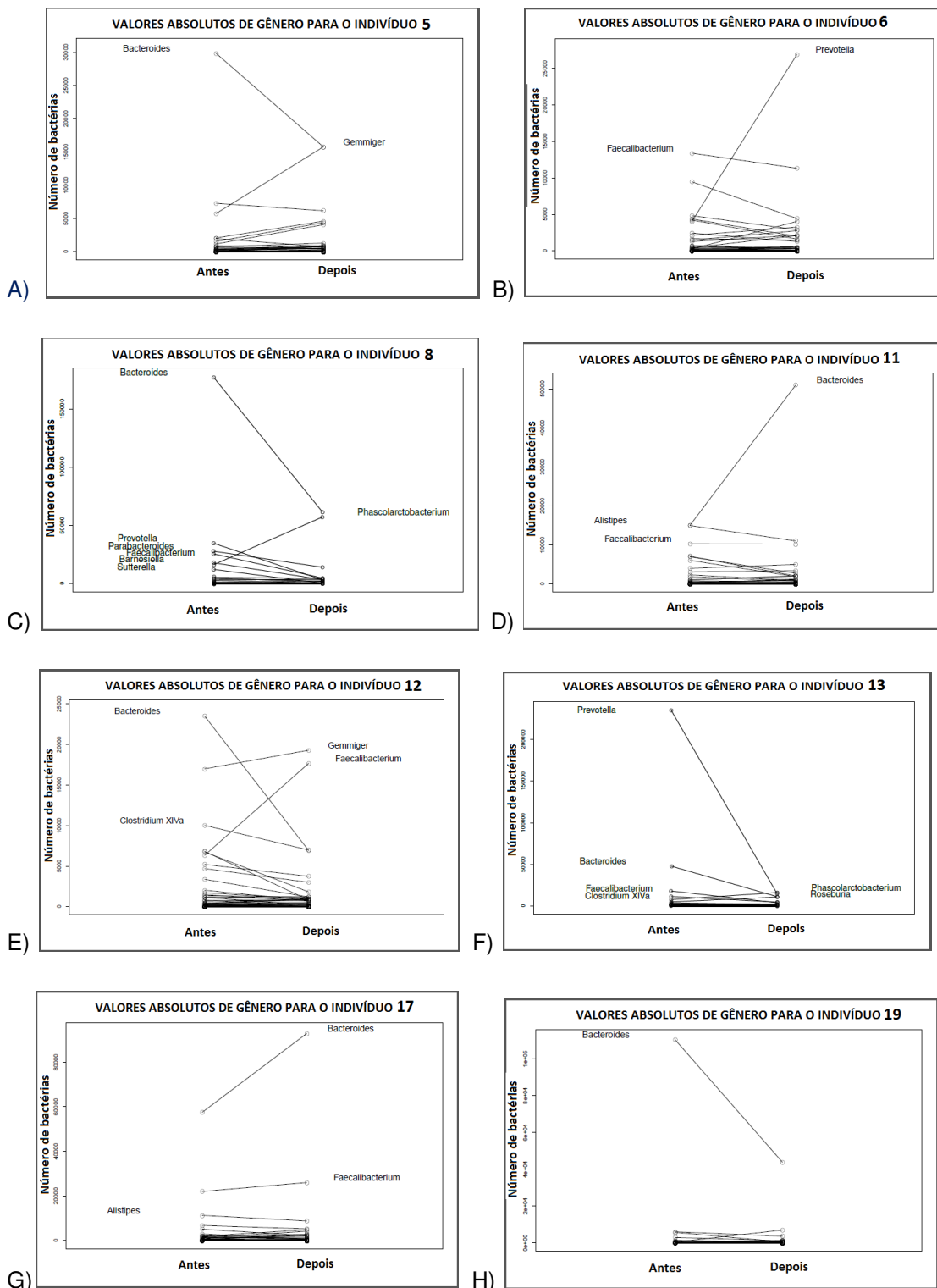
N)

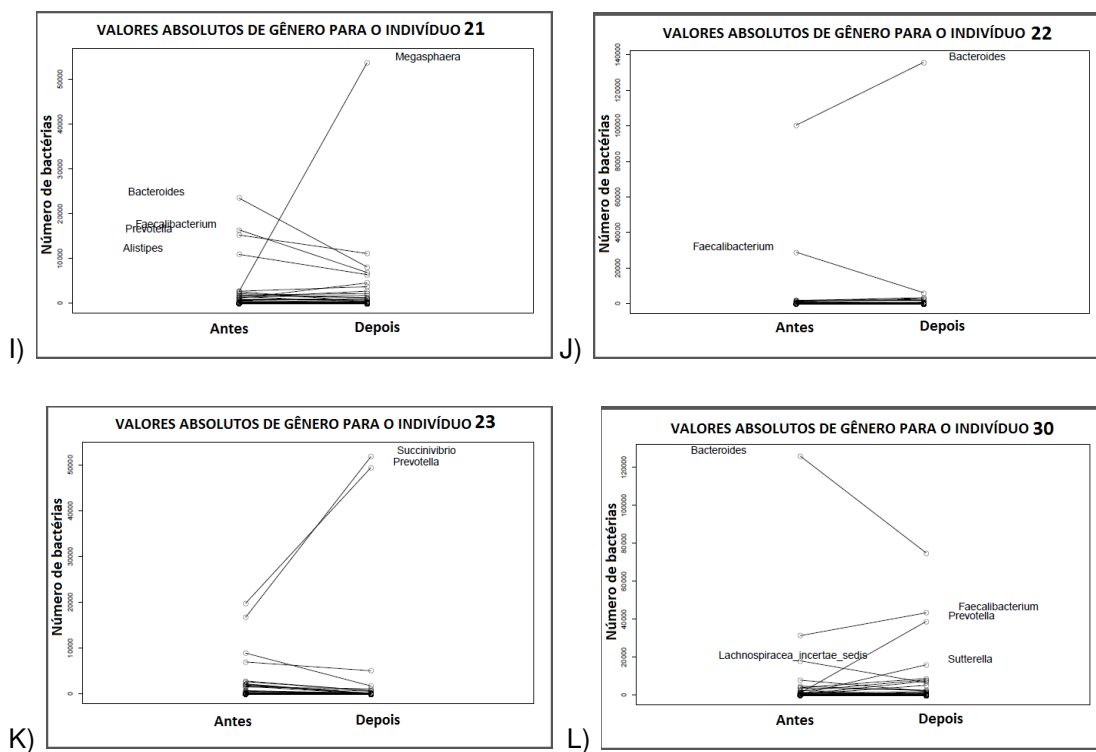


Anexo 10. Gráficos representativos da contagem de bactérias intestinais em números absolutos (nível filo), antes e depois da suplementação no grupo GLN. Cada indivíduo é representado por um gráfico do A ao U.

Alterações na microbiota intestinal após a suplementação

Grupo ALA – Nível Gênero

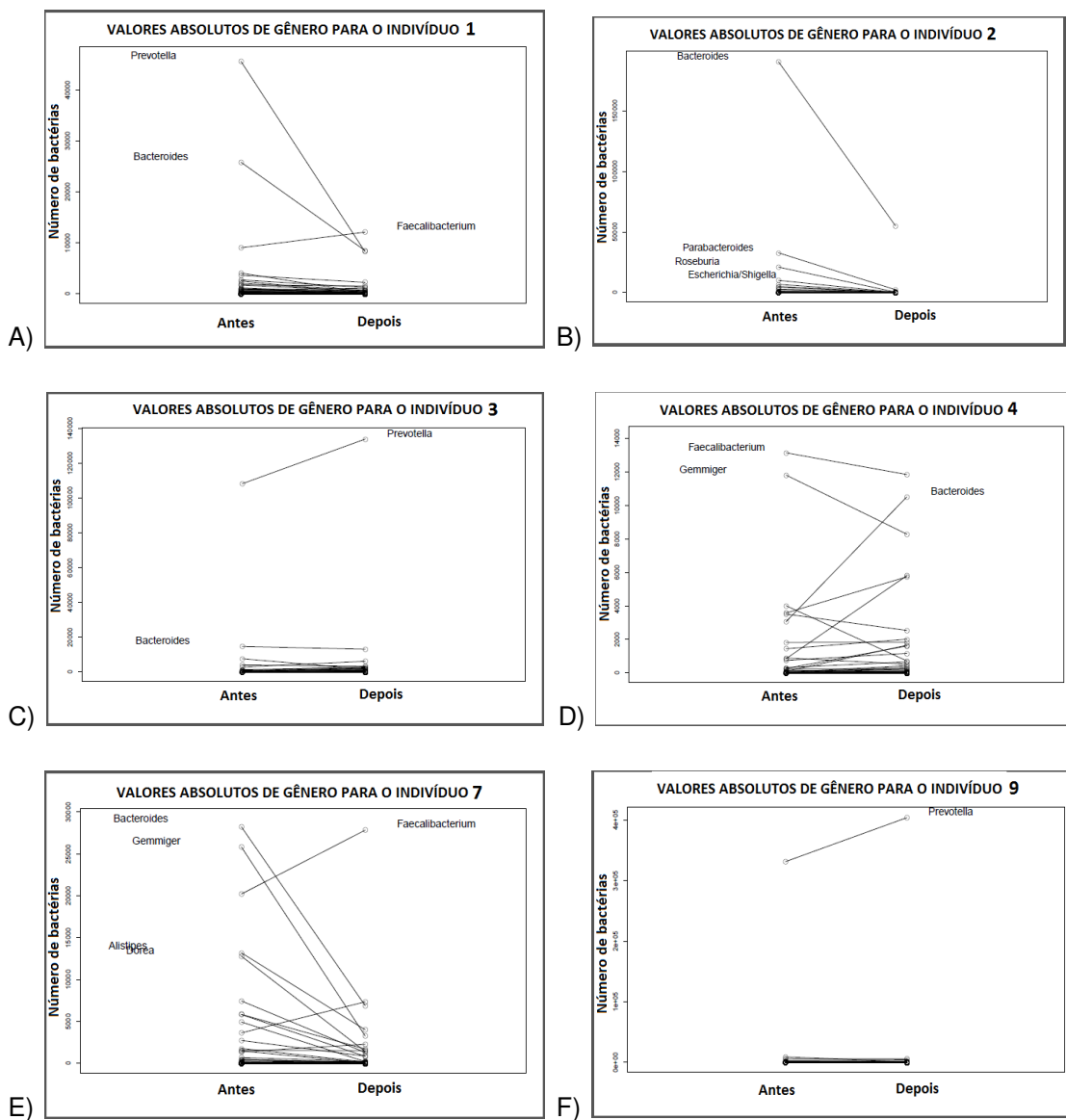


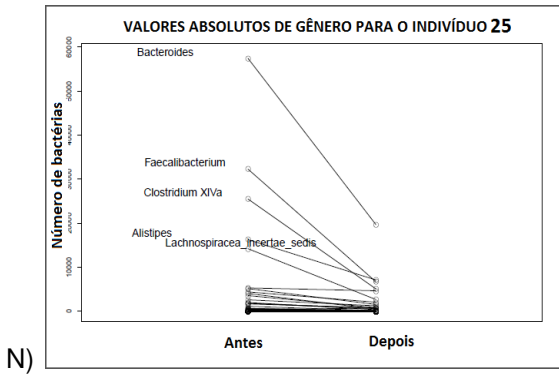
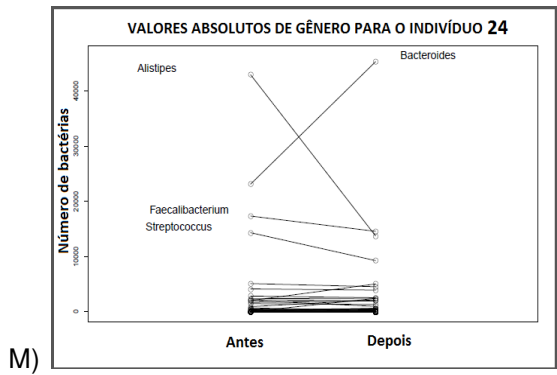
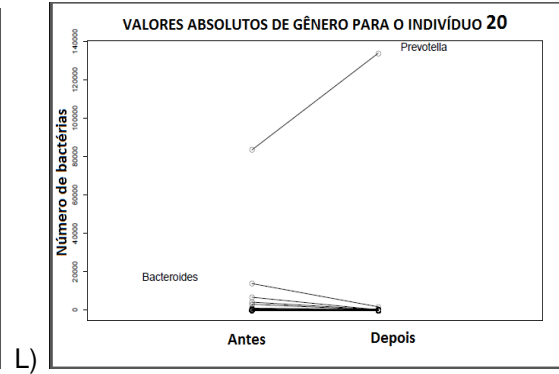
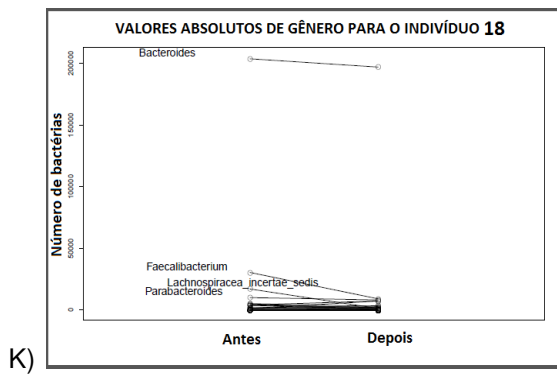
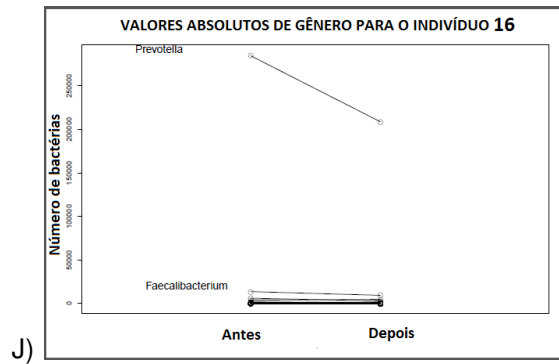
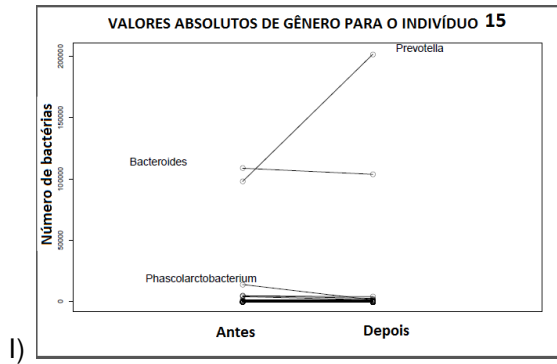
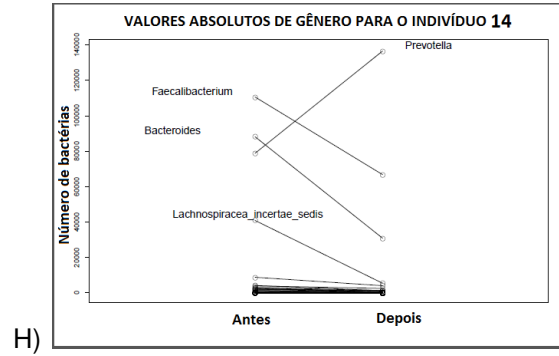
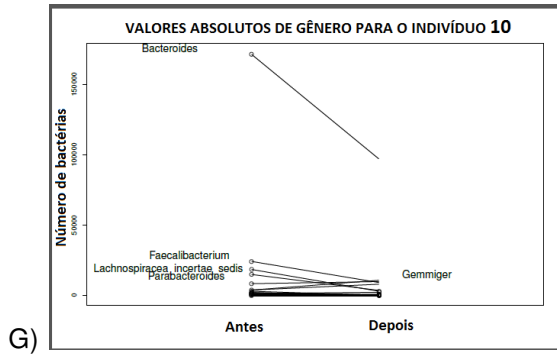


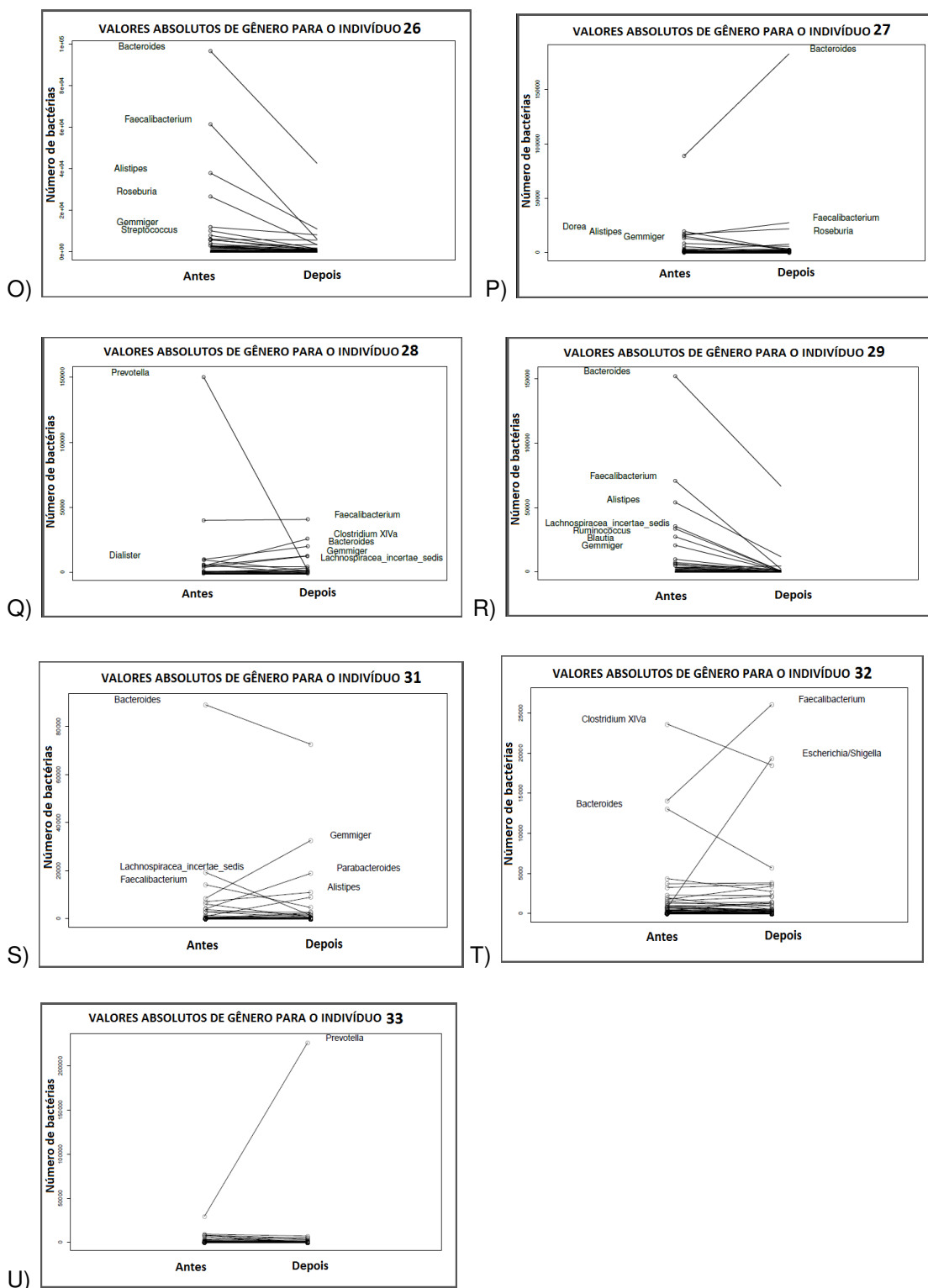
Anexo 11. Gráficos representativos da contagem de bactérias intestinais em números absolutos (nível gênero), antes e depois da suplementação no grupo ALA. Cada indivíduo é representado por um gráfico do A ao L.

Alterações na microbiota intestinal após a suplementação

Grupo GLN – Nível Gênero







Anexo 12. Gráficos representativos da contagem de bactérias intestinais em números absolutos (nível gênero), antes e depois da suplementação no grupo GLN. Cada indivíduo é representado por um gráfico do A ao U.