



**FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**TÍTULO:**

**MICROBIOTA INTESTINAL Y DIABETES**

**Autor: ANTONIO BELTRÁN MARTÍN**

**Tutor: FRANCISCO JAVIER ARROYO NOMBELA**

**Convocatoria: FEBRERO 2017**

## RESUMEN

La diabetes es una enfermedad metabólica crónica que afecta a más del 9% de la población mundial. Se confirma que hay una relación entre la alteración de la microbiota intestinal en pacientes diabéticos tipo 2 y niños diabéticos tipo 1 en relación con pacientes que no son diabéticos.

Los resultados de la administración de probióticos en el tratamiento de la diabetes no son concluyentes, pero sí que hay mejoría en varios parámetros relacionados con la diabetes.

En los nuevos tratamientos potenciales de la diabetes tipo 1, se han obtenido resultados positivos en modelos animales en la diferenciación celular de los enterocitos intestinales en células secretoras de insulina, pudiendo producir hasta el 30% de insulina de un individuo sano.

## INTRODUCCIÓN

### 1. Microbiota humana

La microbiota humana es el conjunto de microorganismos vivos que habitan en el cuerpo humano: bacterias, virus, hongos y un arquea. De ellos, las más abundantes son las bacterias. Estos microorganismos colonizan la superficie de piel, mucosas respiratoria, digestiva y urogenital, viviendo en simbiosis. (1)

Estos microorganismos se adhieren extracelularmente a receptores específicos de las células epiteliales llamadas adhesinas, sin activar los mecanismos de defensa y se adaptan a las condiciones específicas del medio: humedad, temperatura, tensión de oxígeno, etc. (1)

En nuestro cuerpo habitan más de 10.000 especies bacterianas diferentes y se estima que el organismo humano alberga unos 100 billones de microorganismos, 10 veces más que el número de células humanas. En el tracto gastrointestinal y en la boca hay una gran diversidad microbiana, la piel tiene una diversidad media y dónde menos variedad hay es en la vagina. (2)

### Funciones

La simbiosis entre el hombre y su microbiota hace posible la supervivencia, ya que ayuda a metabolizar alimentos mediante fermentación de residuos de la dieta, proporciona factores esenciales para el crecimiento, contribuye a la maduración del sistema inmune y protege contra la colonización e invasión de microorganismos patógenos (3):

- La microbiota intestinal permite obtener nutrientes de los alimentos a través de la producción de enzimas y rutas metabólicas que carecemos. También, ayuda a sintetizar la vitamina K, biotina, aminoácidos, y a la absorción de iones como el Ca, Mg, y Fe. (3)

- La microbiota intestinal recupera la energía de la dieta a través de la producción de ácidos grasos de cadena corta por fermentación de carbohidratos: acetato, butirato y propionato. Estos son una fuente energética para las células: el acetato para los miocitos, el butirato para los enterocitos y el propionato para los hepatocitos (3).
- La microbiota restringe el crecimiento de bacterias potencialmente patógenas, con el “efecto barrera”, y participa en la degradación de toxinas (3)
- Contribuye a la maduración del sistema inmune: la interacción de los enterocitos del intestino con los antígenos bacterianos provoca una respuesta inmune contra antígenos considerados no patógenos. Ello desencadena un estado de inmunotolerancia que permite la exposición continua a dichos microorganismos (3)

## 2. Diabetes Mellitus

La diabetes es una enfermedad metabólica crónica causada por una alteración en la función endocrina del páncreas o por la alteración en los tejidos efectores, de forma que se pierde la capacidad de producir suficiente insulina o de utilizarla eficazmente. La insulina es una hormona fabricada y liberada por las células  $\beta$  pancreáticas y permite que la glucosa de la sangre acceda a las células del organismo para ser usada como fuente de energía. (4)

Se estima que actualmente hay más de medio millón de niños menores de 14 años con diabetes tipo 1 y 415 millones de adultos con diabetes en el mundo (9% de la población mundial), de los cuales 193 millones están sin diagnosticar. Además, uno de cada siete nacimientos se ve afectado por la diabetes gestacional. (4)

Se distinguen principalmente 2 tipos de diabetes:

- Diabetes Mellitus de tipo 1 o juvenil: por lo general, se detecta en niños y adolescentes. Se considera una enfermedad inflamatoria crónica causada por la destrucción específica de las células  $\beta$  en los islotes de Langerhans del páncreas. Está causada por una reacción autoinmune, en la que el sistema inmunológico ataca a las células  $\beta$  debido a la presencia de anticuerpos contra antígenos citoplasmáticos de las células  $\beta$  pancreáticas como la descarboxilasa del ácido glutámico 65 y 67 (GAD65 y 67), la proteína de choque térmico 65 (Hsp-65), y contra insulina (5). Sin embargo, la mayor susceptibilidad para desarrollar DMI se encuentra en los genes del antígeno leucocitario humano (HLA clase II) del cromosoma 6, que contribuyen con el 50% del riesgo. (6)

La razón exacta se desconoce, pero está relacionado con mutaciones de varios genes, factores ambientales, a circunstancias en el desarrollo en el útero, a la alimentación durante las primeras etapas de la vida o a infecciones virales.

- Diabetes Mellitus de tipo 2 o adulta: por lo general, aparece en la edad adulta y se produce cuando las células  $\beta$  pancreáticas no producen suficiente cantidad de insulina y/o existe resistencia periférica a la insulina por parte de los adipocitos y células musculares. Entre el 90% y el 95% de las personas diabéticas son de tipo 2. (4)

Está asociado con varios factores de riesgo y estilos de vida: obesidad, sedentarismo, mala alimentación, edad, hipertensión arterial, dislipemia, y tiene relación con la genética. (4)

## ANTECEDENTES

### 1. Microbiota intestinal normal

Más del 95% de la microbiota humana se localiza en el tracto digestivo, pero su distribución no es homogénea y depende de: la excreción de bilis y jugo pancreático, el peristaltismo, la secreción de mucina que contiene IgA, el pH, la disponibilidad de nutrientes, la dieta, la tensión de oxígeno, el antagonismo bacteriano y la presencia de receptores celulares para las adhesinas bacterianas (8). Hay cinco filos bacterianos: los gram negativos *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* y *Verrucomicrobia*, y los gram positivos *Actinobacteria* y *Firmicutes*; y un Archaea (13).

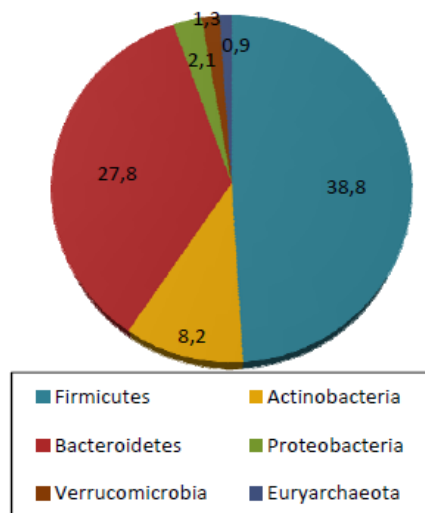


Figura 1. Abundancia a nivel de *phylum* de la microbiota intestinal. Fuente: Arumugam et al (10).

- El estómago es un órgano donde hay pocos microorganismos debido al pH ácido. La densidad de bacterias varía entre 10 y 100 UFC/ml. Se compone de la flora oro faríngea que ha sido deglutida, como *Streptococcus*  $\alpha$ -hemolíticos, *Lactobacillus* sp., *Candida* sp. Además, puede estar presente *Helicobacter pylori*. (7)
- El intestino delgado formado por duodeno, yeyuno e íleon. En el duodeno se mantiene el pH ácido, elevada actividad peristáltica, la secreción de bilis, que tiene propiedades antimicrobianas, y otras sustancias, como la lisozima e IgA, contribuyen a mantener un número relativamente bajo de microorganismos. El duodeno y yeyuno, tienen una baja concentración de microorganismos, entre  $10^3$  y  $10^5$  UFC/ml. Las especies predominantes son bacterias Gram positivas como *Lactobacillus* y *Streptococcus* (9).

La microbiota del íleon es muy parecida a la del colon, se produce un aumento densidad bacteriana con una concentración de  $10^7$  a  $10^8$  UFC/ml, ya que disminuye la velocidad del tránsito intestinal y aumenta el pH. Predominan los microorganismos anaerobios y Gram negativos. (9)

- El intestino grueso es la localización corporal con mayor densidad microbiana con

Grupo microbiano	UFC/g heces
Bacteroides	$10^9 - 10^{12}$
Bifidobacterias	$10^9 - 10^{11}$
Eubacterias	$10^9 - 10^{11}$
Peptoestreptococos	$10^9 - 10^{11}$
Peptococos	$10^9 - 10^{11}$
Ruminococos	$10^5 - 10^{11}$
Fusobacterias	$10^6 - 10^{10}$
Clostridios	$10^6 - 10^9$
Lactobacilos	$10^5 - 10^8$
Enterobacterias	$10^5 - 10^8$
Enterococos	$10^5 - 10^7$
Estreptococos	$10^3 - 10^5$
Levaduras	$10^2 - 10^5$
Estafilococos	$0 - 10^4$

$10^{14}$ UFC/ml, debido a la disminución del contenido en agua, la disminución del peristaltismo y un pH cercano al fisiológico. Se estima que conviven más de 500 especies diferentes de bacterias, con un predominio de microorganismos anaerobios, con una relación con las aerobias de 1000/1. Suponen entre el 40-50% del peso seco de los materiales fecales. Los filos *Bacteroidetes* y *Firmicutes* constituyen más del 90% de las categorías filogenéticas que dominan el colon (11). Los *Firmicutes* se encuentran en mayor proporción, incluye más de 200 géneros y los más importantes son los *Lactobacillus*, *Micoplasma*, *Bacillus* y *Clostridium*. Los *Bacteroidetes* incluyen sólo 20 géneros. (12)

Tabla 1. Microorganismos en heces humanas. Compilado de Hagiage (14), Cummings (15), Holzapfel y cols. (16) y Salminen y cols. (17).

## 2. Intervención de los microorganismos en el metabolismo glucídico

Los *Firmicutes* son más eficientes en la fermentación de carbohidratos insolubles (fibras). Las especies de *Bacteroidetes* son más versátiles en el uso de sustratos, utilizan los oligosacáridos y polisacáridos solubles que provienen de la rotura de polisacáridos insolubles (18).

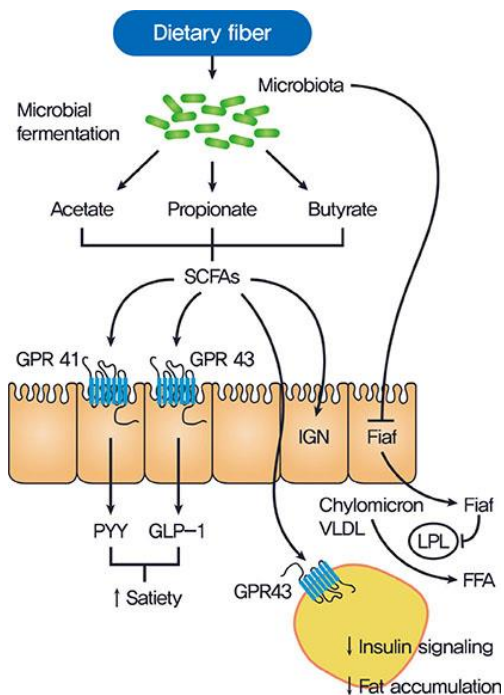
Por su parte, las *Bifidobacterias* (*Actinobacterias*) contienen enzimas que degradan glicanos y glicosaminoglicanos (celulosa, condroitina, ácido hialurónico y mucinas). La fermentación de estos sustratos por la microbiota intestinal libera ácidos grasos de cadena corta (AGCC), principalmente acetato, propionato y butirato (19).

El butirato sirve de energía para los enterocitos e inhibe la producción de TNF proinflamatorio, modulando la actividad del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (20).

El acetato y el propionato son absorbidos. El acetato sirve de sustrato para la gluconeogénesis, la síntesis de colesterol y de triglicéridos, mientras que el propionato se utiliza como sustrato para la gluconeogénesis (19).

Las incretinas son producidas por células enteroendocrinas y potencian la secreción de insulina en respuesta a la glucemia, regulándola y son responsables alrededor del 70% del nivel de insulina postprandial. La principal es la GLP1. Los AGCC se unen a los receptores GPR41 y GPR43 de los enterocitos. Mediante el primer receptor se libera el péptido YY, que

reduce la energía extraída de la dieta al aumentar el peristaltismo intestinal. Mediante el segundo receptor se libera GLP1, que induce la liberación de insulina dependiente de glucosa e inhibe la secreción de glucagón, aumenta la sensibilidad a la insulina y disminuye el apetito (21).



e inhibe la secreción de glucagón, aumenta la sensibilidad a la insulina y disminuye el apetito (21).

En cuanto a las proteínas, la histamina es un producto del metabolismo fermentativo de *Lactobacillus reuteri* y ejerce una señal inmunoreguladora, ya que suprime la producción de TNF a través de receptores de H2 del epitelio intestinal (19).

Figura 2. Regulación del metabolismo a partir de la microbiota. Cascada de reacciones a partir de los AGCC en los receptores GPR41 y GPR43, liberando PYY Y GLP-1, estimulando la secreción de insulina pancreática y actuando en adipocitos. (22)

## OBJETIVOS

Comprobar la hipótesis de la disbiosis intestinal en pacientes con DMI y DMII a través de la revisión bibliográfica de los ensayos realizados hasta el momento.

Demostrar nuevas líneas de prevención y tratamiento para evitar la enfermedad y/o avance mediante la introducción de microbiota que pueda regular el control glucémico del individuo.

## MÉTODOS Y MATERIALES

La mayoría de los estudios sobre la microbiota intestinal están basados en el análisis de las heces, ya que su recolección es sencilla y no invasiva. Las técnicas de cultivo tradicionales pueden detectar aproximadamente el 30% del total de las bacterias del tracto intestinal por varias razones: las condiciones de crecimiento especiales para la mayoría de las bacterias, la selectividad de los medios de cultivo que se utilizan, el estrés impuesto por procedimientos de cultivo, la necesidad estricta de condiciones de anaerobiosis, y las dificultades con la simulación de las interacciones de las bacterias con otros microorganismos y células del huésped (13).

Las técnicas modernas de estudio de la microbiota han revelado un número importante de bacterias que no son cultivables: el 62% de la microbiota colónica no se conocía y el 80% de las bacterias identificadas por la metagenómica se consideran no cultivables (23).

El Proyecto del Microbioma Humano (2007) ha identificado aproximadamente al 30% de la microbiota intestinal, y junto con el proyecto Metagenómica del Tracto Intestinal Humano (MetaHIT) en Europa.

Actualmente, la molécula más usada en estudios de filogenia y taxonomía es el gen que codifica para el ARNr 16S, sin necesidad de realizar cultivos. La información genética obtenida de la secuenciación del microbioma se agrupa en las llamadas unidades taxonómicas operacionales, de acuerdo con el porcentaje de semejanza de sus ARNr 16S. Cuando hay una semejanza en el ARNr 16S del 95% se habla de género, y cuando la semejanza es del 97%, se habla de especie (23).

**Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):** técnica molecular que permite amplificar cadenas de DNA y obtener múltiples copias. Se realiza en un termociclador que usa diferentes temperaturas en función de la etapa de cada reacción. Se emplean nucleótidos, polimerasas, y cofactores para que la reacción tenga lugar. Posteriormente, esas copias se secuenciarán.

Una de las más usadas es PCR en tiempo real o cuantitativa, que combina la técnica de PCR con análisis de inmunofluorescencia al añadirle una molécula emisora de fluorescencia (24).

**DGGE (electroforesis en gel por gradiente desnaturalizante) y TGGE (electroforesis en gel por gradiente térmico):** ambas metodologías se basan en la separación de fragmentos de amplificación con distinta secuencia mediante electroforesis (24).

**FISH (hibridación fluorescente in situ):** técnica cuantitativa que consiste en el uso de sondas para el ARNr marcadas con fluorescencia que se hibridan directamente con preparaciones bacterianas fijadas sobre un portaobjetos (24).

### **Metagenómica**

Se han desarrollado técnicas moleculares para analizar microorganismos a gran escala: la metagenómica. La metagenómica es un conjunto de técnicas que permite obtener todos los fragmentos de ADN y ARN que contiene una muestra concreta, para luego secuenciarlos y compararlos con todas las secuencias genéticas conocidas y publicadas hasta el momento, permitiendo encontrar homologías (24).

En primer lugar, se elimina todo el material genético del hospedador, luego se selecciona los genes que codifican para RNAr 16S y se amplifica todo el material genético mediante PCR. El siguiente paso es la secuenciación a gran escala, y se pueden emplear tres métodos: sanger, pirosecuenciación o ultrasecuenciación. La más usada es la pirosecuenciación (25).

En la pirosecuenciación el material genético amplificado se coloca en pocillos de una placa de pirotitulación junto con las enzimas necesarias para la pirosecuenciación. La secuenciación ocurre gracias a una reacción enzimática con la secuencia que emite un haz de luz que es

directamente proporcional al nucleótido que esté leyendo. Por tanto, el ADN y ARN amplificado se traduce en señales que se comparan con las bases de datos (25).

## RESULTADOS

### 1. Disbiosis intestinal en la patogenia de la Diabetes tipo 2

Larsen y cols. (26) realizaron un estudio con el objetivo de conocer diferencias entre la microbiota intestinal en pacientes con diabetes tipo 2 y pacientes no diabéticos.

Se observó que el filo *Firmicutes* y clase *Clostridia* se redujeron significativamente en el grupo diabético en comparación con el grupo control; además, la clase *Clostridia* mostró una tendencia a disminuir con mayores niveles de glucosa plasmática. El filo *Bacteroidetes* fue representado principalmente por la clase *Bacteroides*, que fue un poco mayor en diabéticos en comparación con el grupo control.

La clase *Betaproteobacteria* fue superior en diabéticos con respecto a no diabéticos, al igual que la clase *Bacillo*, y positivamente correlacionada con la glucosa plasmática.

La conclusión de este estudio es que la diabetes tipo 2 en humanos está asociada con cambios de la microbiota intestinal.

Karlsson y cols. (27) caracterizaron la microbiota fecal de pacientes sanos, pre-diabéticos y diabéticos. Encontraron menor cantidad de *Clostridia* productoras de butirato (*Roseburia intestinalis* y *Faecalibacterium prausnitzii*) asociado a pacientes diabéticos tipo 2. En pacientes saludables, la microbiota intestinal era más diversa y *F. prausnitzii* se halla en mayor cantidad.

Gotteland M. y cols. (28) también detectaron la presencia de disbiosis en sujetos con diabetes tipo 2, los cuales, en términos generales tienen menor cantidad de *Bifidobacterium* spp y *Faecalibacterium prausnitzii*, conocidos por tener actividad anti-inflamatoria.

Los estudios de Qin y cols. (29) identificaron la presencia de disbiosis intestinal moderada en pacientes con diabetes tipo 2, respecto a pacientes sanos. Se obtuvo un resultado significativo de aumento de patógenos oportunistas (*Bacteroides caccae*, *Clostridium hathewayi*, *Clostridium ramosum*, *Clostridium symbiosum*, *Eggerthella lenta* y *Escherichia coli*) y disminución de bacterias productoras de butirato (*Clostridiales* sp., *Eubacterium Rectale*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia intestinalis* y *Roseburia inulinivorans*) en pacientes diabéticos.



J. Sato y cols. (30) realizaron un ensayo comparando la microbiota intestinal de pacientes sanos y pacientes con diabetes tipo 2, concluyendo que hay una disbiosis intestinal en diabéticos.

Los resultados del estudio mostraron que marcadores de la inflamación eran más elevados en el grupo diabético que en el control. Se registraron menor número de bacterias del grupo *Clostridium coccoides*, *Atopobium Cluster*, y *Prevotella* en el grupo diabético y el recuento de *Lactobacillus*, especialmente *L. Reuteri* y *L. plantarum*, fue mayor respecto al grupo control.

Las concentraciones fecales de ácido acético y propiónico fueron más bajas en el grupo diabético.

También se detectó en el grupo de diabéticos que el nivel de LPS en sangre era más elevado que el grupo control y mostró resultados correlaciones con marcadores como IMC, HbA1c, hs-CRP, TNF-a e IL-6.

Egshatyan y cols. (31) realizaron un ensayo para conocer las diferencias de la microbiota en pacientes con diferente tolerancia a la insulina. En él se comparan 3 grupos: pacientes con tolerancia normal a la glucosa o grupo control (C), pacientes prediabéticos (PreD) y pacientes con Diabetes tipo 2 (D).

La microbiota de las muestras fue predominantemente representada por *Firmicutes*, y en menor grado, por *Bacteroidetes*. Aproximadamente el 50% de la abundancia microbiana total fue representada por cinco géneros: *Blautia*, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Faecalibacterium*, y *Clostridium*.

Se observó un aumento en el género *Blautia* en los pacientes diabéticos en comparación con los sanos. Así como el género *Serratia*, que fue mayor en pacientes con intolerancia a la glucosa. Las bacterias del filo *Verrucomicrobia* disminuyeron en pacientes con intolerancia a la glucosa en relación al resto de grupos.

Por lo tanto, el estudio de Egshatyan también proporciona la evidencia de la modulación de la microbiota intestinal en la patogénesis de la diabetes de tipo 2.

## **2. Disbiosis intestinal en la patogenia de la Diabetes tipo 1**

I. Leiva y cols. (32) realizaron un estudio comparando la microbiota intestinal de niños con diabetes tipo 1 y niños sanos, detectando una disbiosis. Se manifestó que la mayoría de las bacterias pertenecían a los filos *Firmicutes* y *Bacteroidetes* en ambos grupos.

Hubo diferencias dentro de los géneros de los filos *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y *Actinobacteria* entre los niños sanos y diabéticos. En diabéticos el número de *Actinobacteria* y *Firmicutes* disminuye y los *Bacteroidetes* aumentan con respecto al grupo control. En los niños diabéticos aumenta la cantidad de *Clostridium*, *Bacteroides*, *Veillonella*, *Eggerthella* y *Bacillus* así como una disminución de *Prevotella* y *Bifidobacterium*. Además, el cociente *Firmicutes/Bacteroidetes* fue significativamente más bajo en los niños diabéticos que en los niños sanos.

Hubo una correlación positiva entre la reducción en el número de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* y los niveles de glucosa plasmáticos, además de que niveles más altos de HbA1c estuvieron asociados con una disminución del cociente *Firmicutes/Bacteroidetes* y un aumento en el número de *Clostridium*.

	Niños sanos	Niños diabéticos	P*
<i>Prevotella</i>	10.95 ± 0.57	9.03 ± 0.99	0.001
<i>Clostridium</i>	4.85 ± 0.34	6.87 ± 0.52	0.001
<i>B. Coccoides-E rectale</i>	8.64±0.72	6.99±0.47	0.001
<i>Enterococcus</i>	5.80 ± 1.35	5.94± 1.21	0.852
<i>Veillonella</i>	6.76±0.82	8.93±1.12	0.001
<i>Bifidobacterium</i>	5.65±1.14	3.12±0.97	0.001
<i>Lactobacillus</i>	4.23 ± 0.36	3.47 ± 0.43	0.001
<i>Bacteroides</i>	8.64 ±0.45	10.67 ± 0.63	0.001

Tabla 2. Géneros y grupos presentes en la microbiota de los niños sanos y niños con diabetes tipo 1. (32)

### 3. Endotoxemia bacteriana por LPS de la pared de gram negativas.

Cani y cols. (33) demostraron que los lipopolisacáridos (LPS) de las bacterias gram negativas constituyentes de la pared bacteriana migran al torrente sanguíneo causando una endotoxemia que genera inflamación sistémica de bajo grado. Estos LPS se unen a unos receptores llamados Toll-like (TLR)-4, promoviendo la liberación de moléculas proinflamatorias. Este estado permanente de inflamación de bajo grado supone un avance en diferentes enfermedades, entre las cuales, la diabetes.

### 4. Investigación de nuevos tratamientos de la diabetes a través de la administración de bacterias intestinales modificadas.

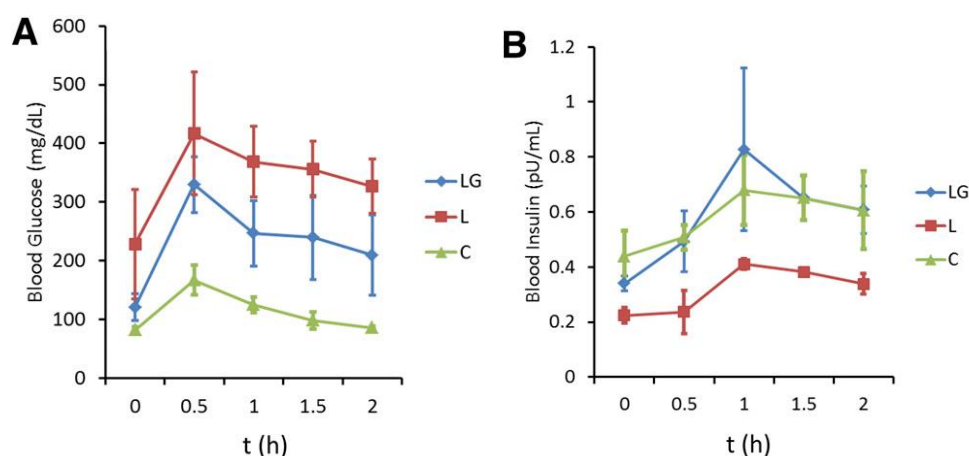
Los estudios de Suzuki y cols. (34) indican que el GLP-1 podría estimular la diferenciación de enterocitos en células glucosensibles y secretoras de insulina, aparentemente a través de la vía de señalización Notch.

John C. March y cols. (35) investigaron la administración oral de bacterias comensales capaces de secretar GLP-1 para comprobar la reducción de la hiperglucemia en ratas con diabetes mediante la diferenciación de enterocitos en células secretoras de insulina que responden a glucosa, pudiendo servir como tratamiento de la diabetes. En el trabajo de John

C. March, se modificó *Lactobacillus gasseri* para secretar GLP-1 a través de la introducción de un plásmido.

En el estudio había 3 grupos: ratas control no diabéticas (C), ratas diabéticas alimentadas con *Lactobacillus* no modificados (L) y ratas diabéticas alimentadas con *Lactobacillus* modificado (LG) durante 90 días.

A los 50 días, se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa y se midieron los niveles de insulina y glucosa en sangre en diferentes tiempos: el grupo L presentó mayor nivel de glucosa en la sangre y menor insulina plasmática con respecto al grupo C. La glucosa en sangre y la insulina plasmática no fueron significativamente diferentes entre el grupo C y LG.



Figuras 3A y 3B. (A) glucosa plasmática y (B) insulina en sangre de los 3 grupos de estudio y en diferentes tiempos tras realizar la prueba de la tolerancia oral de glucosa. (35)

A los 90 días, se compararon los niveles de insulina del intestino delgado de cada grupo de estudio: sólo el grupo LG expresó más insulina en su intestino que las ratas control (más de 5 veces superior al grupo control). La frecuencia relativa en el grupo LG es que 1 de cada 1.600 células epiteliales produce insulina.

En el páncreas, no hubo diferencias entre los grupos LG y L, el grupo C presentó niveles muy

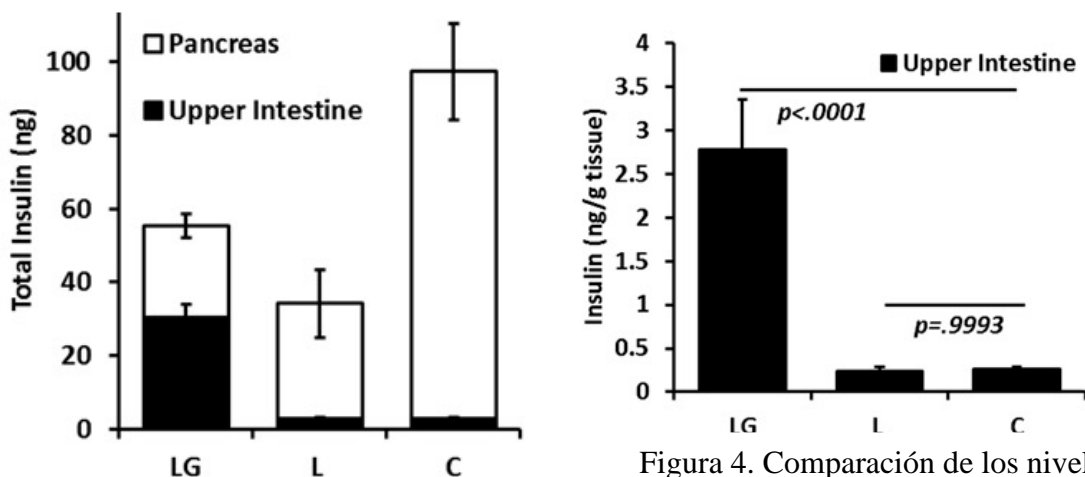


Figura 5. Insulina total (páncreas e intestino delgado) de los 3 grupos de estudio. (35)

Figura 4. Comparación de los niveles de insulina en intestino delgado de los 3 grupos de estudio a los 90 días. (35)

superiores de insulina por gramo comparado con los dos grupos.

Midiendo la cantidad total de insulina en intestino y páncreas, se observó que el grupo LG tenía un 60% más de insulina total que el grupo L. El grupo C tenía casi el doble de insulina total que el grupo diabético alimentado con *Lactobacillus gasseri*.

La conclusión de su estudio es que las ratas diabéticas alimentadas con bacterias secretoras de GLP-1 mostraron aumentos significativos en los niveles de insulina y eran más tolerantes a la glucosa, que las alimentadas con la cepa bacteriana madre. Estas ratas desarrollaron células productoras de insulina dentro del intestino delgado suficiente para reemplazar ~25-33% de la capacidad de insulina de ratas sanas no diabéticas. La secreción de insulina en ratas LG siguió la misma cinética y no fue significativamente diferente de la secreción de insulina del grupo control sano. Los tejidos intestinales de las ratas con células reprogramadas expresaron marcadores de células  $\beta$  importantes: MafA, PDX-1, y el FoxA2, esenciales para la función normal de las células pancreáticas. Estos resultados prueban la posibilidad de un uso seguro de un tratamiento oral no absorbido para la diabetes tipo 1.

### **5. Búsqueda de tratamientos para la diabetes a través de suplementos probióticos**

Marie-Christine Simon y cols. (36) desarrollaron un ensayo en pacientes tolerantes a la glucosa, que ingirieron diariamente 1010 millones de UFC de *Lactobacillus reuteri* o placebo durante 1 mes. Se demostró que el grupo que tomó el probiótico aumentó la liberación de GLP-1 y GLP-2 en un 76% y un 43%, respectivamente, y se secretó un 49% más de insulina postprandial con respecto al placebo. Sin embargo, la ingestión de *L. reuteri* no afectó las proporciones entre los mediadores inmunitarios pro y antiinflamatorios analizados y no alteró la sensibilidad a la insulina periférica.

Esto sugiere que la ingestión oral de una cepa específica puede servir como un nuevo enfoque terapéutico para mejorar la liberación de insulina dependiente de la glucosa en pacientes diabéticos.

Andreasen y cols. (37) realizaron un ensayo en pacientes diabéticos tipo 2 y pacientes sanos con tolerancia a la insulina alterada o normal bajo tratamiento de 4 semanas con *L. acidophilus* o placebo. El objetivo del estudio fue probar la hipótesis de que la suplementación oral con *L. acidophilus* mejora la sensibilidad a la insulina y modular la inflamación sistémica en sujetos humanos.

Los resultados mostraron que el tratamiento con *L. acidophilus* parece mejorar la sensibilidad a la insulina en aquellos pacientes con resistencia periférica a la insulina y diabéticos. Sin

embargo, los marcadores inflamatorios TNF, IL-6, IL-1 y proteína C reactiva no fueron afectados por la intervención.

En conclusión, la ingesta de *L. acidophilus* durante 4 semanas mejoró la sensibilidad a la insulina en comparación con el placebo, pero no afectan la respuesta inflamatoria sistémica.

El ensayo realizado por Vrieze y cols. (38) de trasplante fecal durante 6 semanas de donantes sanos a pacientes con síndrome metabólico para observar el efecto en la resistencia a la insulina reveló una mejora en la sensibilidad periférica a la insulina. La diversidad de la microbiota intestinal se incrementó en 16 grupos bacterianos, sobre todo *Bacteroidetes*, incluidos los productores de butirato, como *Clostridium cluster* y *Roseburia intestinalis*, este último mostró un aumento de 2,5 veces; y disminuyó *Alcaligenes faecalis* y *Escherichia coli* (patógenos oportunistas) en el grupo tratado con la infusión de microbiota intestinal de pacientes sanos.

En conclusión, los datos obtenidos apuntan hacia una mejora de la sensibilidad a la insulina tras realizar trasplante fecal de individuos sanos a pacientes con resistencia a la insulina, debido al papel que juega el butirato producido por el metabolismo microbiano intestinal, puesto que se observó que aumentaron las cantidades de bacterias productoras de butirato en los pacientes tratados.

H. S. Ejtahed y cols. (39) realizaron un ensayo sobre el efecto antioxidante que ejerce la ingesta de yogur enriquecido con *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium lactis* en pacientes con diabéticos tipo 2 y los efectos sobre la enfermedad, ya que el estrés oxidativo juega un papel importante en la patogénesis y progresión de la diabetes.

Los pacientes diabéticos fueron asignados a dos grupos: un grupo control consumió yogur convencional durante 6 semanas y el grupo de estudio consumió yogur enriquecido con *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium lactis*.

Los resultados muestran una disminución significativa de la glucemia en ayunas y la hemoglobina glicosilada (HbA1c); y el aumento de las actividades de superóxido dismutasa eritrocítica y glutatión peroxidasa de los pacientes tratados con yogur enriquecido en comparación con el grupo control. Sin embargo, no se observaron cambios significativos en la concentración de insulina basal.

Estos resultados sugieren que la ingesta de microbiota antioxidante, como son *L. acidophilus* y *B. lactis*, ayuda a mejorar la patología de la diabetes, probablemente por la disminución del estrés oxidativo mediada por los probióticos y sus efectos moduladores y antiinflamatorios.

Yadav y cols. (40) informaron que el probiótico dahi (leche fermentada que contiene *L. acidophilus* y *L. casei*) retrasa el avance de la intolerancia a la glucosa y la hiperglucemia, mediante una disminución del estrés oxidativo en modelos animales.

Yuting Ruan y cols. (41) realizaron un metaanálisis de los estudios publicados sobre la influencia de la administración de distintos tipos de probióticos en el control glucémico, resistencia a la insulina y marcadores de la inflamación relacionados con la diabetes. El motivo de este análisis es la obtención de resultados contradictorios en los ensayos publicados. Se analizaron 17 estudios clínicos en humanos, con un total de 1.105 participantes. Las especies probióticas y la dosis utilizada varía entre dichos estudios: 8 estudios utilizaron una especie de probiótico, el resto usaron una combinación dos o más especies.

En todos los estudios hubo cambios en la glucemia en ayunas, pero de los 17 ensayos, solo 4 informaron una reducción significativa posterior a la toma de los probióticos, con diferencias medias desde 0,15 a 1,51 mmol/L (2.70 mg/dL-27.21 mg/dL). La media del metaanálisis indicó una reducción significativa de 0,31 mmol/L (5.59 mg/dL) en comparación con los grupos control. Los ensayos con una duración de más de 8 semanas mostraron ese efecto más significativo, indicando una tendencia más positiva de los probióticos a lo largo del tiempo.

De los 17 estudios, 8 mostraron cambios en la resistencia a la insulina periférica, con 4 estudios que informaron una reducción significativa después de consumir probióticos. Los ensayos que utilizaron más de una especie de probiótico mostraron este efecto significativo en comparación con los grupos control.

Cinco de los estudios incluidos sugieren que el consumo de probióticos disminuyó marcadores inflamatorios, incluyendo hsCRP, IL-6 y TNF- $\alpha$ .

Como conclusión: los estudios que han usado más de una especie de probióticos y duraron más de 8 semanas muestran reducciones más pronunciadas en la glucosa basal y resistencia a la insulina periférica. El consumo de probióticos puede mejorar ligeramente el control glucémico. La modificación de la microbiota intestinal por la suplementación probiótica puede ser un método para prevenir y controlar la hiperglucemia en la práctica clínica.

## DISCUSIÓN

- En todos los estudios descritos, se observa una modificación cuantitativa de la composición de la microbiota intestinal de los pacientes diabéticos respecto a los pacientes no diabéticos.

En aquellos pacientes diabéticos hay una disminución del filo *Firmicutes* (26). Dentro de ese filo, disminuye el número de bacterias de la clase *Clostridia* (26) (27) (29), en concreto, de las bacterias productoras de butirato, como: *Faecalibacterium prausnitzii* (27) (28) (29), *Roseburia intestinalis* (27) (28), *Eubacterium rectale* (29) y *Roseburia inulinivorans* (29).

Dentro del filo *Actinobacteria*, hay un descenso de los géneros *Bifidobacterium* (28) y *Atopobium* (30). En el filo *Bacteroidetes*, el género *Prevotella* se encuentra disminuido en diabéticos (30). Y, en los pacientes con intolerancia a glucosa el filo *Verrucomicrobia* está disminuido en la microbiota intestinal.

Además, hay un aumento del filo *Bacteroidetes* (26). Dentro del filo *Firmicutes*, la clase *Bacillo* está aumentada (26), en concreto, *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus planterum* (30). Del filo *Proteobacteria*, la clase *Betaproteobacteria* está aumentada en diabéticos (26) y en los pacientes intolerantes a glucosa la clase *Serratia* (31). Además, los estudios de Qin (31) identificaron un aumento del número de patógenos oportunistas, como *Bacteroides caccae*, *Clostridium hathewayi*, *Clostridium ramosum*, *Clostridium symbiosum*, *Eggerthella lenta* y *Escherichia coli*.

Esta disbiosis intestinal se puede caracterizar en grandes rasgos por un aumento de bacterias gram negativas y patógenos oportunistas; y una disminución de gram positivas y fermentadoras productoras de ácido butírico.

La influencia del butirato será menor en pacientes diabéticos en relación a los pacientes sanos: no se induce tanta liberación de incretinas (GLP-1 y GLP-2), ni de PYY. Atribuyendo un menor control sobre la homeostasis glucídica postpandrial y afectando también en la predisposición a la resistencia a la insulina periférica.

El mayor número de bacterias gram negativas y patógenos oportunistas incrementan la respuesta inflamatoria tanto a nivel intestinal como sistémica, induciendo la liberación de mediadores proinflamatorios como IL-6 y TNF- $\alpha$  y aumentando la translocación a sangre de LPS que se unen a los receptores TLR-4, con la consiguiente liberación de más mediadores proinflamatorios.

- En niños diabéticos tipo 1 también hay una disbiosis con respecto a niños no diabéticos, ya que se ve aumentado el filo *Bacteroidetes*, y los géneros *Clostridium* (patógenos

oportunistas), *Bacteroides*, *Veillonella*, *Eggerthella* y *Bacillus*. Hay una disminución de los filos *Firmicutes* y *Actinobacteria*, y los géneros *Prevotella* y *Bifidobacterium* en comparación con los niños sanos. (32)

- En cuanto a la aplicación de probióticos para el tratamiento de la diabetes tipo 2, los ensayos tratados en esta revisión bibliográfica muestran diferentes resultados, según la especie o especies que se hayan administrado.

Se observó una mejora en pacientes diabéticos tipo 2 de la sensibilidad a la insulina periférica en los ensayos de Andreasen (37) (uso de *L. acidophilus* durante 4 semanas en humanos), Yadav (40) (uso de *L. acidophilus* y *L.casei* en animales), Vrieze (38) (trasplante fecal de donantes sanos a receptores con síndrome metabólico) y en el metaanálisis de 17 ensayos realizado por Yuting Ruan (41) en el que 8 de los 17 mostraron una mejora en la sensibilidad a la insulina periférica, y 4 de ellos con valores significativos, sobre todo los que usaron más de una especie de probióticos.

Se vio una mejora en la hiperglucemia en ayunas en los ensayos de Ejtahed (39) (uso de *L. acidophilus* y *Bifidobacterium lactis* en diabéticos, y mostró una reducción de HbA1c), Yadav (40) (uso de *L. acidophilus* y *L.casei* en animales) y en el metaanálisis de 17 ensayos realizado por Yuting Ruan (41) en el que todos los estudios muestran una disminución de la hiperglucemia (la media del metaanálisis es de -5,59mg/dL), siendo los estudios con valores más relevantes aquellos con una duración superior a 8 semanas.

En el ensayo de Marie-Christine Simon (36) se vio un aumento de la secreción de la insulina postprandial y reducción de la hiperglucemia postprandial, al administrar *L.reuteri* durante 4 semanas.

Estos estudios no son concluyentes, ya que no se ve una respuesta significativa en la administración de probióticos. Sin embargo, esto se puede deber a que los estudios no se han realizado con características similares de duración de tratamientos, cepas empleadas, muestras de población con diferentes características, etc.

En cuanto a los mediadores de la inflamación (hsCRP, IL-6 y TNF- $\alpha$ ) en el metaanálisis de Yuting Ruan (41), 5 de los 17 ensayos mostraron disminución de estos marcadores. En los ensayos de Ejtahed (39) y Yadav (40) se obtiene una disminución de los niveles de estrés oxidativo en los pacientes tratados con los probióticos.

- El ensayo realizado en modelos de ratas por John C. March (35), al introducir un plásmido que codifica para GLP-1 en *Lactobacillus gasseri* y administrándolo durante 90 días, se vio una diferenciación celular de los enterocitos intestinales (1 de cada 1600) a células secretoras de insulina a nivel intestinal. Los resultados fueron que se secretó entre un



25%-30% de la insulina de un individuo sano y mejoró la hiperglucemia basal con respecto al grupo al que no se le había administrado el probiótico modificado.

Este resultado supone una nueva línea de investigación para el tratamiento de la diabetes tipo 1, puesto que se logra obtener un aumento de células sensibles a la glucosa y productoras de insulina, disminuyendo en gran medida la hiperglucemia postprandial.

## CONCLUSIÓN

En la revisión bibliográfica de los estudios reseñados se observa que hay una alteración de la microbiota intestinal en los pacientes diabéticos tipo 2 y niños con diabetes tipo 1, con respecto a los pacientes sanos. Podría decirse que hay una relación entre el desarrollo y/o la patogenia de la diabetes y la disbiosis intestinal presente en los pacientes estudiados. Cabe destacar que la mayoría de los estudios presentados coinciden en la disminución de las bacterias productoras de butirato, de la clase *Clostridia* y filo *Firmicutes*, y aumento del filo *Bacteroidetes*.

La disminución de la microbiota productora de butirato podría causar una disminución de las incretinas (GLP-1 y GLP-2) y PYY, de modo que disminuye la secreción de insulina postprandial (aumentando la glucemia postprandial), disminuye la captación de glucosa por parte de los tejidos, por lo que, a largo plazo, induce una resistencia periférica a la insulina e hiperglucemia. Un aumento de bacterias productoras de butirato podría mejorar los signos de la diabetes tipo 2.

Las bacterias patógenas aumentadas en número, junto con las bacterias gram negativas también aumentadas (*Proteobacteria* y *Bacteroidetes*) puede inducir una respuesta inmune, que desencadena en la liberación de bajos niveles de mediadores proinflamatorios, que junto con la actividad de LPS de gram negativos vehiculizados en la sangre, crearía un estado de bajos niveles de inflamación, como indica Cani en sus publicaciones, afectando a un aumento progresivo en el tiempo de resistencia a la insulina.

El tratamiento de la diabetes tipo 2 mediante la administración de bacterias comensales no ha demostrado resultados concluyentes, esto se puede deber a que se han aplicado diferentes especies en los ensayos y la duración de los mismos no son iguales, dando resultados dispares. Sin embargo, la mejora de la hiperglucemia basal o la disminución de la tolerancia a la insulina periférica se han demostrado, en mayor o menor medida en estos ensayos.

La aplicación de las bacterias modificadas para el tratamiento de la diabetes tipo 1, y en menor medida, para la diabetes tipo 2, según el ensayo realizado por John C. March, da resultados muy prometedores en modelos animales. Podría ser un tratamiento potencial no invasivo para esta patología, pero se necesita un mayor estudio.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Microbiología y Parasitología Médicas. G. Prats Ed. Panamericana Ed. 2012.
2. Dra. Gloria Royo García. [Http://blogmicrobiologiahgue.wordpress.com/](http://blogmicrobiologiahgue.wordpress.com/) (última visita en diciembre de 2016).
3. Y. Sanz, M.C. Collado, M. Haros, J. Dalmau. Funciones metabólicas y nutricionales de la microbiota intestinal y su modulación a través de la dieta: probióticos y prebióticos. *ACTA PEDIATRICA ESPAÑOLA*, Vol. 62, Nº 11, (2004).
4. Atlas de la Diabetes de la Federación Internacional de Diabetes, IDF (7ª edición) 2015.
5. Davis SN: Insulina, hipoglucemiantes orales y propiedades farmacológicas del páncreas endocrino. In: Brunton LL, Lazo JS, Parker KL y cols. *Goodman y Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 11th ed. McGraw-Hill (2006). pp. 1613-1645.
6. Guzmán JN, Madrigal BE: Revisión de las características clínicas, metabólicas y genéticas de la diabetes mellitus. *Bioquímica*. (2003); 14-23.
7. María José López García, Marta Cárdenas Povedano, Antonia Osuna Molina. Manual de laboratorio de microbiología para el diagnóstico de infecciones gastrointestinales. OmniaScience, (2012).
8. Microbiología y Parasitología Médicas. G. Prats Ed. Panamericana Ed. 2012.
9. <http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%2013.pdf>. Autora: María Eugenia Torres.
10. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 2011 May 12;473(7346):174-80.
11. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gen catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* (2010); 464.
12. DiBaise JK, Zhang H, Crowell MD, Krajmalnik-Brown R, Decker GA, Rittmann BE, et al. Gut microbiota and its possible relationship with obesity. *Mayo Clin Proc* (2008).
13. Musso G, Gambino R, Cassader R. Obesity, Diabetes, and Gut Microbiota. The hygiene hypothesis expanded? *Diab Care* (2010);2277–2284.
14. Hagiage M. 1994. *La Flore Intestinale; de l'équilibre au déséquilibre*. Vigot, Francia.
15. Cummings JH. 1997. *The large Intestine in Nutrition and Disease*. Danone Chair Monograph, Instituto Danone, Bruselas
16. Holzapfel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U, Huis in't Veld JH. 1998. Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol* 41: 85-101.
17. Salminen S, Von Wright A, Morelli L, Marteau P, Brassart D, de Vos WM, Fondén R, Saxelin M, Collins K., Mogensen G, Birkeland SE, Sandholm TM. 1998b. Demonstration of safety of probiotics-a review. *Int J Food Microbiol* 44: 93-106.
18. Ley R, Turnbaugh P, Klein S, Gordon J. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* (2006); 1022-1023.
19. Devaraj S, Hemarajata P, Versalovic J. La microbiota intestinal humana y el metabolismo corporal: Implicaciones con la obesidad y la diabetes. *Acta Bioquím Clín Latin* (2013): 421-434.

20. Inan MS, Rasoulpour RJ, Yin L, Hubbard A, Rosenberg DW y Giardina C: The luminal short-chain fatty acid butyrate modulates NF-kB activity in human colonic epithelial cell line. *Gastroenterology*, 2000; 118:724-734.
21. Fariás M, Silva C, Rozowski J. Microbiota intestinal: rol en obesidad. *Rev Chil Nutr* 2011; 38: 228-233.
22. *Diabetes Metab J*. 2015 Jun;39:198-203. Copyright © 2015 Korean Diabetes Association.
23. M.E. Icaza-Chávez “Gut microbiota in health and disease” 2013.
24. Juan Manuel Sánchez Calvo. Tesis doctoral: análisis metagenómico de la microbiota intestinal en pacientes con colitis ulcerosa. 2012.
25. Consuelo Rubio-Guerri, Marina Vicente-Rubiano, Jose Manuel Sánchez-Vizcaíno. Metagenómica, la técnica que “descubre” nuevos virus. [http://www.colvema.org/WV\\_descargas/metagenweb-15022012152421.pdf](http://www.colvema.org/WV_descargas/metagenweb-15022012152421.pdf)
26. Nadja Larsen, Finn K. Vogensen, Frans W. J. van den Berg, Dennis Sandris Nielsen, Anne Sofie Andreasen, Bente K. Pedersen, Waleed Abu Al-Soud, Søren J. Sørensen, Lars H. Hansen, Mogens Jakobsen. “Gut Microbiota in Human Adults with Type 2 Diabetes Differs from Non-Diabetic Adults” (2010).
27. Karlson F, Tremaroli V, Nookaew I, Bergström G, Behre C, Fagerberg B, Nielsen J, Bäckhed F. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature* (2013).
28. Gotteland M. El papel de la microbiota intestinal en el desarrollo de la obesidad y de la diabetes de tipo-2. *Rev Chil Endocrinol Diabetes* (2013).
29. Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, Liang S, Zhang W, Guan Y, Shen D et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* (2012).
30. Junko Sato, Akio Kanazawa, Fuki Ikeda, Tomoaki Yoshihara, Hiromasa Goto, Hiroko Abe, Koji Komiya, Minako Kawaguchi, Tomoaki Shimizu, Takeshi Ogihara, Yoshifumi Tamura, Yuko Sakurai, Risako Yamamoto, Tomoya Mita, et al. Gut Dysbiosis and Detection of “Live Gut Bacteria” in Blood of Japanese Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* (2014).
31. Lilit Egshatyan, Daria Kashtanova, Anna Popenko, Olga Tkacheva, Alexander Tyakht, Dmitry Alexeev, Natalia Karamnova, Elena Kostyukova, Vladislav Babenko, Maria Vakhitova and Sergey Boytsov. Gut microbiota and diet in patients with different glucose tolerance. *Endocr Connect* (2016).
32. Isabel Leiva Gea. Caracterización de la microbiota fecal en pacientes con Diabetes Mellitus tipo 1 y su relación con niveles de glucemia y estrés oxidativo (2008).
33. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxaemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* (2007);1761-1772.
34. Suzuki A, Nakauchi H, Taniguchi H. Glucagon-like peptide 1 (1-37) converts intestinal epithelial cells into insulin-producing cells. *Proc Natl Acad Sci USA* (2003)
35. Franklin F. Duan, Joy H. Liu, and John C. March. Engineered Commensal Bacteria Reprogram Intestinal Cells Into Glucose-Responsive Insulin-Secreting Cells for the Treatment of Diabetes. *Diabetes* (2015).
36. Simon MC, Strassburger K, Nowotny B, Kolb H, Nowotny P, Burkart V, Zivehe F, et al. Intake of *Lactobacillus reuteri* improves incretin and insulin secretion in glucose-tolerant humans: a proof of concept. *Diabetes Care* (2015).
37. Anne Sofie Andreasen, Nadja Larsen, Theis Pedersen-Skovsgaard, Ronan M. G. Berg, Kirsten Møller, Kira Dynnes Svendsen, Mogens Jakobsen and Bente Klarlund Pedersen. Effects of *Lactobacillus acidophilus* NCFM on insulin sensitivity and the systemic inflammatory response in human subjects. *British Journal of Nutrition* (2010).

38. Vrieze A, Van Nood E, Holleman F, Salojärvi J, Kootte RS, Bartelsman JF, Dallinga-Thie GM et al. Transfer of Intestinal Microbiota From Lean Donors Increases Insulin Sensitivity in Individuals With Metabolic Syndrome. *Gastroenterology* (2012).
39. Hanie S. Ejtahed, Javad Mohtadi-Nia, Aziz Homayouni-Rad, Mitra Niafar, Mohammad Asghari-Jafarabadi, Vahid Mofid. Probiotic yogurt improves antioxidant status in type 2 diabetic patients. *Nutrition* (2012).
40. Yadav H, Jain S, Sinha PR. Antidiabetic effect of probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in high fructose fed rats. *Nutrition* (2007).
41. Yuting Ruan, Jia Sun, Jie He, Fangyao Chen, Rongping Chen, Hong Chen. Effect of Probiotics on Glycemic Control: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized, Controlled Trials. *PLoS One*. (2015).