



FACULTAD DE FARMACIA  
ESCUELA DE NUTRICIÓN Y DIETÉTICA

ESTUDIO METAGENÓMICO PARA EVALUAR EL  
EFECTO DEL CONSUMO DE KÉFIR SOBRE LA  
MICROBIOTA INTESTINAL EN ADULTOS CON  
DIABETES MELLITUS TIPO 2 TRATADOS CON  
METFORMINA

Tesis para optar al Grado Académico de Licenciado en Nutrición y Dietética y al Título de  
Nutricionista

KAROLL GONZÁLEZ PIZARRO

Director de Tesis: Dr. Mg. Cs. Alejandro Dinamarca Tapia

Co-director de Tesis: Dra. Claudia Ibacache Quiroga

2016

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	4
<b>ABSTRACT</b> .....	6
<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	8
Alimentos funcionales probióticos .....	8
Kéfir como alimento probiótico funcional .....	9
Metagenómica aplicada al estudio de la estructura y funcionalidad del kéfir .....	10
Beneficios atribuibles al consumo de kéfir .....	14
Enfermedades crónicas no transmisibles: fisiopatología y epidemiología de la diabetes tipo 2 .....	16
Microbiota intestinal en la patogénesis de la diabetes tipo 2.....	18
Microbiota intestinal en la diabetes tipo 2 y su potencial modulación por metformina .....	20
Kéfir y su potencial uso terapéutico en la reconstitución de la microbiota intestinal en la diabetes tipo 2 .....	22
Kéfir y control metabólico en la diabetes tipo 2 .....	23
Kéfir y mejoras en las alteraciones en el perfil lipídico .....	23
<b>HIPÓTESIS</b> .....	25
<b>OBJETIVOS</b> .....	26
Objetivo general .....	26
Objetivos específicos.....	26
<b>METODOLOGÍA</b> .....	27
I. Producción estandarizada de un alimento probiótico funcional de tipo Kéfir .....	28
Control de calidad: análisis microbiológico y cuantificación de células viables por dosis entregada .....	28
II. Intervención nutricional para incorporar kéfir en la dieta .....	30
Tipo de estudio .....	30
Caracterización de la población estudiada.....	30
Pesquisa de pacientes .....	30
Selección del tamaño de la muestra .....	30
Criterios de inclusión y exclusión .....	31
Definición de variables y covariables del estudio .....	32

Recolección de datos, bioética y regulaciones .....	32
Diseño experimental .....	33
Medición de parámetros.....	34
III. Estudio metagenómico de la microbiota intestinal de personas sometidas a una dieta con kéfir .....	37
Tipo de estudio .....	37
Identificación de la población utilizada .....	37
Recolección de muestras fecales.....	37
Extracción de ADN a partir de muestras fecales .....	38
Evaluación del rendimiento y calidad y secuenciación del ADN .....	38
Análisis bioinformático del estudio metagenómico.....	39
IV. Análisis estadístico del estudio nutricional.....	40
<b>RESULTADOS</b> .....	41
I. Características generales de la muestra: demografía y variables alimentarias .....	42
II. Estudio metagenómico de la microbiota intestinal de pacientes con diabetes tipo 2 en tratamiento con metformina .....	46
III. Parámetros Metabólicos: mediciones de glucosa en ayunas y perfil lipídico .....	63
IV. Tolerancia digestiva y frecuencia evacuatoria .....	66
<b>DISCUSIÓN</b> .....	69
I. Características generales de la muestra estudiada: demografía, antropometría y alimentación .....	69
II. Estructura de la microbiota intestinal de personas con diabetes tipo 2 que consumen kéfir, mediante análisis metagenómico de ARNs 16S .....	70
III. Parámetros metabólicos de control en pacientes con diabetes tipo 2 .....	75
IV. Consumo de kéfir y su efecto en la tolerancia digestiva y frecuencia evacuatoria .....	79
<b>CONCLUSIONES</b> .....	81
<b>REFERENCIAS</b> .....	83
<b>ANEXOS</b> .....	92

## RESUMEN

**Introducción:** Cambios en la microbiota intestinal se asocian a patologías metabólicas como diabetes mellitus tipo 2. Probióticos, como el kéfir, podrían restituir la composición de la microbiota intestinal e introducir funciones beneficiosas para las comunidades microbianas intestinales, ayudando de esta forma a mantener un buen control metabólico. El presente estudio busca determinar el efecto del consumo de kéfir en la composición de la microbiota intestinal y en el control metabólico en sujetos con diabetes mellitus tipo 2 en tratamiento con metformina.

**Metodología:** Ensayo clínico controlado, ramdonizado y de ciego simple realizado en 20 pacientes con DM2 los cuales fueron asignados a dos grupos: uno que recibió 150 g diarios del probiótico kéfir y un grupo control que recibió la misma cantidad de un yogurt comercial convencional durante ocho semanas; se midieron parámetros metabólicos antes y después de la intervención. Se realizó un estudio metagenómico de ADNr 16S a cinco de los pacientes del grupo kéfir, donde se extrajo ADN metagenómico a partir de muestras fecales tomadas antes de la intervención y luego de dos semanas de tratamiento, el cual fue secuenciado y analizado utilizando la plataforma Illumina Miseq y el pipeline informático QIIME™.

**Resultados:** Dos semanas de tratamiento con el probiótico aumentó la abundancia relativa de los phylums Firmicutes y Actinobacteria y los géneros productores de butirato *Coprococcus* y *Lachnospira*, además de disminuir Bacteroidetes y Proteobacteria. El tratamiento con kéfir por ocho semanas disminuyó significativamente los triglicéridos plasmáticos en el grupo tratado con kéfir ( $p=0,04$ ) mientras que la glicemia y el colesterol total no demostraron diferencias significativas al finalizar la intervención ( $p>0,05$ ). El kéfir demostró, además, mejorar hinchazón ( $p=0,02$ ), acidez ( $p=0,04$ ), gases ( $p=0,02$ ), frecuencia

evacuatoria ( $p < 0,001$ ) y dificultad evacuatoria ( $p = 0,02$ ) de los pacientes tratados al finalizar el estudio.

**Conclusión:** El consumo de kéfir sería una buena terapia para modular la microbiota intestinal en este tipo de pacientes de forma beneficiosa, llevando a un enterotipo asociado a sujetos sanos, además de ayudar al control y mantención de los triglicéridos plasmáticos y a mantener una buena salud intestinal.

## ABSTRACT

**Introduction:** Changes in the intestinal microbiota have been associated with type two diabetes. Probiotics, like kéfir, might help restore composition of the gut microbiota and introduce beneficial functions to the microbial intestinal communities, helping maintain metabolic control in these patients. This study aims to determine the effect of kéfir on the composition of the gut microbiota and metabolic control in patients with type two diabetes in treatment with metformin.

**Materials and Methods:** Randomized single-blind clinical trial was conducted in 20 patients with T2D assigned into two groups: one that received 150 g of kéfir and a control group that was given a conventional yogurt for eight weeks; metabolic parameters were measured at the baseline and end of the intervention. A DNAr 16s metagenomic study was conducted in five of the patients of the kefir group, where metagenomic DNA was extracted from fecal samples that were taken before and after two weeks of kéfir treatment, DNA that was sequenced and analysed using Illumina Miseq platform and QIIME™ pipeline.

**Results:** Two weeks of kefir treatment increased the relative amounts of phyla Firmicutes and Actinobacteria and butyrate producing genus *Coprococcus* and *Lachnospira*, in addition to decreasing Bacteroidetes and Proteobacteria. Treatment with de kefir for eight weeks significantly decreased serum triglyceride in the probiotic group ( $p=0,04$ ) whereas glycemia and total cholesterol did not show significant differences within and between groups at the end of the intervention ( $p>0,05$ ). Kefir also showed improvement in bloating ( $p=0,02$ ), heartburn ( $0,04$ ), flatulence ( $0,02$ ), and evacuation frequency ( $p>0,001$ ) and difficulty ( $p=0,02$ ) at the end of the study.

**Conclusion:** Kefir consumption can be useful as a therapy to modulate the gut microbiota in this type of patients, leading to a enterotype that is associated with heathy subject, besides helping to the control of serum triglyceride and mantain good intestinal health.

## MARCO TEÓRICO

### Alimentos funcionales probióticos

El concepto probiótico fue introducido por el microbiólogo Elie Metchnikoff el cual postuló que el consumo de grandes cantidades de bacterias del tipo *Lactobacillus* producía efectos beneficiosos para la salud humana (1).

El término probiótico hace referencia a microorganismos que al ser incorporados en la dieta han demostrado ejercer beneficios para la salud humana y animal (2). La FAO/OMS establece que los probióticos son “microorganismos vivos que, cuando se consumen en cantidades apropiadas, confieren al hospedero efectos saludables” (3). Es importante mencionar que los alimentos que contienen microorganismos probióticos pueden ser considerados como alimentos funcionales dado que contienen componentes que ejercen efectos beneficiosos para la salud que van más allá de la nutrición (4), al modular una o varias funciones del organismo contribuyendo a reducir el riesgo de enfermedades (5).

Para ser considerados probióticos, los microorganismos deben cumplir con algunas propiedades relacionadas con la salud humana (6):

- Habitar naturalmente la flora intestinal.
- Ser viables, es decir, permanecer vivos tanto en el alimento como en el intestino.
- Sobrevivir al tránsito del tracto gastrointestinal, tolerando ácidos y sales biliares.
- Adherirse a la superficie de las células epiteliales de la mucosa y colonizar el intestino humano.

Los géneros de bacterias *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son los más utilizados como probióticos (7), seguido por la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y algunas especies de *Escherichia coli* y *Bacillus* (3).

La utilización de probióticos se asocia a diversos efectos en la salud, dentro de los que se encuentran: trastornos relacionados con el aparato digestivo (diarreas causadas por bacterias o virus, infección por *Helicobacter pylori*, enfermedades inflamatorias y síndromes intestinales, cáncer y estreñimiento), trastornos del aparato urogenital, del aparato respiratorio y del aparato inmune (4).

En Chile, los probióticos se comercializan como productos farmacéuticos, alimentos del tipo bebidas lácteas y fórmulas y alimentos infantiles (8). Por otro lado, una fuente de probióticos lo constituyen los preparados caseros transmitidos por la cultura o folclore popular como por ejemplo el “yogurt de pajaritos” o kéfir. Este alimento es un preparado que utiliza leche y un inóculo que corresponde a un consorcio microbiano diverso y metabólicamente activo. La forma de preparación y los ingredientes se transmiten de generación en generación.

### **Kéfir como alimento probiótico funcional**

El Kéfir es un alimento lácteo fermentado originario de las montañas del Cáucaso Ruso y ha sido parte de la dieta de diversas culturas por miles de años. Se cree que la palabra kéfir proviene del turco “*keyif*” que significa “sentirse bien” o “agradable sensación”, lo que hace referencia al sentido general de salud y bienestar que brinda el alimento al ser consumido (9). Al kéfir se le considera un alimento funcional probiótico ya que se trata de un producto del tipo fermento lácteo que contiene cepas probióticas.

El kéfir es un consorcio de microorganismos, es decir, es una comunidad ecológica estructurada por una gran diversidad de bacterias ácido lácticas, bacterias ácido acéticas y levaduras (10). En cuanto a las características organolépticas del kéfir, se trata de una bebida blanca viscosa, carbonatada, con trazas de alcoholes y un pH 4,5. El inóculo de inicio para generar el fermento lácteo tiene una estructura macroscópica con forma de gránulos blanco amarillentos de 1 a 3 cm de longitud, lobuladas, de forma irregular y con una textura viscosa pero firme (10).

### **Metagenómica aplicada al estudio de la estructura y funcionalidad del kéfir**

Estudiar la composición microbiana del kéfir resulta de gran utilidad para comprender sus beneficios. La metagenómica es una herramienta molecular que junto a la bioinformática permite estudiar a los microorganismos que forman parte de un ecosistema microbiano, permitiendo analizar la estructura y función del ecosistema como un todo y no sólo a nivel de organismo (11). El objetivo de la metagenómica es estudiar una muestra compleja de ADN o ARN metagenómico obtenida desde un ecosistema en particular, sin la necesidad de pasar por técnicas de aislamiento y cultivo en el laboratorio (12). De esta forma es posible identificar a los organismos que forman parte de la comunidad y también es posible conocer todos los genes presentes en dicho ecosistema.

Para determinar los diferentes microorganismos existentes en una comunidad, la metagenómica se basa en la secuenciación y análisis del ARNr 16S de cada una de las especies existentes en la muestra. En esta técnica permite identificar la diversidad microbiana de una población en términos de abundancia relativa y riqueza de phylums, géneros o especies (12).

Por otro lado, los estudios metagenómicos completos no sólo se enfocan en el ARNr 16S, sino que secuencian todo el ADN presente en una muestra obtenida desde una comunidad microbiana específica, con lo que es posible acceder a la funcionalidad desde un punto de vista genómico (12).

Los tipos de microorganismos que forman parte del kéfir han sido estudiados por diversos métodos, siendo la metagenómica una herramienta de gran utilidad dado que permite estudiar la diversidad en términos de proporciones relativas. Nalbantoglu et al. en el año 2014 analizó metagenómicamente la comunidad microbiana de dos tipos de kéfir e identificó dos familias: *Lactobacillaceae* y *Enterococcaceae*, siendo la familia *Lactobacillaceae* la más abundante, representada por los géneros bacterianos de kéfir *Lactobacillus* con un 98% aproximadamente y *Pediococcus* con menos del 1%; dentro de los *Lactobacillus*, quien presentó mayor abundancia fue *L. kefiranofaciens* (13). Por otro lado, Gao et al., en 2013, analizó la diversidad bacteriana en gránulos de kéfir del Tíbet a través de análisis metagenómico, y encontró una mayor cantidad de *Lactobacillus* y *Lactococcus* seguido de *Acetobacter* (14). La secuenciación metagenómica de ARNr 16S realizada por Korsak et al. a distintos tipos de kéfir reveló la presencia de 20 especies bacterianas principales, con predominio de *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactococcus lactis*, *Gluconobacter frateurii*, *Lactobacillus kefiri*, *Acetobacter orientalis*, y *Acetobacter lovaniensis* (15). Recientemente Zamberi et al. determinó la composición microbiana de kéfir procedente de Malasia y encontró que el género bacteriano predominante correspondía a *Lactobacillus*, siendo *L. kefiranofaciens* y *L. kefiri* las especies dominantes de los gránulos de kéfir (16).

De esta forma, tomando como referencia los estudios metagenómicos realizados a diversos gránulos a lo largo del mundo, la microbiota del kéfir se aprecia en la Tabla 1.

**Tabla 1:** Microbiota de los gránulos de kéfir

<b>Microrganismo</b>	<b>Referencia</b>
1 <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>	(16)
2 <i>Lactobacillus kefiri</i>	(16)
3 <i>Lactobacillus ultunensis</i>	(16)
4 <i>Lactobacillus apis</i>	(16)
5 <i>Lactobacillus taiwanensis</i>	(16)
6 <i>Lactobacillus gigeriorum</i>	(16)
7 <i>Lactobacillus crispatus</i>	(16)
8 <i>Lactobacillus faeni</i>	(16)
9 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	(16)
10 <i>Lactobacillus parakefiri</i>	(16)
11 <i>Lactobacillus thailandensis</i>	(16)
12 <i>Lactobacillus senmaizukei</i>	(16)
13 <i>Lactobacillus tuceti</i>	(16)
14 <i>Lactobacillus casei</i>	(16)
15 <i>Lactobacillus helveticus</i>	(16)
16 <i>Lactobacillus nagelii</i>	(16)
17 <i>Lactobacillus buchneri</i>	(16)
18 <i>Lactobacillus hilgardi</i>	(16)
19 <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	(16)
20 <i>Lactobacillus animalis</i>	(16)
21 <i>Lactobacillus dulbrueckii</i>	(16)
22 <i>Lactobacillus lactis</i>	(16)
23 <i>Lactobacillus amylovorus</i>	(13)
24 <i>Lactobacillus brevis</i>	(13)
25 <i>Lactobacillus plantarum</i>	(13)
26 <i>Lactobacillus pentosus</i>	(13)
27 <i>Lactobacillus salivarius</i>	(13)
28 <i>Lactobacillus gasseri</i>	(13)
29 <i>Lactobacillus rossiae</i>	(13)
30 <i>Lactobacillus sakei</i>	(13)
31 <i>Lactobacillus reuteri</i>	(13)
32 <i>Lactobacillus gallinarum</i>	(13)
33 <i>Lactobacillus paracasei</i>	(13)
34 <i>Lactobacillus sunkii</i>	(13)
35 <i>Lactobacillus johnsonii</i>	(13)
36 <i>Lactobacillus crispatus</i>	(13)
37 <i>Lactobacillus otakiensis</i>	(13)
38 <i>Lactobacillus kalixensis</i>	(13)
39 <i>Lactobacillus rapi</i>	(13)
40 <i>Lactobacillus parafarraginis</i>	(13)
41 <i>Lactobacillus parabuchneri</i>	(13)

42 <i>Pediococcus lolii</i>	(13)
43 <i>Pediococcus pentosaceus</i>	(13)
44 <i>Pediococcus halophilus</i>	(13)
45 <i>Pediococcus claussenii</i>	(13)
46 <i>Pediococcus damnosus</i>	(13)
47 <i>Pediococcus argentinicus</i>	(16)
48 <i>Pediococcus cellicola</i>	(16)
49 <i>Lactobacillus diolivorans</i>	(13)
50 <i>Tetragenococcus halophilus</i>	(13)
51 <i>Lactococcus garvieae</i>	(13)
52 <i>Oenococcus oeni</i>	(13)
53 <i>Phylobacteriummyrsinacearum</i>	(16)
54 <i>Rhodococcuserythropolis</i>	(16)
55 <i>Acinetobactertjernbergiae</i>	(16)
56 <i>Mesoplasmaentomophilum</i>	(16)
57 <i>Rhodococcus qingshengii</i>	(16)
58 <i>Cohnella soli</i>	(16)
59 <i>Staphylococcus cohnii</i>	(16)
60 <i>Rothiaamarae</i>	(16)
61 <i>Streptococcus thermophilus</i>	(16)
62 <i>Acinetobacter johnsonii</i>	(16)
63 <i>Staphylococcus kloosii</i>	(16)
64 <i>Enterobacter amnigenus</i>	(15)
65 <i>Enterobacter</i> sp. LH-CAB10	(15)
66 <i>Acetobacter lovaniensis</i>	(15)
67 <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	(15)
68 <i>Gluconobacter frateurii/cerinus</i>	(15)
79 <i>Acetobacter orientalis</i>	(15)
70 <i>Lactococcus lactis</i>	(15)

\* Los microorganismos no se presentan en orden ascendente ni descendente, sólo se evidencia su presencia en el consorcio metabólico.

## **Beneficios atribuibles al consumo de kéfir**

Los efectos beneficiosos asociados al kéfir han sido ampliamente estudiados y entre ellos destacan aquellos relacionados a los siguientes trastornos:

- *Malabsorción de la lactosa:* El kéfir tiene la propiedad de disminuir la cantidad de lactosa presente en la leche ya que degrada a este disacárido responsable de la intolerancia a la lactosa, utilizándolo como fuente de carbono. Bacterias del género *Lactobacillus* presentes en el kéfir poseen enzimas lactosidasas del tipo  $\beta$ -galactosidasa las que se mantienen activas una vez consumido el fermentado lácteo e hidrolizan la lactosa en sus monómeros glucosa o galactosa al escindir el enlace  $\beta$ -1,4 del azúcar (17). De esta forma, el kéfir es un lácteo libre tanto de glucosa como lactosa, ya que las bacterias presentes en el probiótico utilizan primero la glucosa como fuente de carbono y luego, la lactosa (18, 19). Asimismo, el consumo de microorganismos productores de la enzima lactamasa es de gran importancia e interés debido a que a nivel intestinal esta enzima podría reducir los niveles de lactosa.
- *Efecto antitumoral (prevención de cáncer):* Estudios *in vitro* en células de adenocarcinoma de colon (20), demuestran que el kéfir exhibe un efecto antiproliferativo sobre células Caco-2 y HT29, tiene la capacidad de inducir la detención del ciclo celular en la fase G1, induce apoptosis y disminuye la expresión de TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ 1 en células HT-29. Por otro lado, estudios *in vivo* (21) con roedores portadores de tumores demuestran que el kéfir inhibe el crecimiento tumoral e induce la lisis de células tumorales apoptóticas.

- *Efecto antibacteriano:* El kéfir demostró efecto antibacteriano frente a organismos tales como *Streptococcus pyogenes*, además de tener un efecto protector sobre el tejido conectivo de la piel al mejorar la cicatrización de heridas (22). Un péptido penetrante de células aislado a partir de kéfir demostró actividad antimicrobiana sobre bacterias Gram positivas, bacterias Gram negativas y hongos (23).
- *Estimulación de la inmunidad gastrointestinal:* Un estudio en roedores demostró que el kéfir natural y el kéfir pasteurizado fueron capaces de modular el sistema inmune de la mucosa de una manera dosis dependiente, sugiriendo que una respuesta Th1 fue controlada por citoquinas Th2 inducidas por la alimentación con kéfir (24).
- *Prevención de la osteoporosis:* Los gránulos de kéfir degradan las proteínas de la leche en varios péptidos con efectos promotores de la salud, incluyendo bioactividades potenciadoras de la absorción de calcio, lo que fue comprobado en un estudio con ratas ovariectomizadas y con osteoporosis postmenopausia donde el consumo de kéfir aumentó la densidad mineral ósea trabecular, el volumen óseo y el grosor trabecular, demostrando que el efecto protector del kéfir en este modelo de roedores puede ocurrir a través del aumento de la captación de calcio intracelular a través del canal de calcio TRPV6 (25).

Por otra parte, el consumo de kéfir y probióticos en general se ha relacionado a prevención y mejora en el control de enfermedades crónicas no transmisibles como hipertensión y diabetes (26, 27), además de alteraciones en el perfil lipídico (28).

## **Enfermedades crónicas no transmisibles: fisiopatología y epidemiología de la diabetes tipo 2**

Las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) son un problema de salud pública de gran relevancia a nivel mundial y cuya incidencia ha incrementado de manera significativa durante la última década (29). Estas patologías crónicas evolucionan, por lo general, lentamente constituyendo una carga social y económica tanto para las personas que las padecen como para los sistemas nacionales de salud (30).

Dentro de las ECNT se encuentran patologías tales como enfermedades cardiovasculares, obesidad, resistencia a la insulina y diabetes, siendo esta última de considerable importancia ya que se estima que del total de muertes por ECNT en el año 2012, 1,5 millones fueron a causa directa de diabetes mellitus (31) y, según las previsiones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la diabetes será la séptima causa de muerte para el 2030 (32).

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es un trastorno metabólico crónico, no transmisible, multifactorial que se caracteriza por un aumento de los niveles de glucosa en sangre por sobre el nivel normal (70 – 100 mg/dl en ayunas), implicando una hiperglicemia crónica, resultado de la disminución de la secreción de insulina o de la sensibilidad de los tejidos a la misma. En cuanto al desarrollo de la patología es posible observar tres fases determinadas (33):

- Una primera fase caracterizada por un estado de resistencia a la insulina (IR) que lleva a un aumento en la síntesis y secreción de insulina, resultando en un hiperinsulinismo compensatorio que es capaz de mantener la homeostasis metabólica.

- Una segunda fase en donde se produce un quiebre en el equilibrio entre la RI y la secreción de insulina, llevando a una sobreproducción de la hormona que no es capaz de controlar la homeostasis de glucosa y da paso a una hiperglicemia postprandial.
- Una tercera fase en donde declina en funcionamiento de las células beta pancreáticas, disminuyendo la síntesis de insulina y dando paso a la hiperglicemia de ayuno, consolidando la totalidad del fenotipo de DM2.

A nivel nacional la prevalencia de DM2 ha ido en aumento, pasando de un 6,3% en el año 2003 a un 9,4% en 2010 y encontrándose una prevalencia de 9,7% en la región de Valparaíso, valor que, si bien no presenta importantes diferencias con la realidad nacional, la pone como la tercera región con mayor prevalencia de DM2 en el país (34). Asimismo, el informe “WHO Diabetes Country Profiles 2016” de la OMS indica que la prevalencia actual de diabetes mellitus en Chile es de un 11,4%, correspondiendo el 10,7% a hombres y el 12,0% a mujeres. Dentro de este informe también se declara que la prevalencia de diabetes mellitus ha ido en aumento con el pasar de los años, y que las mujeres siempre han presentado valores más altos que los hombres (35).

Padecer diabetes se asocia a una reducción de la calidad de vida, debido a las complicaciones médicas y la disminución de las expectativas de vida. La elevación de la glicemia por sobre los niveles normales puede producir daños a nivel microvascular (retinopatía, nefropatía y neuropatía) y macrovascular (arteriopatía de arterias carótidas y cerebrales, arteriopatía de las coronarias y arteriopatía de extremidades inferiores) (36).

Entre los factores de riesgo para el desarrollo de DM2 se encuentran la predisponibilidad genética, edad, malnutrición por exceso y estilos de vida poco saludables.

Actualmente la evidencia sugiere que la microbiota intestinal juega un rol importante en su patogénesis, contribuyendo a su desarrollo.

## **Microbiota intestinal en la patogénesis de la diabetes tipo 2**

La microbiota intestinal (MI) corresponde a un consorcio de bacterias presentes en el intestino en una relación de simbiosis. Su composición varía a través del tubo digestivo, albergando alrededor de  $10^{14}$  géneros bacterianos, levaduras, virus y fagos, principalmente en el colon (37). El desarrollo de la microbiota comienza tras el nacimiento y está muy influenciada por factores externos como las condiciones de nacimiento, la dieta, el entorno y el uso de antibióticos.

Los principales phylum bacterianos encontrados en la composición de la MI son Firmicutes (en su mayoría Gram positivas), Bacteroidetes (mayoritariamente Gram negativas) y Proteobacterias, que representan alrededor del 90% de las bacterias totales presentes en la MI (38). La microbiota posee funciones protectoras en la regulación del metabolismo y está involucrada activamente en el metabolismo energético, de la glucosa y de los lípidos.

En la actualidad se sabe que diversas enfermedades metabólicas como obesidad y diabetes mellitus presentan disbiosis, un estado caracterizado por alteraciones en la composición de la microbiota, cambios en la actividad metabólica bacteriana y/o cambios en la distribución local de comunidades bacterianas (39).

En la diabetes mellitus tipo 2 se presentan alteraciones en las proporciones de Firmicutes, Bacteroidetes y Proteobacterias. Los sujetos con DM2 tienden a tener menor cantidad de *Bifidobacterium* spp. y *Faecalibacterium prausnitzii*, ambas bacterias Gram

positivas con propiedades antiinflamatorias, además de un aumento de varios patógenos oportunistas y algunas bacterias Gram negativas productoras de endotoxinas (40). Estos cambios en las proporciones de bacterias presentes en la microbiota intestinal de diabéticos tipo 2, conllevan a una disminución en la cantidad de bacterias productoras de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), los cuales son formados en el colon por la fermentación de almidones resistentes y fibra dietética presentes en la dieta (39). Alrededor del 90 – 95% de los ácidos grasos presentes en el colon corresponden a acetato (60%), propionato (25%) y butirato (15%) (41). Estos AGCC tienen un rol importante en el metabolismo energético dado que aportan alrededor del 5 – 10% de los requerimientos energéticos humanos. Un incremento en la concentración de AGCC, particularmente propionato y butirato, se asocia a efectos metabólicos positivos como disminución en la ingesta alimenticia, estabilización de la glucosa plasmática y niveles más bajos de colesterol (42). Por su parte, el butirato participa en la regulación del transporte transepitelial y mejora la función de la barrera intestinal (43).

Producto de las alteraciones en la microbiota intestinal y la consiguiente disminución de AGCC como butirato, ocurre un aumento en la permeabilidad intestinal y en la respuesta inmune de la mucosa, lo que se asocia a una reducción en la expresión de proteínas de unión estrecha y contribuye a la aparición de endotoxemia metabólica al favorecer la translocación de lipopolisacáridos (LPS) bacterianos presentes en las membranas de bacterias Gram negativas. Estos LPS, al unirse al complejo CD14/receptor de tipo Toll 4 (TLR4) en la superficie de las células inmunes innatas (44), activan la cascada inflamatoria en donde citoquinas proinflamatorias estimulan vías intracelulares de señalización, siendo las principales: a) el factor nuclear kappa B (NF-kB) el cual promueve la activación de mediadores implicados en la respuesta inflamatoria tales como factor de necrosis tumoral

(TNF- $\alpha$ ), e interleuquina 6 (IL-6) (45), causantes de la inflamación crónica característica de la DM2 y, b) la vía de las MAPK/ERK la cual suprime la expresión de los receptores de insulina, IRS-1 e IRS-2, interfiriendo con la regulación del metabolismo de la insulina y, por consecuencia, de la glucosa (46, 47).

### **Microbiota intestinal en la diabetes tipo 2 y su potencial modulación por metformina**

La metformina es un fármaco comúnmente utilizado como tratamiento de primera línea para patologías como obesidad y diabetes mellitus tipo 2. Aunque el mecanismo específico que subyace al efecto hipoglicémico de la metformina no se entiende completamente, se sabe que la metformina suprime la producción de glucosa en el hígado, aumenta la sensibilidad a la glucosa y además aumenta la captación de glucosa en músculo hepático y esquelético (48). El intestino por sí mismo contribuye de manera importante al efecto hipoglicemiante de la metformina, lo cual se evidencia en estudios que informan concentraciones mucho más altas de metformina en la mucosa intestinal que en otros tejidos (49). Estos hallazgos plantean la posibilidad de que la metformina pueda tener efectos directos e indirectos sobre la microbiota intestinal, lo que a su vez puede contribuir a sus efectos antidiabéticos.

Estudios metagenómicos recientes demuestran que la microbiota intestinal de un sujeto sano difiere de la de un sujeto con DM2 y que, la microbiota de pacientes con esta patología cambia su composición bacteriana según el tipo de tratamiento (50). De esta forma, estudios realizados tanto en roedores como en humanos evidencian que la metformina es capaz de modular la microbiota intestinal.

El consumo de metformina aumenta la abundancia del phylum bacteriano Verrucomicrobia en ratones alimentados con dieta alta en grasa, además de modular las

alteraciones encontradas previo al tratamiento con el fármaco de *Anaerotruncus*, *Lactococcus*, *Akkermansia*, *Parabacteroides*, *Odoribacter*, *Alistipes*, *Lawsonia*, *Blautia* y *Lactonifactor* (51). También se ha demostrado que, al tratar con metformina en roedores alimentados con dietas altas en grasas, vías metabólicas como la biosíntesis de lipopolisacáridos, el metabolismo de esfingolípidos, el metabolismo de fructosa y manosa, las interconversiones de pentosa y glucuronato, y el metabolismo de propanoato, se enriquecen significativamente (52). Esto sugiere que la modulación de la microbiota intestinal a través de metformina es dependiente de la dieta.

En cuanto a la microbiota humana y su relación con la metformina, es sabido que el aumento de *Lactobacillus* presentado por pacientes diabéticos no tratados con metformina, se elimina al tratar con ésta. Se conoce también que sujetos diabéticos tipo 2 en tratamiento con metformina suelen presentar una disminución en la abundancia de *Intestinibacter* spp. y un aumento de *Escherichia* spp. Por otro lado, pacientes diabéticos sin tratamiento con el fármaco presentan mayor cantidad de genes implicados en la respuesta al estrés oxidativo como catalasa, ribosa y glicina, lo que se correlaciona con la abundancia de alteraciones en la taxonomía bacteriana de este tipo de pacientes (53).

En cuanto a funcionalidad, la abundancia de bacterias que contienen productores de butirato conocidos es menor en sujetos tratados con el fármaco que en controles no diabéticos (54). Sin embargo, el consumo de metformina por diabéticos se asocia a un mayor potencial de producción de butirato y propionato al comparar con sujetos no tratados, lo que puede contribuir al efecto beneficioso de la metformina (55). Asimismo, la metformina podría revertir los cambios asociados a la DM2 dado géneros microbianos como *Subdoligranulum* y *Akkermansia*, tienen abundancia similar a sujetos sanos luego de tratar con el fármaco.

## **Kéfir y su potencial uso terapéutico en la reconstitución de la microbiota intestinal en la diabetes tipo 2**

Alteraciones en la microbiota pueden conducir al desarrollo de enfermedades como obesidad y diabetes, lo que la vuelve uno de los principales objetivos terapéuticos tanto en la prevención como en el tratamiento de este tipo de patologías. Los probióticos, como el kéfir, inhiben el crecimiento de bacterias patógenas al acidificar el lumen intestinal, competir por los nutrientes y producir sustancias antimicrobianas; son capaces además de adherirse a la mucosa intestinal y prevenir la translocación bacteriana (56). Bacterias como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* poseen un efecto antidiabético debido a que poseen la capacidad de provocar cambios en la composición de la microbiota intestinal, contribuyendo a la restitución del equilibrio de ésta.

Las alteraciones de la microbiota intestinal presentadas por pacientes diabéticos conllevan un aumento de bacterias tales como Bacteroidetes y disminución de bacterias productoras de butirato como *Roseburia* y *Faecalibacterium prausnitzii* (Firmicutes) (40). Dentro de las bacterias que conforman el consorcio microbiano conocido como kéfir, se encuentran principalmente *Lactobacillus*, además de otras bacterias ácidos lácticas (Tabla 1), lo que permite aportar y aumentar este tipo de microorganismos en la microbiota intestinal alterada de los diabéticos, modulando su composición y asemejándola a la de sujetos sanos. De esta forma, los microorganismos presentes en el kéfir son capaces de actuar a nivel intestinal, devolviendo el equilibrio de bacterias, aumentando la proporción de bacterias productoras de butirato y mejorando la barrera intestinal, lo que evita la translocación de LPS, disminuye la endotoxemia metabólica, la inflamación crónica observada en la diabetes tipo 2 y, por ende, ayuda a contrarrestar el estado de IR característico de la patología (57).

## **Kéfir y control metabólico en la diabetes tipo 2**

El control metabólico en los pacientes diabéticos se basa principalmente en dos técnicas: el monitoreo de la hemoglobina glicosilada (HbA1c) y la medición de glicemia en sangre capilar o autocontrol (58). Para mantener un adecuado control metabólico existen tres pilares fundamentales: dieta, ejercicio y tratamiento farmacológico. El tratamiento utilizado actualmente en el país, que reúne los tres pilares fundamentales, está descrito en la Guía Clínica de la DM2 (59) y consiste en un algoritmo consensuado entre la Asociación Americana de Diabetes (ADA) y la Asociación Europea de Diabetes (EASD) (60). Sin embargo, en búsqueda de nuevas terapias nutricionales complementarias que ayuden a prevenir o enlentecer el progreso de la enfermedad, se ha considerado el potencial uso de alimentos funcionales probióticos, como el kéfir, en este tipo de pacientes.

Las bacterias ácido lácticas presentes en el kéfir, como *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei*, reducen el estrés oxidativo asociado a la DM2 (61-63), al modular la producción de citoquinas, disminuyendo la interleucina 1 (IL - 1) y TNF- $\alpha$ , aumentando los niveles de glutatión (GSH) y bloqueando la producción del anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) y radical hidroxilo (OH•) (64, 65), el consumo de kéfir podría disminuir los niveles de glucosa en diabetes a través de la reducción de la respuesta inflamatoria por la restitución de la microbiota intestinal. Estudios clínicos controlados señalan que el consumo de probióticos, como *Lactobacillus*, disminuye la curva de glicemia, resistencia a la insulina y HbA1c (63, 66, 67).

## **Kéfir y mejoras en las alteraciones en el perfil lipídico**

En pacientes con diabetes mellitus 2 ocurren frecuentemente anomalías en el metabolismo de los lípidos. La IR característica de la patología a menudo contribuye a la

generación de dislipidemia diabética, presentando niveles altos de colesterol total, colesterol LDL y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Este defecto en el metabolismo de las VLDL produce a una la elevación de las concentraciones de triglicéridos plasmáticos (68).

En la actualidad se ha establecido que la suplementación con probióticos puede modular el metabolismo lipídico. Uno de los mecanismos propuestos postula que las bacterias y levaduras presentes en el kéfir poseen actividad hidrolítica de sales biliares, acelerando la bioconversión de colesterol a bilis, estimulando así el catabolismo hepático, y resultando en una disminución de los lípidos séricos (69, 70). Por otra parte, el kéfir también puede disminuir la actividad de la betahidroximetil glutaril-CoA (3HMG – CoA) hepática, coenzima intermediaria en la formación del colesterol (71). Un tercer mecanismo estaría mediado por su capacidad de restituir la microbiota intestinal, estimulando la formación de AGCC propionato, butirato y acetato en el colon.; El acetato aumenta los niveles de colesterol en sangre y disminuye los valores de ácidos grasos, sin embargo, el propionato disminuye la respuesta hipercolesterolemica del acetato (72). El kéfir ha demostrado además la capacidad de asimilar el colesterol de la leche durante la incubación y almacenamiento (73).

Debido a los múltiples beneficios asociados al consumo de probiótico kéfir, por ser un consorcio de microorganismos productor de compuestos orgánicos que afectan de manera positiva a la salud, y a la evidencia científica que respalda la utilización de alimentos funcionales probióticos como terapia para la corrección de las modificaciones en la microbiota en pacientes con alteraciones metabólicas, se decidió realizar el presente estudio con la finalidad de profundizar en la relación entre kéfir, las alteraciones en la microbiota intestinal y el control metabólico en pacientes diabéticos tipo 2.

## **HIPÓTESIS**

El consumo del probiótico kéfir genera cambios tanto a nivel de la microbiota intestinal como a nivel de parámetros metabólicos, tales como glicemia en ayunas y colesterol total, sin generar efectos nocivos en la tolerancia digestiva y frecuencia evacuatoria de pacientes diabéticos tipo 2 en tratamiento con metformina.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Determinar el efecto del consumo de kéfir en la composición de la microbiota intestinal y en el control de la glucosa y perfil lipídico en sujetos con diabetes mellitus tipo 2 en tratamiento con metformina.

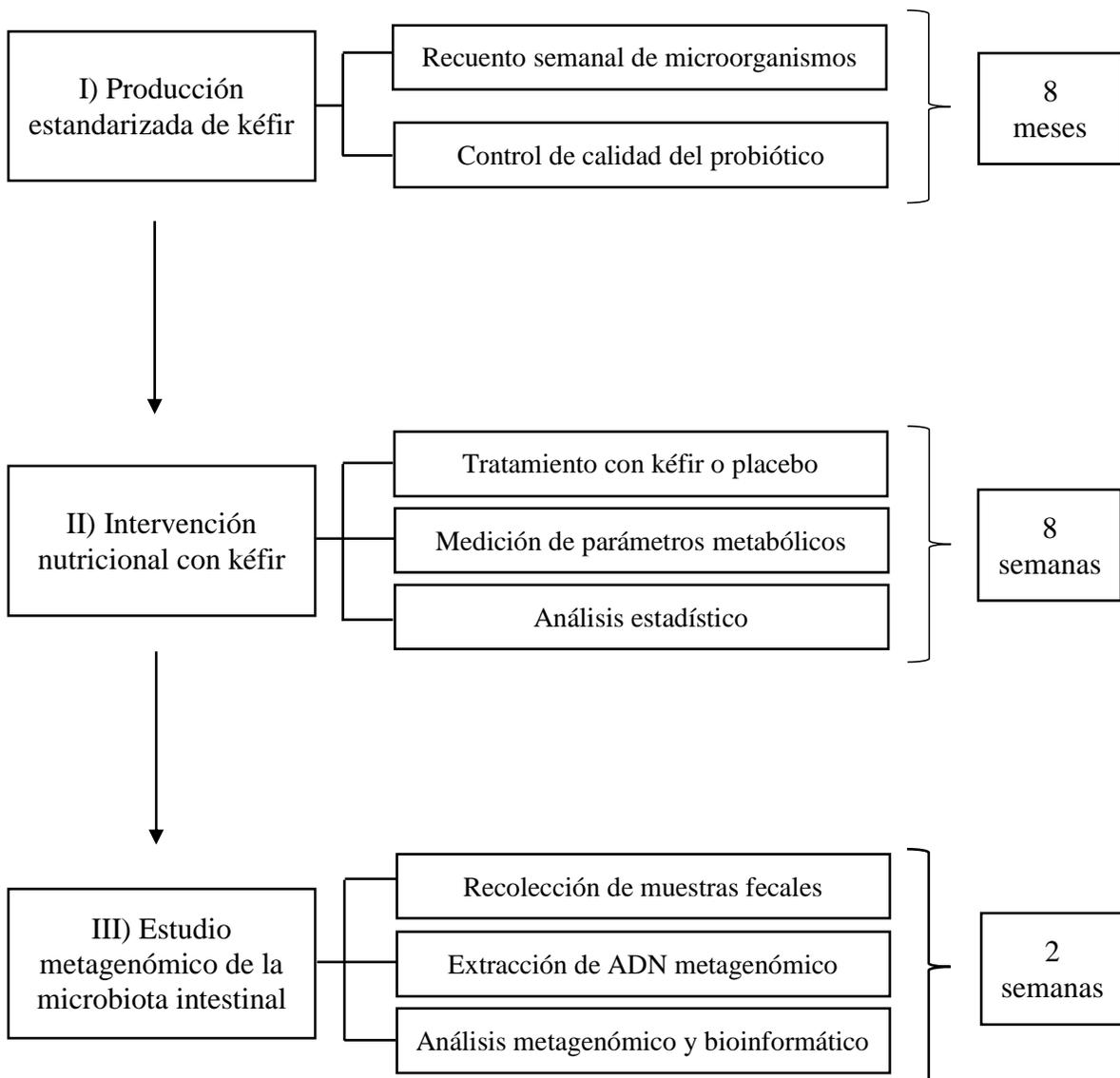
### **Objetivos específicos**

- Estudiar la composición de la microbiota intestinal de individuos DM2 en tratamiento con metformina sometidos a una dieta con kéfir.
- Evaluar el efecto del kéfir sobre los niveles de glicemia en ayunas en sujetos DM2 en tratamiento con metformina al comparar con un yogurt comercial convencional.
- Evaluar el efecto del kéfir sobre los niveles de triglicéridos plasmáticos y colesterol total en sujetos DM2 en tratamiento con metformina al comparar con un yogurt comercial convencional.
- Evaluar el efecto que genera el consumo de kéfir sobre el tránsito intestinal de sujetos DM2 en tratamiento con metformina.

## METODOLOGÍA

Esta investigación se divide en tres etapas, las cuales incluyen la producción de un alimento probiótico funcional, una intervención nutricional con el probiótico de interés y, por último, un estudio metagenómico para analizar la composición de la microbiota intestinal (Figura 1).

**Figura 1: Esquema general de trabajo**



## **I. Producción estandarizada de un alimento probiótico funcional de tipo kéfir**

Se utilizó kéfir de gránulo grande, de 1,0 a 1,5 g, de color blanco – amarillento, perteneciente al Centro de Micro-Bioinnovación (CMBi) de la Universidad de Valparaíso. La producción del fermentado lácteo se realizó en un gabinete de bioseguridad STREAMLINE®, modelo ESCO CLASS II BSC, donde el consorcio se filtraba con un colador de plástico desde el cual se obtenía una biomasa la cual era transferida a un vaso precipitado de 50, 100 o 500 ml, previamente esterilizado por autoclave. Posteriormente se agregaba leche de vaca al 31% materia grasa (MG) y los cultivos se dejaban a temperatura ambiente por 24 a 36 horas. Lo obtenido del filtrado es lo que se conoce popularmente como “yogurt de pajaritos” y es lo que se entregaba a los pacientes durante la investigación. La biomasa retenida en el filtro, correspondiente a gránulos de kéfir, era lavada con agua destilada y utilizada para la siguiente fase de producción.

La producción de kéfir se llevó a cabo durante ocho meses. La leche utilizada se manejó siempre en área estéril, sellada y rotulada para ser almacenada en condiciones de refrigeración. Tanto el kéfir como el placebo se almacenaron refrigerados a 4°C, en envases individuales de 150 g.

### **Control de calidad: análisis microbiológico y cuantificación de células viables por dosis entregada**

Se le realizaron análisis microbiológicos al kéfir de manera semanal, con el fin de evaluar la diversidad microbiológica y descartar contaminación. De la misma forma, se determinó el número de células viables presentes en el probiótico, mediante recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) (Tabla 7). Para esto se diluyó 1 g del probiótico en 10 ml de suero fisiológico 0,9%, se realizaron diluciones seriadas alicuotando 20 µl, con una

micropipeta, en 2 ml de suero fisiológico 0,9% y se sembró un inóculo de 0,1 ml del fermentado lácteo en una placa de agar milk, la cual fue incubada a 37°C por 24 a 48 hrs. Todos los experimentos fueron realizados en triplicado.

El número de unidades formadoras de colonias (UFC) se calculó según la siguiente ecuación (74):

$$\text{UFC/g} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de colonias en placa} \times \text{Inverso Factor de Dilución}}{0,1 \text{ g (inóculo)}}$$

El recuento de la cuantificación de células viables dio un promedio de  $3,3 \times 10^8$  ufc/g, y el detalle semanal durante los dos meses de intervención se encuentra en la siguiente tabla:

**Tabla 7:** Análisis microbiológico y recuento de UFC/g semanal

<b>N° de semana</b>	<b>UFC/g</b>
Semana 1	$3,0 \times 10^8$
Semana 2	$3,6 \times 10^8$
Semana 3	$3,0 \times 10^8$
Semana 4	$3,2 \times 10^8$
Semana 5	$3,5 \times 10^8$
Semana 6	$3,1 \times 10^8$
Semana 7	$3,4 \times 10^8$
Semana 8	$3,6 \times 10^8$
<b>Promedio</b>	<b><math>3,3 \times 10^8</math></b>

## II. Intervención nutricional para incorporar kéfir en la dieta

### Tipo de estudio

Ensayo clínico controlado, randomizado, de ciego simple.

### Caracterización de la población estudiada

La muestra escogida para la aplicación de la investigación correspondió a población adulta que presentara diabetes mellitus tipo 2 en tratamiento con metformina, pertenecientes a la Comuna de Puchuncaví de la Región de Valparaíso.

### Pesquisa de pacientes

La pesquisa de los sujetos evaluados en el estudio se realizó a través de la gestión en los centros de atención primaria pertenecientes al Servicio de Salud Valparaíso – San Antonio, CESFAM Las Ventanas y CESFAM Puchuncaví.

### Selección del tamaño de la muestra

El cálculo del tamaño muestral se realizó en base al estudio de Firouzi et al. (75), donde se midió el efecto de probióticos en el control glicémico de diabéticos tipo 2. Tomando esto de base, el tamaño de la muestra se calculó utilizando la siguiente ecuación y obteniendo un resultado de  $n = 10$  sujetos por grupo.

$$N = [2 \cdot (Z\alpha + Z\beta)^2 \cdot s^2] / d^2$$

Dónde:

N: Número de sujetos necesarios en cada uno de los grupos

$Z\alpha$  (valor de Z correspondiente al riesgo  $\alpha$  fijado): Para un  $p = 0,05$ , el valor es de 1,960.

$Z\beta$  (valor de Z correspondiente al riesgo  $\beta$  fijado): Para una potencia del 80%, el valor es de 1,28.

$s^2$ : La variancia descrita para glicemia en ayunas por Firouzi es de 4,41 (desviación estándar de 2,1 mmol/L).

d: El valor mínimo de la diferencia que se desea detectar para glicemia en ayunas es de 3,0 mmol/L.

## **Criterios de inclusión y exclusión**

- Criterios de inclusión
  - Sujetos diagnosticados con DM2 con tratamiento hace más de 1 año
  - Edad entre 30 y 60 años
  - Sexo femenino y masculino
  - Con o sin medicamentos antihipertensivos, antiplaquetarios, antialérgicos.
  
- Criterios de exclusión
  - Fumadores
  - Personas con riesgo de dependencia al alcohol (puntaje AUDIT > 8 pts)
  - Historia de accidentes vasculares
  - Presencia de enfermedad renal, hepática, intestinal o neurológica
  - Hipotiroidismo sin tratamiento
  - Con diagnóstico de VIH+
  - Intolerancia a la lactosa
  - Uso de insulina y sulfonilureas
  - En tratamiento con antibióticos
  - Mujeres en periodo gestacional o de lactancia

## Definición de variables del estudio

**Tabla 2:** Variables independientes del estudio

Variable independiente	Tipo de variable	Cantidad a entregar
Cantidad de kéfir o placebo	Cuantitativa continua	150 g/d

**Tabla 3:** Variables dependientes del estudio

Variable dependiente	Unidad de medida	Tipo de variable	Punto de corte
Glicemia en ayunas	mg/dl	Cuantitativa continua	80 – 130 mg/dl
Triglicéridos	mg/dl	Cuantitativa continua	< 150 mg/dl
Colesterol Total	mg/dl	Cuantitativa continua	< 150 mg/dl
Frecuencia evacuatoria	Nº de veces/semana	Cualitativa ordinal	-----
Malestares gástricos	Presencia/Ausencia	Cualitativa ordinal	-----
Composición de la microbiota intestinal	% de microorganismos	Cuantitativa continua	-----

**Tabla 4:** Variables controladas del estudio

Variable controlada	Unidad de medida	Tipo de variable	Punto de corte
Antropometría (peso y talla)	Kilogramos (Kg) y metros (m)	Cuantitativa continua	-----
Actividad física	IPAQ	Cualitativa ordinal	Alto: 7 días/sem Moderado: $\geq 3$ días/sem Bajo: No alto o moderado
Consumo de energía y macronutrientes	Calorías (kcal) y gramos (g)	Cuantitativa continua	-----
Consumo de alcohol	Cuestionario AUDIT	Cuantitativa continua	$\leq 7$ puntos
Uso de medicamentos	mg/día	Cuantitativa continua	-----

## Recolección de datos, bioética y regulaciones

Previo al comienzo del estudio, cada participante firmó un consentimiento informado (Anexo 1) donde confirmó su participación voluntaria y anónima. Para la recolección de información se aplicó un formulario de registro (Anexo 2) para obtener datos como nombre, fecha de nacimiento, edad, género, antecedentes médicos, hábito tabáquico, medicamentos

de consumo diario, consumo de probióticos, entre otros, con el fin de recolectar información necesaria. Además, previo al comienzo de la investigación, el presente estudio fue aprobado por el comité de bioética de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valparaíso.

### **Diseño experimental**

Se desarrolló un estudio de tipo caso (n = 10) – control (n = 10), donde el caso correspondió al probiótico (kéfir) y el control a un yogurt comercial convencional. Tanto el probiótico como el yogurt convencional tuvieron características organolépticas similares y fueron entregados de manera semanal en envases plásticos de 150 g contenido neto, a una temperatura menor a 5°C y sin información acerca del tipo de yogurt al interior.

La cantidad de yogurt entregada de manera semanal fue de 150 g/d, con la excepción de la primera semana, donde la cantidad fue aumentando de manera progresiva con el fin de mitigar posibles malestares digestivos (tránsito intestinal alterado, gases, hinchazón) y de esta manera ambientar el tracto gastrointestinal y disminuir la probabilidad de sufrir posibles efectos secundarios. El aumento diario de la cantidad entregada hasta alcanzar la cantidad propuesta para el estudio de 150 g/d se encuentra en siguiente tabla:

**Tabla 5:** Aumento progresivo de la cantidad de yogurt entregada en la primera semana

<b>N° día</b>	<b>Día de la semana</b>	<b>Cantidad de yogurt</b>
Día 1	Lunes	40 g/d
Día 2	Martes	50 g/d
Día 3	Miércoles	60 g/d
Día 4	Jueves	80 g/d
Día 5	Viernes	100 g/d
Día 6	Sábado	120 g/d
Día 7	Domingo	150 g/d

Previo a la intervención, se les requirió a los pacientes que no consumieran lácteos fermentados o alimentos probióticos por al menos una semana. El estudio tuvo una duración de ocho semanas en donde ambos grupos de pacientes consumieron 150 g/día del yogurt asignado (probiótico o convencional). Se les solicitó a los participantes que mantuvieran su dieta (consumo de nutrientes como grasas, carbohidratos, fibra dietética y proteínas), estilos de vida (nivel de actividad física), suplementación de minerales y/o vitaminas y terapia farmacológica habituales, además de que evitaran consumir otro yogurt o lácteo fermentado distinto al provisto.

Antes de comenzar el estudio, se verificó que la temperatura de los refrigeradores de los participantes estuviera dentro de los rangos normales. Además, los participantes fueron instruidos en cuanto a la mantención y almacenamiento del alimento en su envase original, a una temperatura de 4°C, y medidas básicas de higiene para evitar su contaminación.

Se realizaron visitas semanales a los participantes en donde se documentaron cambios en el estilo de vida, uso de medicamentos, consumo de alcohol, presencia de enfermedades agudas y efectos adversos. Además, la corroboración del consumo del yogurt se realizó de manera semanal mediante una encuesta (Anexo 7).

### **Medición de parámetros**

- Parámetros metabólicos

Se realizó la medición de glicemia en ayunas, colesterol total y triglicéridos plasmáticos mediante muestras de sangre capilar. Para la medición de estos parámetros se utilizó un glucómetro monitor de marca Accutrend® Plus de Roche, cintas reactivas y una lanceta que permite evaluar el control metabólico de acuerdo al consumo de kéfir o

yogurt convencional. Las mediciones se realizaron previo al comienzo y una vez concluida la investigación; los resultados se anotaron en una hoja de registro (Anexo 8).

Según la ADA y Guía Clínica para la diabetes mellitus tipo 2, los valores esperados para adultos con DM2 son (59, 60):

**Tabla 6:** Indicadores bioquímicos en el control de la DM2

<b>Indicador</b>	<b>Referencia</b>
Glicemia en ayunas	80 – 130 mg/dl
Colesterol total	< 150 mg/dl
Triglicéridos	< 150 mg/dl

- Determinaciones antropométricas

Se determinó tanto al comienzo como al término del estudio peso (Kg) y talla (m) de cada participante. La determinación del peso se realizó a través de una balanza digital de precisión marca Seca® 813 con una sensibilidad de 0,1 Kg, ubicada en una superficie firme y lisa, verificando su calibración previo a realizar la medición del participante, el cual se debió ubicar al centro de ésta, con el peso distribuido uniformemente y con la menor ropa posible. La medición de la talla fue a través de un estadiómetro marca Seca® 700 con una sensibilidad de 0,1 cm, con el sujeto en máxima inspiración, sin zapatos, con los pies juntos y con los talones, glúteos, espalda y región occipital en contacto con el plano vertical del estadiómetro. Para ambas mediciones se aseguró que el sujeto se encontrara en plano Frankfort (cabeza erguida y parte superior de la oreja y el ángulo externo del ojo en una línea paralela con el piso), descalzo y con los brazos relajados al costado (76). Con los datos se construyó el indicador IMC ( $\text{peso}/\text{talla}^2$ ) clasificando el estado nutricional del sujeto, de acuerdo a los patrones de referencia vigentes por el Ministerio de Salud (77).

- Determinaciones alimentarias

- Encuestas alimentarias: Se utilizó el método de recordatorio de 24 horas (Anexo 9) en dos días de la semana y uno de fin de semana, al comienzo y final del estudio, con el fin de recopilar información acerca de la alimentación de los pacientes. La encuesta de recordatorio de 24 horas recopila información respecto a tiempos de comida, horarios y lugar en que se realiza cada tiempo de comida, alimentos y/o preparaciones ingeridas, desglose de ingredientes y cantidad ingerida (78).

Para el cálculo de energía y nutrientes (proteínas, carbohidratos, fibra dietética, lípidos, AGS, AGMI, AGPI) consumidos por cada uno de los participantes, se utilizó el programa computacional Food Processor SQL 10,7 (Food Processor II® ESHA Research, Salem, OR, USA), que utiliza una base de datos de composición de alimentos norteamericanos a la cual se le agregaron alimentos chilenos.

- Cuestionario de tolerancia digestiva: Con el fin de recopilar información acerca del bienestar digestivo y tiempo de tránsito intestinal de los pacientes frente al consumo del probiótico o el yogurt convencional, se aplicó de manera semanal un cuestionario de tolerancia digestiva, que reunía información acerca de malestares gástricos y/o digestivos y frecuencia evacuatoria. (Anexo 10).

### **III. Estudio metagenómico de la microbiota intestinal de personas sometidas a una dieta con kéfir**

#### **Tipo de estudio**

Estudio experimental cruzado

#### **Identificación de la población utilizada**

Muestras de ADN metagenómico de microbiota intestinal de humanos. Para estudiar la microbiota de individuos consumidores de kéfir, se extrajeron muestras de ADN desde fecas obtenidas de las personas sometidas al estudio (n = 10).

#### **Recolección de muestras fecales**

Una semana previa al comienzo del estudio, y a las dos semanas de iniciado, se les solicitaron muestras fecales a aquellos pacientes pertenecientes al grupo caso, es decir, aquellos individuos que consumieron probiótico kéfir (n = 10). Se logró recolectar muestras fecales de un total de ocho participantes.

Los pacientes recolectaron una muestra diaria durante cinco días previos a la intervención y cinco días luego de haber transcurrido dos semanas desde el comienzo del estudio. Se seleccionaron cinco de los ocho pacientes para el análisis metagenómico de ARNs 16S, de los cuales se utilizaron tres muestras del primer tiempo de recolección y tres muestras del segundo. Se les solicitó a los pacientes que congelaran las muestras hasta que éstas fueran recolectadas, y una vez realizado este paso, se trasladaron manteniendo la cadena de frío y se almacenaron a -80°C hasta el momento de analizarlas en el Centro de Bioinnovación (CMBi) de la Universidad de Valparaíso.

## **Extracción de ADN a partir de muestras fecales**

La extracción de ADN se realizó utilizando el protocolo de extracción de ADN metagenómico del consorcio del Proyecto del Microbioma Humano (HMP) utilizando el sistema de extracción MoBio PowerSoil® DNA Isolation Kit (79, 80).

Para realizar la extracción de ADN según el método de extracción del consorcio del Proyecto del Microbioma Humano (HMP), se llevó a cabo el siguiente esquema:

- Se alicuotaron 2 gramos de cada muestra de feca, a los cuales se les agregaron 5 ml de buffer de lisis y se llevaron a vortex por 30 – 40 segundos.
- La mezcla se centrifugó durante cinco minutos a 1500 rpm en una centrífuga con refrigeración EPPENDORF®, modelo 5810R.
- Posterior a esto se tomó 1 ml del sobrenadante y se depositaron 250 ul en 4 tubos Garnet Bead MoBio (provistos por el fabricante) los cuales fueron incubados a 65°C por 10 minutos y luego a 95°C por otros 10 minutos, repitiéndose dos veces este ciclo de temperaturas.
- Luego se continuó con los pasos descritos en el protocolo del MoBio PowerSoil® DNA Isolation Kit (80).

## **Evaluación del rendimiento y calidad y secuenciación del ADN**

El rendimiento final y la calidad del ADN extraído se determinaron espectrofotométricamente usando el NanoDrop® ND – 1000.

Una vez determinado el rendimiento y calidad del ADN, las muestras fueron secuenciadas por el Centro de Micro-Bioinnovación (CMBi) de la Universidad de Valparaíso.

## **Análisis bioinformático del estudio metagenómico**

Se realizó secuenciación del ARNs 16S de 30 muestras de ADN metagenómico, correspondientes a cinco pacientes que consumieron diariamente kéfir durante dos semanas. El análisis de las comunidades microbianas a través de la metagenómica, fue realizada por la Dra. Claudia Ibacache, dado la complejidad y especificidad del análisis.

Para la secuenciación de las 30 muestras se utilizó la plataforma Illumina Miseq y el protocolo de Caporaso et al. (81). Para realizar el análisis de la microbiota intestinal a partir de los datos de secuenciación se utilizó el pipeline bioinformático QIIME™ (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) (82), el cual corresponde a pasos metodológicos que permiten trabajar con las secuencias obtenidas (lecturas) para ensamblar y obtener unidades taxonómicas (OTUs), analizar la biodiversidad y expresar los resultados.

Fueron ensambladas un total de 15.407.405 lecturas (R1 – R2 o Forward – Reverse), quedando un total de 8.853.578 lecturas únicas de un promedio de 253 pb y de buena calidad (phe value > 30 en promedio), lo que fue comprobado utilizando FastQC (83) como control de calidad. Posteriormente, se realizó la asignación de lecturas a cada una de las 30 muestras utilizando el script “*split\_libraries\_fastq.py*“ del pipeline de QIIME™, que contiene 5.532.873 lecturas. De esta manera, se obtuvo la abundancia relativa de los microorganismos que componen la microbiota intestinal de los individuos estudiados, previo y posterior al consumo del probiótico kéfir.

#### **IV. Análisis estadístico del estudio nutricional**

Se utilizó el programa Microsoft Office Excel 2013 para la tabulación de los resultados obtenidos y el programa estadístico SPSS 22.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, USA), para los análisis estadísticos.

Para verificar la distribución normal de las variables se utilizó el Test de Shapiro – Wilk. Las variables cuantitativas son expresadas como promedio  $\pm$  desviación estándar (D.E.) o media  $\pm$  rango intercuartílico, mientras que las variables categóricas se expresan como frecuencia.

Para comparar los cambios ocurridos en las mediciones antropométricas e ingesta de nutrientes dentro del mismo grupo antes y después de la intervención, se utilizó t-student pareada. Para comparar los cambios entre ambos grupos se utilizó la prueba de t-student para variables independientes.

En aquellas variables con distribución anormal, se utilizó la prueba de Wilcoxon para comparar dentro del mismo grupo y la prueba de U de Mann-Whitney para comparar entre los grupos.

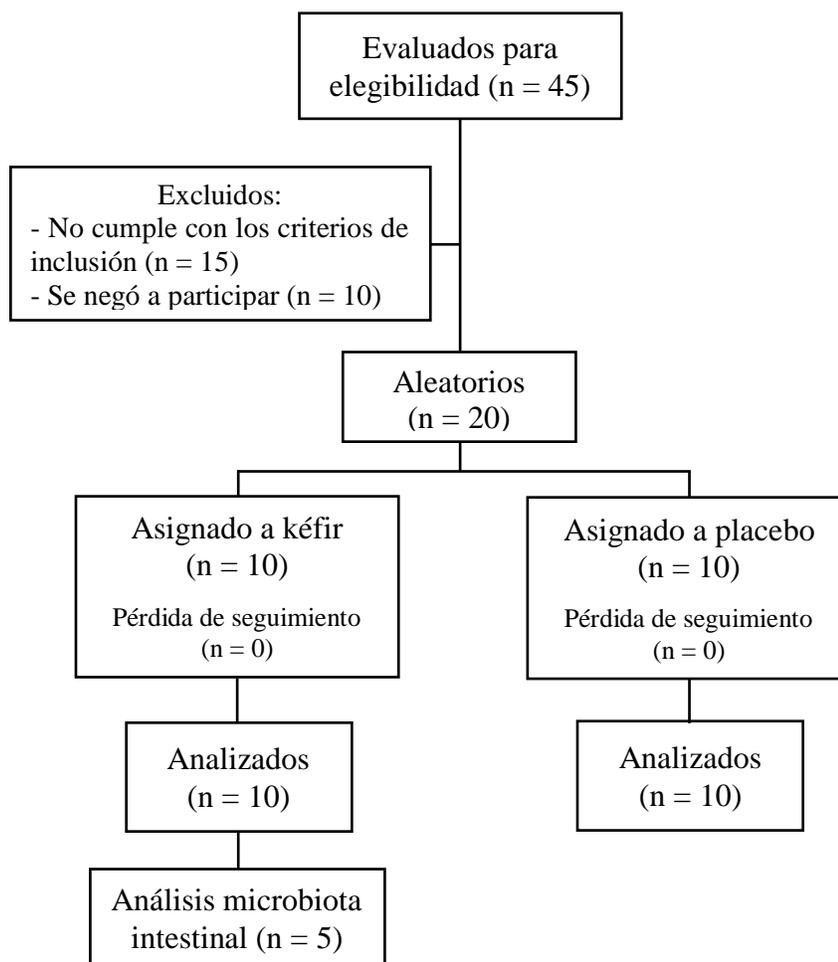
Para comparar entre grupos las variables categóricas como sexo y actividad física, además de los resultados obtenidos para la tolerancia digestiva, se utilizaron las pruebas estadísticas de Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) o Test de Fisher.

Se consideró como significancia estadística un valor  $p < 0,05$  para todos los análisis.

## RESULTADOS

Se reclutaron un total de 45 sujetos, de los cuales diez declinaron participar debido a razones personales y 15 no cumplían con los criterios de inclusión. Previo al comienzo de la intervención fueron seleccionados 20 sujetos, los cuales fueron divididos en dos grupos iguales y en donde fue conducido el ensayo clínico de ciego simple. Se les realizó estudio metagenómico de la microbiota intestinal a cinco de los pacientes asignados al grupo probiótico (kéfir). Durante el estudio, ninguno de los pacientes presentó alguna condición para abandonar la intervención y ninguno decidió retirarse, por lo que el total de 20 pacientes completó la investigación (Figura 2).

**Figura 2:** Diagrama de flujo del estudio



## I. Características generales de la muestra: demografía y variables alimentarias

Las características de cada grupo se muestran en la Tabla 8, donde es posible apreciar que la muestra estudiada se encontraba en un rango de edad entre 34 y 60 años, presentando un promedio de  $51 \pm 7$  años para los individuos del grupo intervenido con kéfir y  $50,3 \pm 8$  años para el grupo control, valores que no presentan una diferencia estadísticamente significativa. En cuanto al sexo, la distribución de género fue de 30% hombres y 70% mujeres, repartida en una frecuencia de hombres/mujeres de 20%/80% y 40%/60% en los grupos probiótico (kéfir) y control (placebo), respectivamente. Sólo el 5% de los participantes del estudio presentaba un nivel de actividad física moderado, mientras que el 95% restante no realizaba ningún tipo de actividad física.

**Tabla 8:** Características demográficas de la población

<b>Variables</b>	<b>Probiótico kéfir: Media <math>\pm</math> D.E. (n = 10)</b>	<b>Placebo: Media <math>\pm</math> D.E. (n = 10)</b>	<b>Pa</b>
<b>Edad (años)</b>	51,00 $\pm$ 7,01	50,30 $\pm$ 8,30	0,834
<b>Sexo<sup>s</sup></b>			0,329 <sup>+</sup>
Hombres	20% (2)	40% (4)	
Mujeres	80% (8)	60% (6)	
<b>Nivel de actividad física<sup>s</sup></b>			0,305 <sup>+</sup>
Bajo	90% (9)	100% (10)	
Moderado	10% (1)	0% (0)	
Alto	0% (0)	0% (0)	
<b>Peso (kg)</b>	89,6 $\pm$ 29,70	89 $\pm$ 13,26	0,954
<b>Talla (cm)</b>	158,8 $\pm$ 4,87	160,5 $\pm$ 10,53	0,674
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	35,36 $\pm$ 11,36	35,03 $\pm$ 6,40	0,941
<b>Duración de la patología (años)</b>	5,20 $\pm$ 4,26	5,10 $\pm$ 2,82	0,950
<b>Dosis de metformina (mg/d)</b>	1233 $\pm$ 422,63	1318 $\pm$ 508,35	0,713

<sup>s</sup>: Expresado como frecuencia

Pa: Obtenido de t-student para muestras independientes

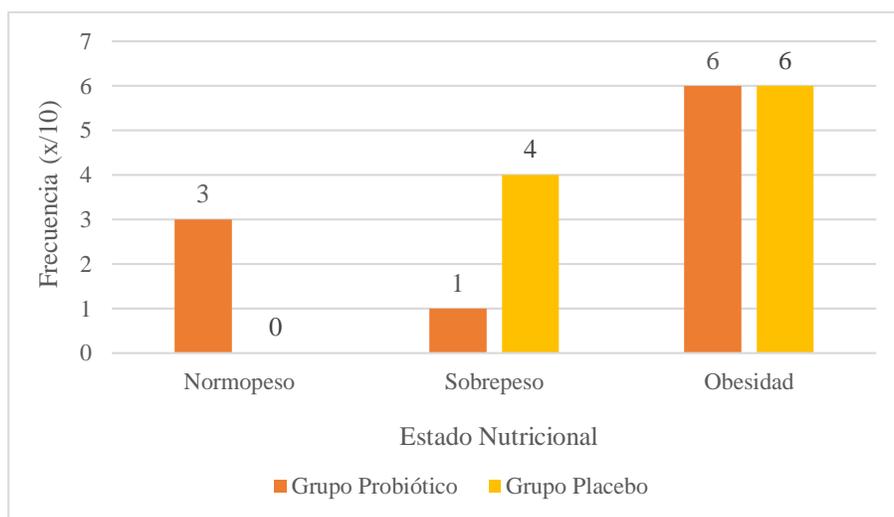
<sup>+</sup>: Obtenido de chi-cuadrado ( $\chi^2$ )

Para la duración de la patología, correspondiente al tiempo transcurrido desde el diagnóstico de la misma, no hubo diferencias significativas, presentándose un promedio de  $5,2 \pm 4,26$  años para el grupo probiótico y  $5,1 \pm 2,82$  años para el grupo control. Lo mismo ocurrió con el tratamiento farmacológico, presentado como dosis metformina diaria, donde se no presentaron diferencias entre los grupos.

En cuanto a la antropometría de la muestra estudiada, tanto el peso previo como el peso posterior la intervención no presentan diferencias significativas al realizar la prueba estadística de t-student para variables independientes. El grupo intervenido con el probiótico kéfir presentó una disminución de 2300 g una vez finalizado el estudio, sin significancia estadística ( $p = 0,06$ ). En el caso del Índice de Masa Corporal (IMC), no hay diferencias entre los grupos y la disminución de 0,92 puntos ( $p = 0,05$ ) presentada por el grupo intervenido con kéfir, no es significativa.

De acuerdo a la clasificación del estado nutricional (Figura 3), se observa que un 85% de la muestra estudiada presenta malnutrición por exceso. Para el grupo probiótico el porcentaje alcanza el 70% (10% sobrepeso y 60% obesidad), cifra que es aún mayor en el grupo control donde un 100% (40% sobrepeso y 60% obesidad) de los participantes presenta un mal estado nutricional.

**Figura 3:** Clasificación del estado nutricional por grupo de estudio



### **Variables alimentarias: consumo de energía y macronutrientes**

Al analizar los Recordatorios de 24 horas de dos días de semana y uno de fin de semana (Tabla 9) realizados a cada paciente tanto al comienzo como al final del estudio, no se encontraron diferencias significativas para energía, carbohidratos, proteínas, grasa total, ácidos grasos saturados, ácidos grasos insaturados y fibra dietética al comparar pre y post intervención. Sin embargo, en el caso de los ácidos grasos poliinsaturados, es posible observar que el grupo placebo tuvo un consumo significativamente mayor al grupo en tratamiento con kéfir una vez finalizado el estudio.

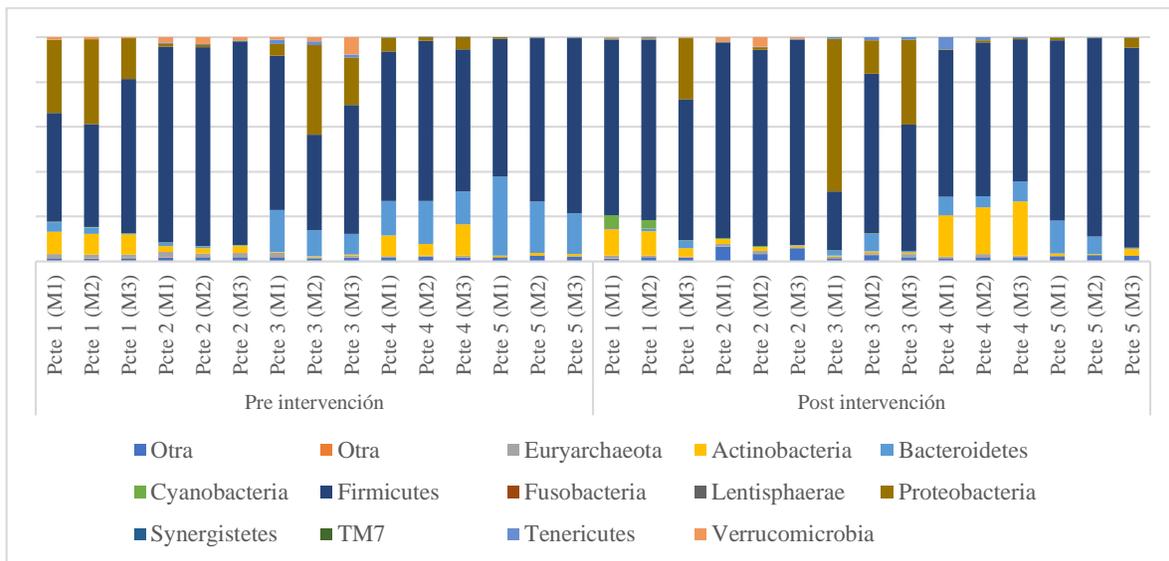
**Tabla 9:** Ingesta alimentaria de los participantes durante la intervención

<b>Variables</b>	<b>Probiótico kéfir: Media <math>\pm</math> D.E. (n=10)</b>	<b>Placebo: Media <math>\pm</math> D.E. (n=10)</b>	<b>Pa</b>
<b>Energía (kcal)</b>			
Previo a la intervención	1666 $\pm$ 323,99	1697 $\pm$ 359,90	0,862
Posterior a la intervención	1653 $\pm$ 298,52	1716 $\pm$ 409,82	0,731
<b>Pb</b>	0,792	0,771	
<b>Carbohidratos (g)</b>			
Previo a la intervención	224,72 $\pm$ 29,25	213,77 $\pm$ 45,03	0,573
Posterior a la intervención	219,09 $\pm$ 33,41	211,86 $\pm$ 46,38	0,726
<b>Pb</b>	0,686	0,854	
<b>Proteínas (g)</b>			
Previo a la intervención	59,46 $\pm$ 16,70	66,14 $\pm$ 18,03	0,455
Posterior a la intervención	59,38 $\pm$ 12,18	66,93 $\pm$ 16,07	0,307
<b>Pb</b>	0,984	0,809	
<b>Grasa total (g)</b>			
Previo a la intervención	62,24 $\pm$ 22,97	66,35 $\pm$ 19,94	0,708
Posterior a la intervención	62,98 $\pm$ 20,67	70,08 $\pm$ 22,32	0,520
<b>Pb</b>	0,863	0,407	
<b>AGS (g)</b>			
Previo a la intervención	21,01 $\pm$ 9,46	24,23 $\pm$ 9,21	0,502
Posterior a la intervención	20,92 $\pm$ 9,31	25,30 $\pm$ 7,60	0,320
<b>Pb</b>	0,971	0,455	
<b>AGMI (g)</b>			
Previo a la intervención	23,09 $\pm$ 9,72	18,75 $\pm$ 7,31	0,32
Posterior a la intervención	24,08 $\pm$ 9,41	20,42 $\pm$ 8,87	0,436
<b>Pb</b>	0,788	0,363	
<b>AGPI (g)</b>			
Previo a la intervención	12,23 $\pm$ 8,65	20,27 $\pm$ 7,20	0,063
Posterior a la intervención	10,22 $\pm$ 5,92	20,86 $\pm$ 6,42	0,004*
<b>Pb</b>	0,354	0,808	
<b>Fibra dietética (g)</b>			
Previo a la intervención	20,15 $\pm$ 9,12	19,44 $\pm$ 7,64	0,866
Posterior a la intervención	20,69 $\pm$ 7,91	21,61 $\pm$ 9,01	0,832
<b>Pb</b>	0,833	0,374	
Pa: Obtenido de t-student para muestras independientes			
Pb: Obtenido de t-student pareado			
*: Significancia estadística entre grupos al final de la intervención (p < 0,05)			

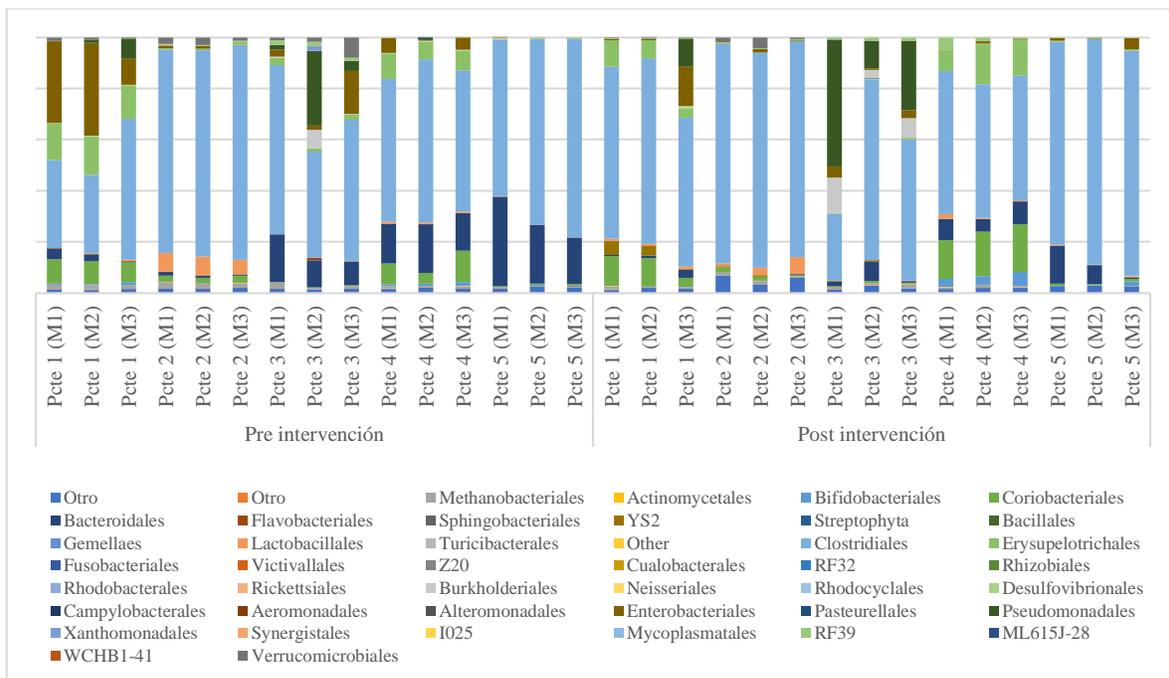
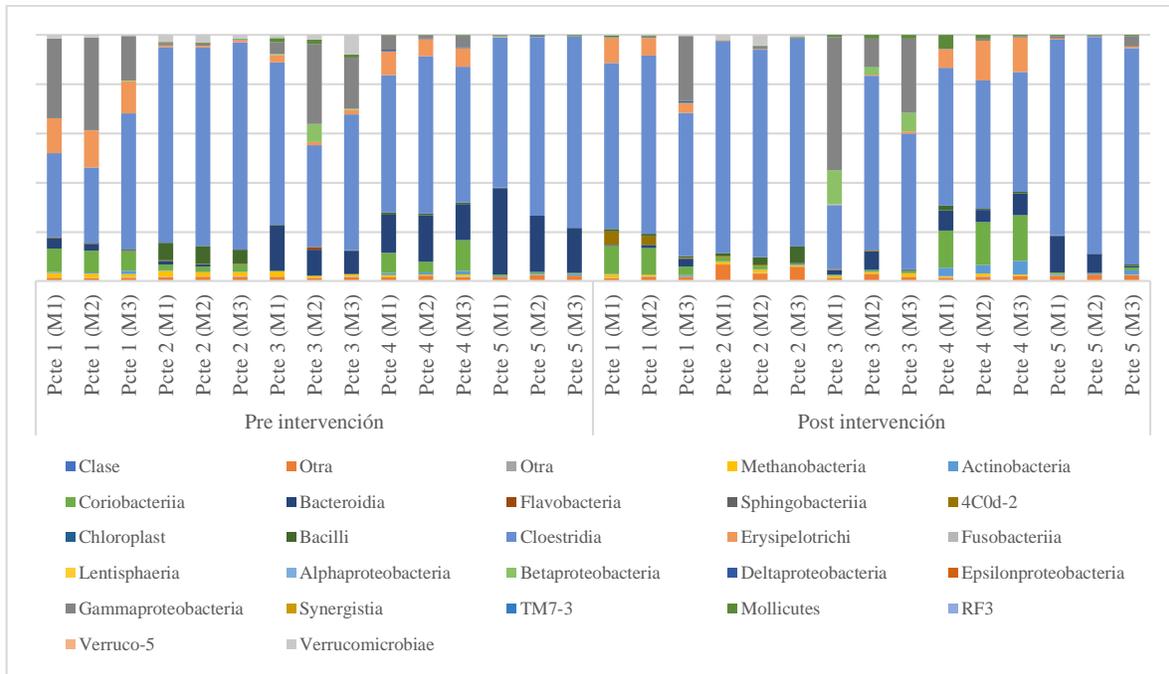
## II. Estudio metagenómico de la microbiota intestinal de pacientes con diabetes tipo 2 en tratamiento con metformina

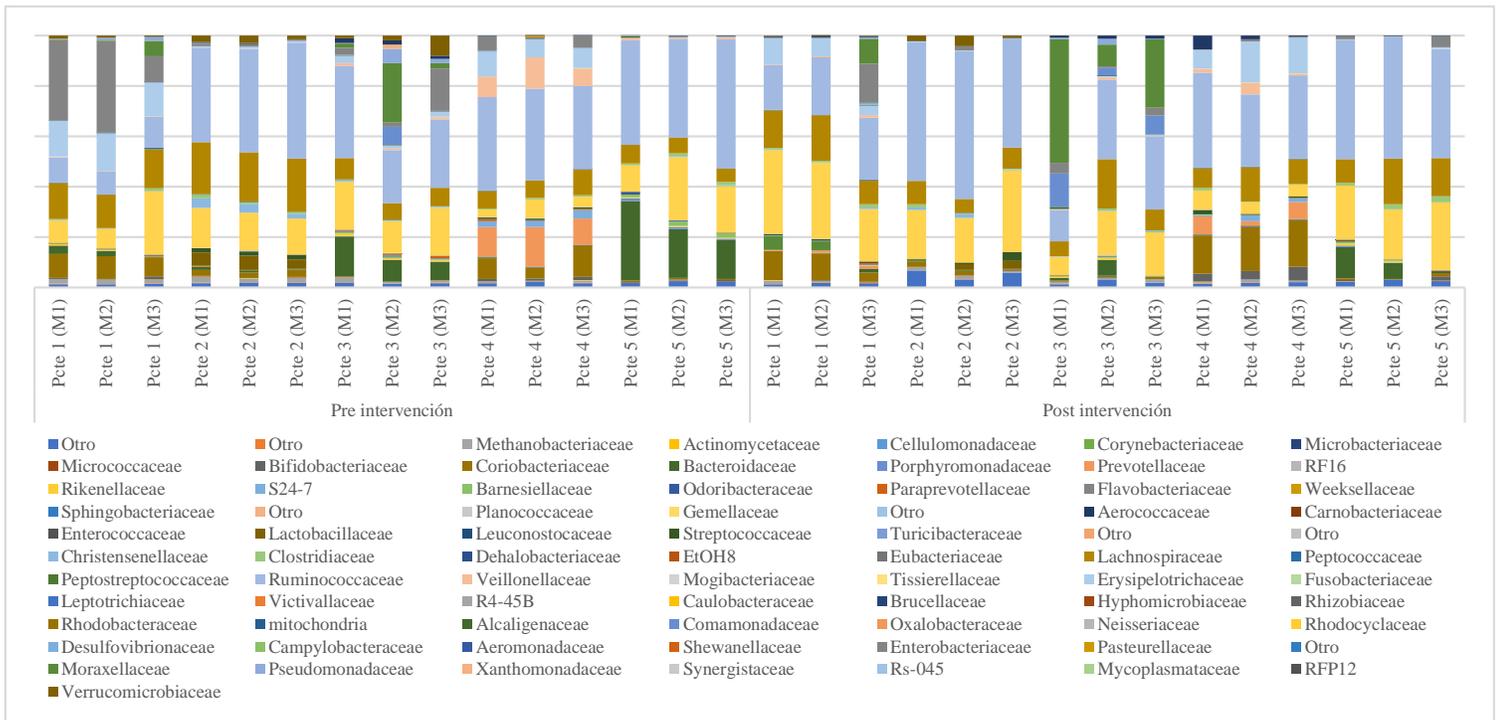
La Figura 4 contiene el resumen taxonómico de la composición de la microbiota intestinal de cinco pacientes que fueron intervenidos con probiótico kéfir. La figura 3 muestra la composición previa a la intervención, y los cambios presentados por los participantes luego de ser tratados por dos semanas.

**Figura 4:** Resumen taxonómico de la composición de la microbiota intestinal pre y post intervención.

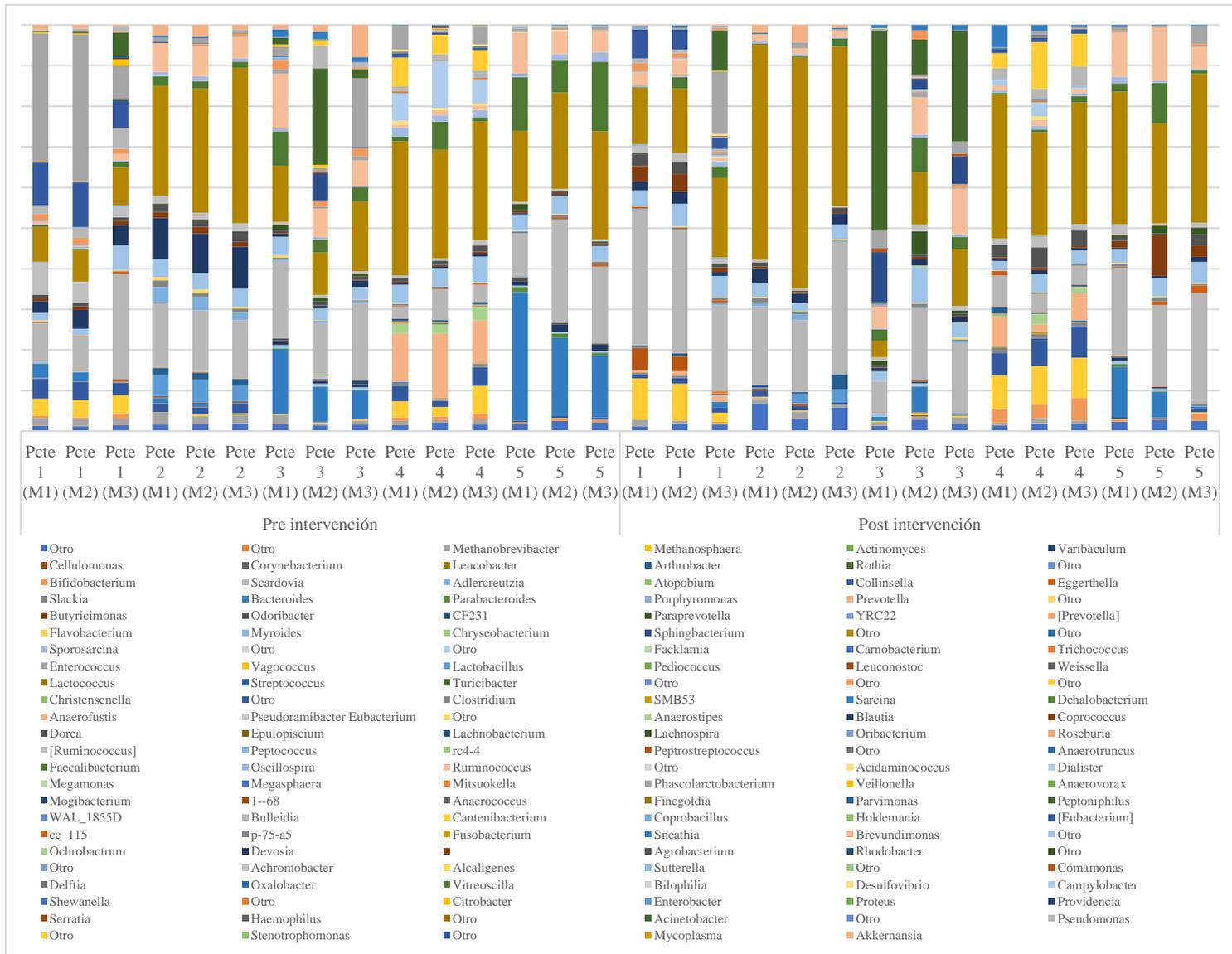


a): Taxonomía según phylum bacteriano





d): Taxonomía según familia bacteriana



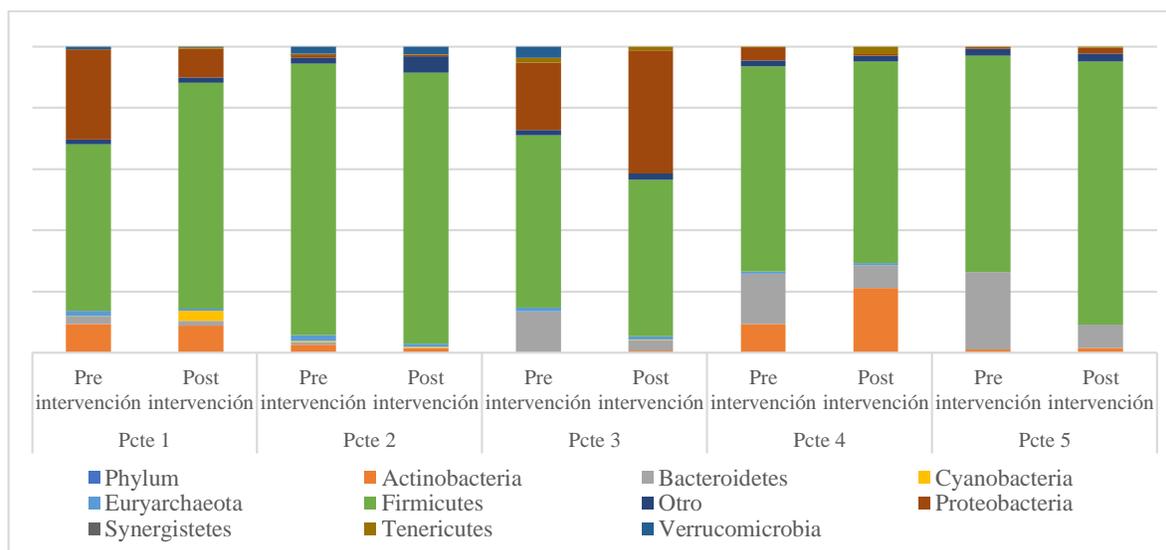
e) Taxonomía según género bacteriano

A partir de estos resultados de secuenciación metagenómica de ARNs 16S, se realizó un análisis de los cambios observados en la estructura de la población como abundancia y riqueza de grupos en los individuos pre y post intervención. La comparación de la estructura de la comunidad microbiana de acuerdo a los rangos de clasificación bacteriana para cada paciente y para la totalidad de la muestra escogida se presenta a continuación:

### Abundancia relativa a nivel de phylums bacterianos

Al analizar la microbiota intestinal previo a la intervención con kéfir, es posible observar que el phylum prevalente en los cinco pacientes analizados corresponde a Firmicutes, el cual tiene una abundancia relativa de más del 50% en la totalidad de los intervenidos (54,4%, 88,8%, 56,3%, 67,1% y 70,7% en los Pctes 1, 2, 3, 4 y 5 respectivamente). A esto le sigue Proteobacteria para los pacientes 1 (29,5%) y 3 (22,0%), Bacteroidetes en el caso de los pacientes 4 y 5 (16,4% y 25,4% respectivamente), y Actinobacteria para el paciente 2 (2,6%) (Figura 5).

**Figura 5:** Phylum encontrados en la microbiota intestinal por paciente a lo largo de la intervención



Posterior a la intervención, dos de los cinco pacientes intervenidos presentaron un aumento importante de Firmicutes, mientras que en los tres restantes la proporción se mantuvo constante. Para el caso de Actinobacteria, tres pacientes presentaron aumento (especialmente el Pcte 4: +11,3%), mientras que para los otros dos la proporción disminuyó

levemente. Verrucomicrobia disminuyó en todos los pacientes, mientras que Proteobacteria varió entre los intervenidos, presentando los pacientes 1, 2 y 4 una disminución de este phylum (-20,1%, -0,2% y -3,9% respectivamente) y los pacientes 3 y 5 un aumento el cual fue más marcado en el paciente 3 (+18,2%). Para el caso de los Bacteroidetes, todos los pacientes presentaron disminución de este phylum una vez transcurridas las dos semanas de tratamiento.

Al realizar un análisis resumen de la abundancia relativa para la totalidad de los pacientes (Tabla 10), se observa que previo a la intervención los principales phylum encontrados corresponden a Firmicutes (67,5%), Bacteroidetes (11,7%) y Proteobacterias (11,5%), seguidos por Actinobacteria (4,5%) y Verrucomicrobia (1,4%). Posterior a la intervención, los phylum Actinobacteria y Firmicutes aumentaron (+2,2% y +5,6% respectivamente), mientras que Proteobacterias, Bacteroidetes y Verrucomicrobia disminuyeron (-1,0%, -7,6% y -0,9% respectivamente), siendo éste último superado en proporción por el phylum Tenericutes.

**Tabla 10:** Abundancia relativa a nivel de Phylums presentes en la microbiota intestinal pre y post intervención

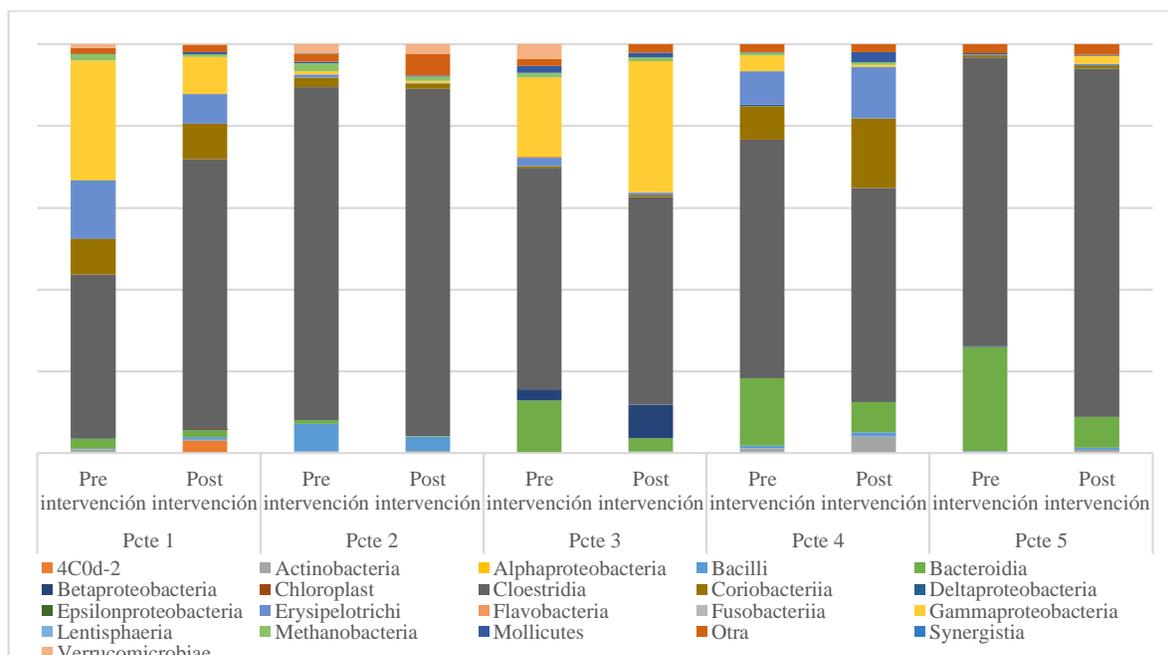
<b>PHYLUM</b>	<b>PRE INTERVENCIÓN</b>	<b>POST INTERVENCIÓN</b>
<b>Actinobacteria</b>	4,5%	6,7%
<b>Bacteroidetes</b>	11,7%	4,1%
<b>Cyanobacteria</b>	0,1%	0,7%
<b>Euryarchaeota</b>	1,1%	0,7%
<b>Firmicutes</b>	67,5%	73,1%
<b>Otra</b>	1,9%	2,7%
<b>Proteobacteria</b>	11,5%	10,5%
<b>Tenericutes</b>	0,5%	0,9%
<b>Verrucomicrobia</b>	1,4%	0,5%

### Abundancia relativa a nivel de clases bacterianas

En cuanto a las clases bacterianas (Figura 6), es posible observar que previo a la intervención la clase predominante correspondía a Clostridia (Firmicutes), lo que se mantiene luego del tratamiento con el probiótico. Sin embargo, mientras algunos pacientes presentan aumento (Pcte 1, 2 y 5), otros mantienen o disminuyen la proporción de esta clase bacteriana (Pcte 3 y 4).

Para Bacteroidia (Bacteroidetes), nuevamente se observa una disminución de la proporción en la totalidad de los pacientes al tratar con kéfir. Por otro lado, las Gammaproteobacterias (Proteobacteria) disminuyeron en tres de los cinco pacientes intervenidos (Pcte 1, 3 y 4), pero aumentaron en los dos restantes (Pcte 2 y 5).

**Figura 6:** Clases bacterianas encontradas en la microbiota intestinal por paciente durante la intervención



Al realizar el análisis de la totalidad de la muestra (Tabla 11), se observa que antes del tratamiento con kéfir las clases bacterianas se ordenan, en forma descendente, de la siguiente manera: en primer lugar, se encuentra Clostridia (Firmicutes), seguido por Bacteroidia (Bacteroidetes), Gammaproteobacteria (Proteobacteria), Erysipelotrichi (Firmicutes) y Coriobacteriia (Actinobacteria). Así, una vez realizada la intervención las mismas continúan siendo las más abundantes, sin embargo, las proporciones difieren: Clostridia y Coriobacteriia presentan aumento de un 6,9% y 1,6% mientras que Bacteroidia, Gammaproteobacteria y Erysipelotrichi disminuyen en un 7,6%, 1,9% y 0,9% respectivamente, al comparar con los pacientes previo a la intervención.

**Tabla 11:** Abundancia relativa a nivel de clases presentes en la microbiota intestinal pre y post intervención

CLASE	PRE INTERVENCIÓN	POST INTERVENCIÓN
<b>4C0d-2</b>	0,1%	0,7%
<b>Actinobacteria</b>	0,5%	1,1%
<b>Bacilli</b>	1,5%	1,2%
<b>Bacteroidia</b>	11,6%	4,0%
<b>Betaproteobacteria</b>	0,6%	1,7%
<b>Clostridia</b>	60,9%	67,8%
<b>Coriobacteriia</b>	4,0%	5,6%
<b>Deltaproteobacteria</b>	0,1%	0,1%
<b>Erysipelotrichi</b>	5,0%	4,1%
<b>Flavobacteria</b>	0,1%	0,0%
<b>Gammaproteobacteria</b>	10,7%	8,8%
<b>Methanobacteria</b>	1,1%	0,7%
<b>Mollicutes</b>	0,5%	0,9%
<b>Otra</b>	1,9%	2,7%
<b>Verrucomicrobiae</b>	1,4%	0,5%

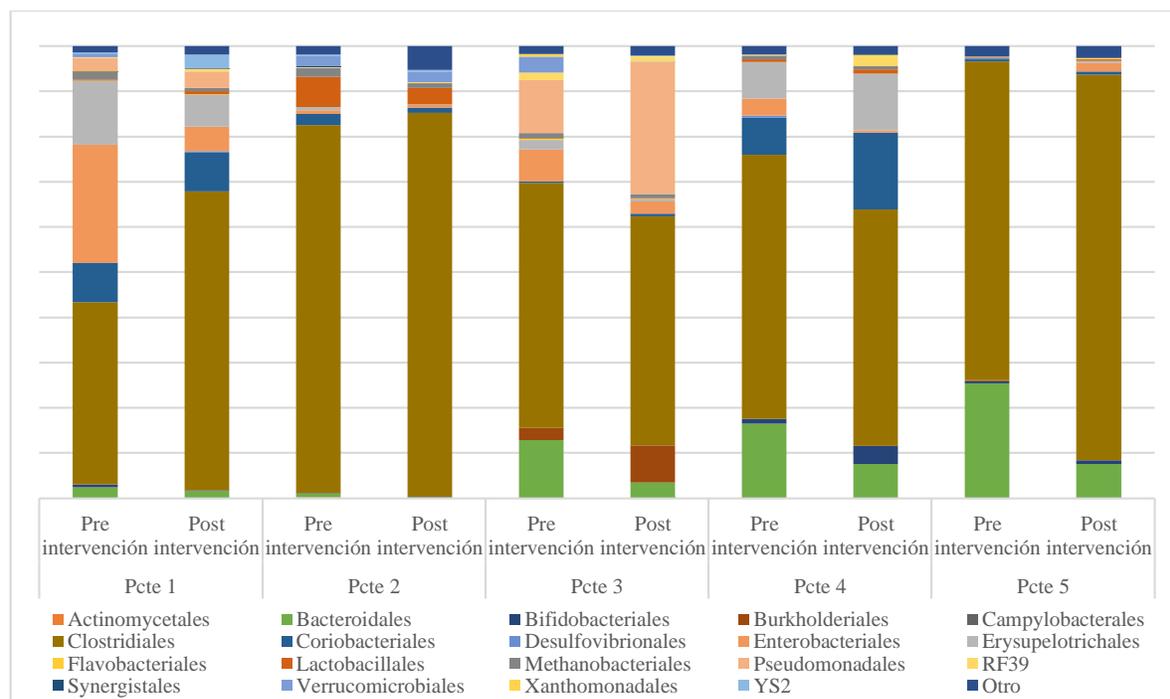
#### Abundancia relativa a nivel de órdenes bacterianos

Para el rango de órdenes bacterianos (Figura 7), la taxonomía muestra que el orden predominante en la totalidad de los pacientes corresponde a los Clostridiales, lo que se

mantiene luego de intervenir con kéfir. Tres de los cinco pacientes presentaron aumento de este orden (Pcte 1, 2 y 5), mientras que los otros dos disminuyeron levemente su proporción (Pcte 3 y 4).

El Pcte 1 presentó una marcada disminución de Enterobacteriales luego de la intervención (-20,7%), lo que no ocurrió de tal manera para el resto de los participantes del estudio. Asimismo, el Pcte 3 aumentó su proporción de Pseudomonadales (+17,6%) y el Pcte 4 su proporción de Coriobacteriales (+8,8%). Concordante con lo ocurrido en los demás rangos analizados, el orden Bacteroidales, perteneciente al phylum Bacteroidetes, disminuyó de manera marcada en todos los pacientes una vez transcurridas las dos semanas de tratamiento con kéfir.

**Figura 7:** Orden bacteriano encontrado en la microbiota intestinal por paciente durante la intervención



Los resultados obtenidos para el total de los intervenidos se pueden apreciar en la Tabla 12. Allí se muestra que, de acuerdo al orden bacteriano, los cinco más abundantes previo al comienzo del estudio eran Clostridiales (60,9%), Bacteroidales (11,6%), Enterobacteriales (7,6%), Erysipelotrichales (5,0%) y Coriobacteriales (4,0%), los cuales sufrieron cambios una vez intervenidos los pacientes con kéfir, quedando en orden descendente: Clostridiales (+6,9%), Pseudomonadales (+3,7%), Coriobacteriales (+1,6%), Erysipelotrichales (-0,9%), Bacteroidales (-7,6%), Enterobacteriales (-5,4%) y Burkholderiales (+1,1%).

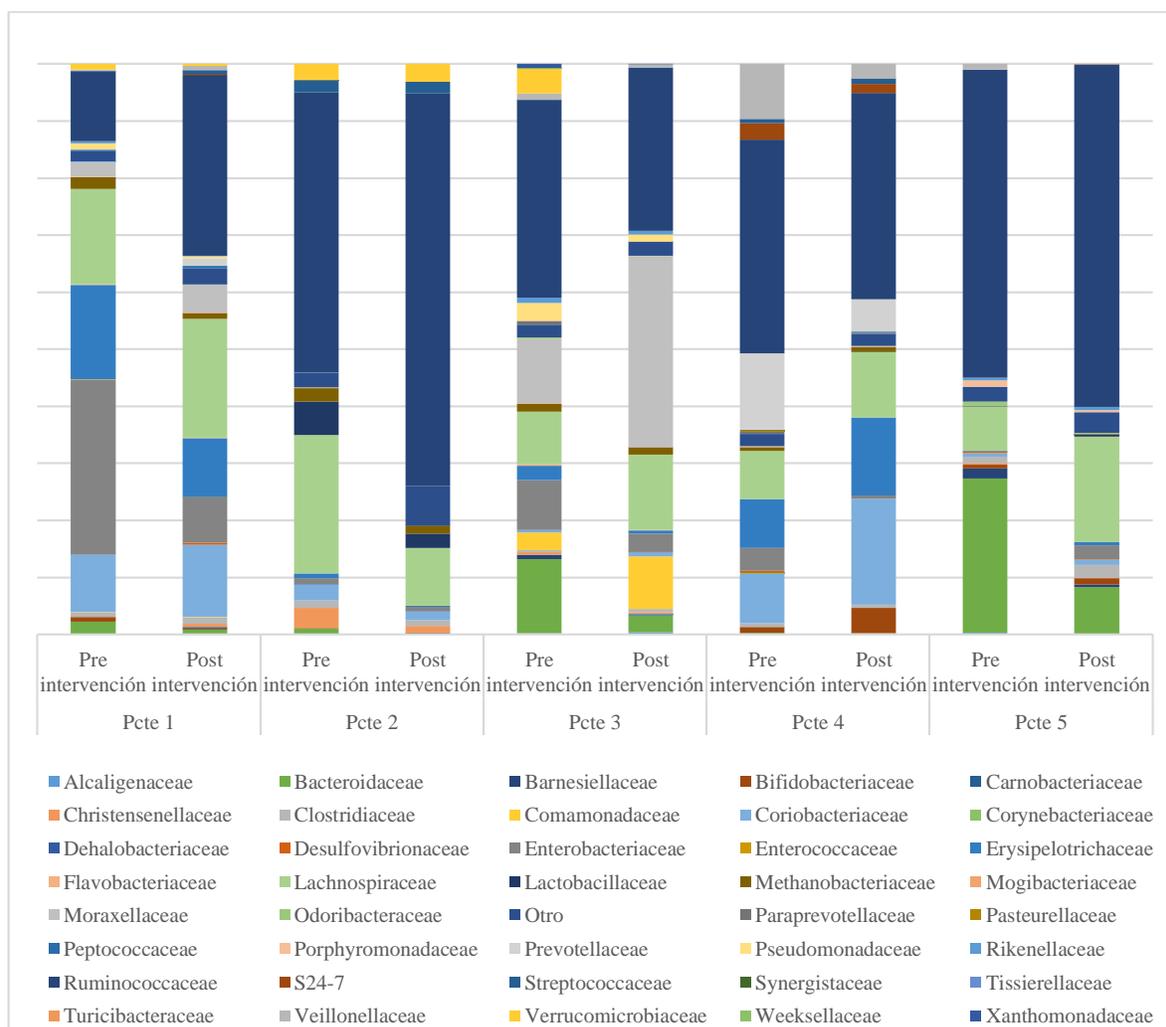
**Tabla 12:** Abundancia relativa a nivel de órdenes presentes en la microbiota intestinal pre y post intervención

<b>ORDEN</b>	<b>PRE INTERVENCIÓN</b>	<b>POST INTERVENCIÓN</b>
<b>Actinomycetales</b>	0,1%	0,1%
<b>Bacteroidales</b>	11,6%	4,0%
<b>Bifidobacteriales</b>	0,4%	1,0%
<b>Burkholderiales</b>	0,6%	1,7%
<b>Clostridiales</b>	60,9%	67,8%
<b>Coriobacteriales</b>	4,0%	5,6%
<b>Desulfovibrionales</b>	0,1%	0,1%
<b>Enterobacteriales</b>	7,6%	2,2%
<b>Erysipelotrichales</b>	5,0%	4,1%
<b>Flavobacteriales</b>	0,1%	0,0%
<b>Lactobacillales</b>	1,5%	1,1%
<b>Methanobacteriales</b>	1,1%	0,7%
<b>Pseudomonadales</b>	2,9%	6,6%
<b>RF39</b>	0,5%	0,9%
<b>Verrucomicrobiales</b>	1,4%	0,5%
<b>Xanthomonadales</b>	0,1%	0,0%
<b>YS2</b>	0,1%	0,7%

## Abundancia relativa a nivel de familias bacterianas

Como se puede observar en la Figura 8, Ruminococcaceae es una de las familias con mayor proporción, la cual aumenta en el Pcte 1 (+11,9%) y 2 (+10,9%) y se mantiene constante en los otros tres. Para el caso de Lachnospiraceae, ésta aumenta en tres de los intervenidos (Pcte 3, 4 y 5), se mantiene en uno (Pcte 1) y, disminuye marcadamente en el Pcte 2. La familia Bacteroidaceae disminuye en todos los pacientes.

**Figura 8:** Familias encontradas en la microbiota intestinal por paciente a lo largo de la intervención



La Tabla 13 muestra las familias bacterianas presentadas por los pacientes al promediar sus resultados. Destaca la abundancia relativa de Ruminococcaceae, Lachnospiraceae, Enterobacteriaceae, Bacteroidaceae, Erysipelotrichaceae, Coriobacteriaceae, Prevotellaceae y Moraxellaceae, tanto previo al estudio como posterior a éste; no obstante, se presentan diferencias en cuanto a su proporción. De esta forma, al observar la composición de la microbiota una vez realizada la intervención, las familias bacterianas anteriormente mencionadas cambian hasta asumir la siguiente distribución: Ruminococcaceae (+3,6%) y Lachnospiraceae (+0,3%) mantienen sus lugares, sin embargo, Moraxellaceae (+4,0%), Coriobacteriaceae (+1,6%), Erysipelotrichaceae (-0,9%), Enterobacteriaceae (-5,4%), Bacteroidaceae (-5,2%) y Comamonadaceae (+1,1%) presentan cambios tales que los obligan a cambiar de posición.

**Tabla 13:** Abundancia relativa a nivel de familias presentes en la microbiota intestinal pre y post intervención

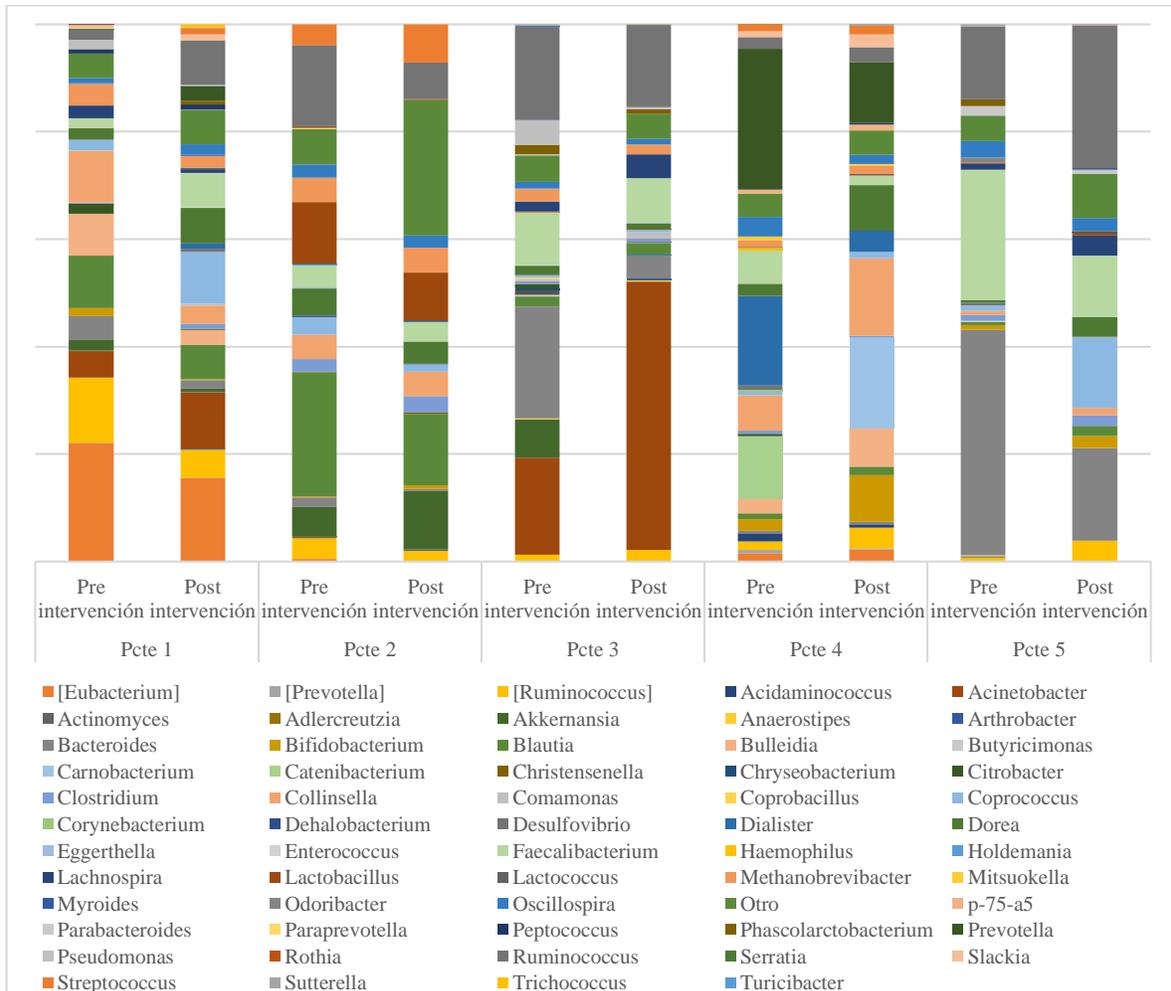
<b>FAMILIA</b>	<b>PRE INTERVENCIÓN</b>	<b>POST INTERVENCIÓN</b>
<b>Alcaligenaceae</b>	0,1%	0,1%
<b>Bacteroidaceae</b>	7,1%	1,9%
<b>Barnesiellaceae</b>	0,4%	0,1%
<b>Bifidobacteriaceae</b>	0,4%	1,0%
<b>Christensenellaceae</b>	0,7%	0,3%
<b>Clostridiaceae</b>	0,7%	0,8%
<b>Comamonadaceae</b>	0,5%	1,6%
<b>Coriobacteriaceae</b>	4,0%	5,6%
<b>Desulfovibrionaceae</b>	0,1%	0,1%
<b>Enterobacteriaceae</b>	7,6%	2,2%
<b>Erysipelotrichaceae</b>	5,0%	4,1%
<b>Flavobacteriaceae</b>	0,1%	0,0%
<b>Lachnospiraceae</b>	11,3%	11,6%
<b>Lactobacillaceae</b>	1,0%	0,4%
<b>Methanobacteriaceae</b>	1,1%	0,7%
<b>Mogibacteriaceae</b>	0,1%	0,1%
<b>Moraxellaceae</b>	2,3%	6,3%
<b>Odoribacteraceae</b>	0,2%	0,0%
<b>Otro</b>	2,0%	2,8%
<b>Paraprevotellaceae</b>	0,2%	0,0%
<b>Peptococcaceae</b>	0,1%	0,1%
<b>Porphyromonadaceae</b>	0,2%	0,1%
<b>Prevotellaceae</b>	2,5%	1,2%
<b>Pseudomonadaceae</b>	0,7%	0,2%
<b>Rikenellaceae</b>	0,3%	0,2%
<b>Ruminococcaceae</b>	31,9%	35,5%
<b>S24-7</b>	0,5%	0,3%
<b>Streptococcaceae</b>	0,5%	0,6%
<b>Veillonellaceae</b>	2,2%	0,7%
<b>Verrucomicrobiaceae</b>	1,4%	0,5%
<b>Xanthomonadaceae</b>	0,1%	0,0%

### Abundancia relativa a nivel de géneros bacterianos

Al examinar el rango de géneros bacterianos (Figura 9), es posible demostrar que la microbiota intestinal es única y personal para cada individuo, lo que se refleja en las diferencias presentadas por cada uno de los pacientes al comparar con otro. Luego de intervenir con probiótico kéfir, se encontró que:

- El Pcte 1 presentó disminuciones más marcadas en la proporción de *Eubacterium* (-3,9%), *Collinsella* (-2,9%), *Bulleidia* (-2,4%) y *Blautia* (-2,1%); y aumentos en la proporción de *Coprococcus* (+2,3%), *Ruminococcus* (+1,8%) y *Faecalibacterium* (+1,3%).
- El Pcte 2 presentó disminución de *Blautia* (-7,1%), *Ruminococcus* (-5,0%), *Lactobacillus* (-3,0%) y *Dorea* (-1,3%); y aumentos en la proporción de *Christensenella* (+0,1%) y *Akkermansia* (+0,1%).
- El Pcte 3 presentó disminución de *Bacteroides* (-8,0%), *Akkermansia* (-3,6%), *Pseudomonas* (-2,1%) y *Faecalibacterium* (-0,3%); y aumentos en la proporción de *Acinetobacter* (+19,1%) y *Lachnospira* (+1,6%).
- El Pcte 4 presentó disminuciones más marcadas en la proporción de *Prevotella* (-7,5%), *Dialister* (-6,3%), *Catenibacterium* (-5,6%) y *Faecalibacterium* (-2,2%); y aumentos en la proporción de *Carnobacterium* (+7,8%), *Collinsella* (+3,4%), *Bifidobacterium* (+3,0%) y *Dorea* (+2,8%).
- Por último, el Pcte 5 presentó disminuciones para *Bacteroides* (-15,8%) y *Faecalibacterium* (-8,6%); y aumentos para *Coprococcus* (4,3%), *Ruminococcus* (+2,7%), *Dorea* (+1,1%), *Lachnospira* (+0,8%), y *Bifidobacterium* (+0,4%).

**Figura 9:** Géneros bacterianos encontrados en la microbiota intestinal por paciente a lo largo del estudio



Con el fin de poder generalizar los cambios ocurridos a la muestra analizada, se realizó un resumen de la totalidad de los pacientes intervenidos (Tabla 14). Así, es posible observar una mayor abundancia de *Ruminococcus*, *Faecalibacterium*, *Blautia* y *Eubacterium* para el phylum de Firmicutes; *Bacteroides*, *Prevotella*, *Odoribacter* y CF231 para Bacteroidetes; *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Citrobacter*, *Desulfovibrio* y *Sutterella* para Proteobacteria; *Collinsella* y *Bifidobacterium* para Actinobacteria y, *Akkermansia* para el phylum de Verrucomicrobia.

Al comparar estas proporciones con las encontradas luego de la intervención con el probiótico kéfir, no se observan aumentos en ninguno, y los demás géneros nombrados disminuyen incluso a 0% (CF231, *Desulfovibrio*, *Bacteroidetes*, *Prevotella*, *Collinsella*, *Pseudomonas*, *Citrobacter* y *Odoribacter*, *Sutterella*).

A pesar de que la mayoría de los géneros mantiene o disminuye su abundancia relativa, se es posible observar aumento de *Acinetobacter* (+4,1%), *Carnobacterium* (+1,6%), *Dorea* (+0,7%), *Comamonas* (+0,1%) y *Lachnospira* (+0,3%). De esta forma es posible observar que el mayor componente del microbioma intestinal, luego de dos semanas de tratamiento con kéfir, es el género bacteriano *Acinetobacter*, seguido de *Ruminococcus*, *Faecalibacterium* y *Bacteroides*.

**Tabla 14:** Abundancia relativa a nivel de géneros presentes en la microbiota intestinal pre y post intervención

<b>GÉNERO</b>	<b>PRE INTERVENCIÓN</b>	<b>POST INTERVENCIÓN</b>
<i>Acidaminococcus</i>	0,2%	0,1%
<i>Acinetobacter</i>	2,2%	6,3%
<i>Akkernansia</i>	1,4%	0,5%
<i>Bacteroides</i>	7,1%	1,9%
<i>Bifidobacterium</i>	0,4%	1,0%
<i>Blautia</i>	3,2%	1,5%
<i>Bulleidia</i>	0,9%	0,8%
<i>Butyricimonas</i>	0,1%	0,0%
<i>Carnobacterium</i>	0,0%	1,6%
<i>Catenibacterium</i>	1,1%	0,0%
<i>Cf231</i>	0,1%	0,0%
<i>Citrobacter</i>	0,3%	0,0%
<i>Clostridium</i>	0,5%	0,5%
<i>Collinsella</i>	1,9%	1,9%
<i>Comamonas</i>	0,0%	0,1%
<i>Coprococcus</i>	0,7%	1,8%
<i>Desulfovibrio</i>	0,1%	0,0%
<i>Dialister</i>	1,6%	0,4%
<i>Dorea</i>	1,1%	1,8%
<i>Eubacterium</i>	2,1%	1,2%
<i>Faecalibacterium</i>	4,7%	2,5%
<i>Lachnospira</i>	0,5%	0,8%
<i>Lactobacillus</i>	1,0%	0,4%
<i>Methanobrevibacter</i>	1,1%	0,7%
<i>Mitsuokella</i>	0,1%	0,0%
<i>Odoribacter</i>	0,1%	0,0%
<i>Oscillospira</i>	1,1%	0,7%
<b>Otro</b>	2,4%	3,1%
<b>P-75-A5</b>	0,1%	0,1%
<i>Parabacteroides</i>	0,2%	0,1%
<i>Peptococcus</i>	0,1%	0,1%
<i>Phascolarctobacterium</i>	0,3%	0,1%
<i>Prevotella</i>	2,5%	1,2%
<i>Pseudomonas</i>	0,6%	0,1%
<i>Roseburia</i>	0,0%	0,0%
<i>Ruminococcus</i>	4,9%	4,8%
<i>Slackia</i>	0,2%	0,3%
<i>Streptococcus</i>	0,5%	0,6%
<i>Sutterella</i>	0,1%	0,0%

### III. Parámetros Metabólicos: mediciones de glucosa en ayunas y perfil lipídico

Los resultados de las mediciones bioquímicas realizadas a cada grupo durante el estudio se presentan en la Tabla 15.

**Tabla 15:** Niveles plasmáticos de glucosa, colesterol total y triglicéridos en ayunas durante la intervención

<b>Variables</b>	<b>Probiótico kéfir: Media <math>\pm</math> R.I.C. (n = 10)</b>	<b>Placebo: Media <math>\pm</math> R.I.C. (n = 10)</b>	<b>Pa</b>
<b>Glucosa en ayunas (mg/dl)</b>			
Previo a la intervención	129,00 $\pm$ 70,25	109,40 $\pm$ 37,00	0,393
Posterior a la intervención	126,80 $\pm$ 66,00	117,30 $\pm$ 49,50	0,912
P-P $\Delta$	-2,20	7,90	
<b>Pb</b>	0,202	0,307	
<b>Colesterol total (mg/dl)</b>			
Previo a la intervención	209,30 $\pm$ 81,25	194,50 $\pm$ 58,00	0,353
Posterior a la intervención	206,20 $\pm$ 66,75	193,40 $\pm$ 57,75	0,436
P-P $\Delta$	-3,10	-1,10	
<b>Pb</b>	0,528	0,753	
<b>Triglicéridos plasmáticos (mg/dl)</b>			
Previo a la intervención	216,00 $\pm$ 130,75	184,90 $\pm$ 159,50	0,631
Posterior a la intervención	194,90 $\pm$ 113,35	181,30 $\pm$ 94,25	0,631
P-P $\Delta$	-21,10	-3,60	
<b>Pb</b>	0,028*	0,674	

R.I.C.: Rango intercuartílico

Pa: Obtenido de U de Mann-Whitney

Pb: Obtenido de Wilcoxon

P-P $\Delta$ : Diferencia en las mediciones realizadas previo y posterior a la intervención

\*: Significancia estadística en grupo probiótico al final de la intervención ( $p < 0,05$ )

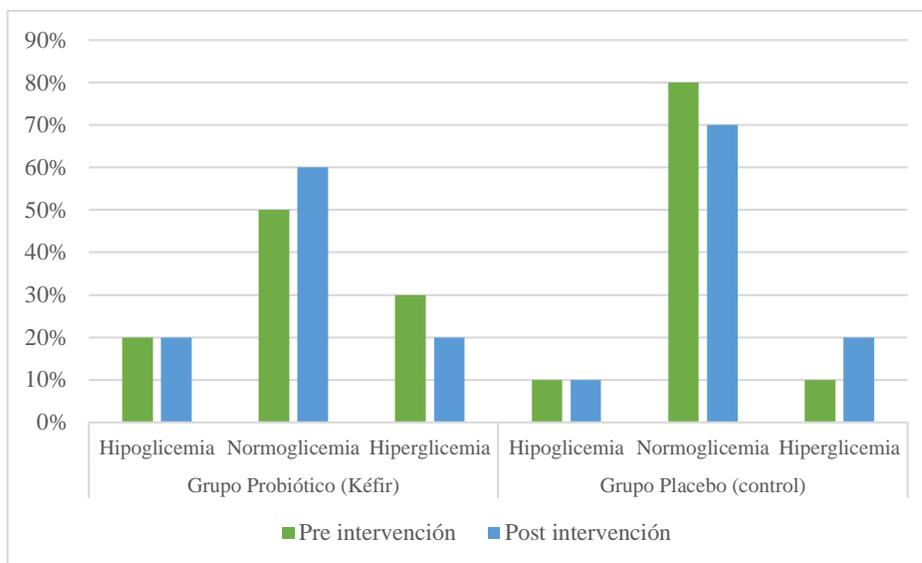
Los niveles de glicemia en ayuna oscilaron entre un rango de 74 a 232 mg/dl previo al comienzo del estudio (76 – 232 mg/dl y 74 – 180 mg/dl grupos probiótico y placebo respectivamente) y uno de 75 a 271 mg/dl al finalizar el mismo (75 – 271 mg/dl grupo probiótico y 78 – 216 mg/dl grupo placebo). A pesar de que en el grupo placebo hubo un aumento de en la media de glicemia al terminar la intervención, la disminución del parámetro por parte de los tratados con kéfir no fue suficiente para alcanzar la significancia estadística. Sin embargo, dos de los tres pacientes asignados al grupo probiótico que presentaron un mal control metabólico (glicemia > 130 mg/dl), demostraron disminución en el parámetro, especialmente uno de los intervenidos el cual alcanzó una disminución de 103 mg/dl al final del estudio (Figura 10).

Similar ocurrió con el parámetro de colesterol total el cual presentó un mínimo de 159 mg/dl y un máximo de 280 mg/dl en el grupo probiótico previo a la intervención, valores que se mantuvieron hasta el término del estudio. Asimismo, no se pudieron identificar diferencias significativas tanto de manera previa como posterior a la intervención al momento de comparar entre los grupos.

En cuanto a los triglicéridos plasmáticos, no se encontraron diferencias al comparar entre los grupos tanto al comienzo con al final del estudio. No obstante, se encontró una disminución significativa ( $p = 0,03$ ) en la media de los triglicéridos al analizar los resultados pre y post intervención del grupo intervenido con kéfir, manteniendo el mínimo de 90 mg/dl y pasando de un valor máximo de 427 a 347 mg/dl.

En la Figura 10, se clasificó a los participantes se acuerdo a los rangos de normalidad establecidos para el parámetro de glicemia en ayunas (Tabla 6).

**Figura 10:** Clasificación de los niveles de glicemia en ayunas presentados por los participantes durante la intervención



Dentro del grupo probiótico se encontró que, al comienzo de la intervención, el 50% de los pacientes presentaba una glicemia en ayunas normal, el 20% se encontraba con hipoglicemia y el 30% restante con hiperglicemia. Las proporciones al final del estudio se mantuvieron para el rango de hipoglicemia, pero la hiperglicemia disminuyó en un 10%, dejando a la mayoría de los intervenidos (60%) con valores de glicemia en ayunas dentro de la normalidad. Por otro lado, en el caso del grupo control (placebo), un 80% presentó normoglicemia al comienzo del estudio, porcentaje que disminuyó una vez finalizado el mismo, aumentando la proporción de hiperglicemia en un 10% para este grupo.

#### IV. Tolerancia digestiva y frecuencia evacuatoria

En las Tablas 16 – 18 se muestran los resultados obtenidos para los parámetros de tolerancia digestiva y frecuencia y dificultad. En la Tabla 16 se aprecia que previo a la intervención, la mayoría de los participantes sufría de algún tipo de malestar gástrico y/o digestivo como hinchazón, acidez y gases. Una vez finalizado el estudio, es posible observar que los malestares mejoraron con el consumo de kéfir puesto que la totalidad del grupo probiótico refirió no presentar la sintomatología anteriormente nombrada, resultados que fueron estadísticamente significativos para los tres ítems medidos al comparar con el grupo control y para hinchazón ( $p = 0,005$ ) y gases ( $p = 0,016$ ) al comparar dentro del grupo.

**Tabla 16:** Malestares gástricos y/o digestivos presentados por los participantes durante la intervención

<b>Variab</b> les	<b>Probiótico kéfir:</b> <b>Frecuencia</b> <b>(n=10)</b>	<b>Placebo:</b> <b>Frecuencia</b> <b>(n=10)</b>	<b>Pa</b>
<b>Hinchazón</b>			
Previo a la intervención	60% (6)	60% (6)	0,675
Posterior a la intervención	0% (0)	50% (5)	0,016*
<b>Pb</b>	0,005***	0,500	
<b>Acidez</b>			
Previo a la intervención	30% (3)	40% (4)	0,500
Posterior a la intervención	0% (0)	40% (4)	0,043*
<b>Pb</b>	0,101	0,675	
<b>Gases</b>			
Previo a la intervención	50% (5)	60% (6)	0,500
Posterior a la intervención	0% (0)	50% (5)	0,016*
<b>Pb</b>	0,016**	0,500	
Pa: Obtenido de Test de Fisher al comparar entre grupos			
Pb: Obtenido de Test de Fisher al comparar en un mismo grupo			
*: Significancia estadística entre los grupos ( $p < 0,05$ )			
***: Significancia estadística dentro de los grupos luego de la intervención ( $p < 0,05$ )			
***: Significancia estadística dentro de los grupos luego de la intervención ( $p < 0,01$ )			

En la Tabla 17, se muestra la frecuencia evacuatoria y la dificultad en la evacuación de los pacientes previo al comienzo y una vez finalizado el estudio. Para la frecuencia evacuatoria es posible observar que, dentro del grupo probiótico, un 80% presentó una frecuencia diaria ( $p = 0,035$ ) y el 20% restante refirió al menos 3 veces por semana una vez terminado el estudio ( $p > 0,05$ ). En cuanto a la dificultad evacuatoria, previo a consumo del yogurt no había mayores diferencias entre los grupos, sin embargo, luego de ocho semanas de tratamiento es posible encontrar mejoras en este parámetro tanto entre los grupos ( $p = 0,016$ ) como dentro del grupo probiótico en donde el 100% de los intervenidos con kéfir no presentó dificultad al evacuar ( $p = 0,005$ ) una vez completado el estudio.

**Tabla 17:** Frecuencia y dificultad evacuatoria presentada por los grupos a lo largo del estudio

Variables		Probiótico kéfir: Frecuencia (n=10)	Placebo: Frecuencia (n=10)	Pa
<b>Frecuencia evacuatoria</b>				
A diario	Previo a la intervención	30% (3)	50% (5)	0,325
	Posterior a la intervención	80% (8)	50% (5)	0,175
	<b>Pb</b>	0,035**	0,672	
3 veces/sem	Previo a la intervención	50% (5)	30% (3)	0,255
	Posterior a la intervención	20% (2)	40% (4)	0,314
	<b>Pb</b>	0,175	0,500	
< 3 veces/sem	Previo a la intervención	20% (2)	20% (2)	0,709
	Posterior a la intervención	0% (0)	10% (1)	0,500
	<b>Pb</b>	0,237	0,500	
<b>Dificultad evacuatoria</b>				
Con dificultad	Previo a la intervención	60% (6)	60% (6)	0,675
	Posterior a la intervención	0% (0)	50% (5)	0,016*
	<b>Pb</b>	0,005***	0,500	
Sin dificultad	Previo a la intervención	40% (4)	40% (4)	0,675
	Posterior a la intervención	100% (10)	50% (5)	0,016*
	<b>Pb</b>	0,005***	0,500	

Pa: Obtenido de Test de Fisher al comparar entre grupos

Pb: Obtenido de Test de Fisher al comparar en un mismo grupo

\*: Significancia estadística entre los grupos ( $p < 0,05$ )

\*\*: Significancia estadística dentro de los grupos luego de la intervención ( $p < 0,05$ )

\*\*\*: Significancia estadística dentro de los grupos luego de la intervención ( $p < 0,01$ )

Al finalizar el estudio, se les realizó a los participantes una encuesta oral en donde se les preguntó si habían notado mejoras tanto en los malestares ya nombrados como en la frecuencia evacuatoria al comparar con el comienzo de la intervención (Tabla 18). El 80% de los participantes intervenidos con kéfir refirió sentir mejoras en cuanto a los malestares digestivos vs solo un 10% del grupo control ( $p > 0,05$ ). Para el ítem de frecuencia evacuatoria, la totalidad del grupo probiótico sintió haber mejorado ( $p < 0,001$ ).

**Tabla 18:** Cambios señalados por los pacientes en cuanto a malestares digestivos y frecuencia evacuatoria una vez finalizado el estudio

<b>Variables</b>	<b>Probiótico kéfir: Frecuencia (n=10)</b>	<b>Placebo: Frecuencia (n=10)</b>	<b>P</b>
<b>Malestares digestivos</b>			0,709
Mejora	80% (8)	10% (1)	
No mejora	20% (2)	90% (9)	
<b>Frecuencia evacuatoria</b>			0,000*
Mejora	100% (10)	20% (2)	
No mejora	0% (0)	80% (8)	
P: Obtenido de Test de Fisher			
*: Significancia estadística entre los grupos ( $P < 0,001$ )			

## DISCUSIÓN

### I. Características generales de la muestra estudiada: demografía, antropometría y alimentación

A nivel nacional, según la última Encuesta de Salud realizada el año 2009 – 2010, la prevalencia de diabetes mellitus es de un 9,4%, liderando las mujeres con un 10,4% y seguidas por los hombres con un 8,4% (34). Estos resultados son extrapolables a lo encontrado en el presente estudio, en donde 70% de la población estudiada corresponde al sexo femenino y sólo un 30% al masculino.

En cuanto al estado nutricional del total de los pacientes, sólo un 15% presentó un estado nutricional normal mientras que el 85% restante padecía de algún grado de malnutrición por exceso (40% sobrepeso y 25% obesidad). Estos porcentajes se asemejan a la realidad nacional, ya que de acuerdo a la ENS 2009 – 2010, un 66,7% de la población chilena sufre algún grado malnutrición de este tipo (34).

En el presente estudio no se encontraron cambios estadísticamente significativos respecto a peso, IMC, nivel de actividad física, tratamiento farmacológico, consumo de energía, proteínas, carbohidratos, fibra dietética, grasas saturadas y grasas monoinsaturadas tanto entre los grupos como dentro de cada uno. No obstante, una vez finalizado el estudio, el consumo de ácidos grasos poliinsaturados presentó diferencias significativas entre el grupo probiótico kéfir y el grupo control. Previo al comienzo de este estudio, se les solicitó a los participantes que no cambiaran sus estilos de vida y/o alimentación, y que reportaran cualquier cambio relevante como modificación en los medicamentos consumidos, comienzo de algún hábito y patologías agudas. Dado que de manera semanal se consultaba la ocurrencia de algún posible cambio, y que la totalidad de los participantes no sufrió modificaciones en

ninguna de las variables nombradas anteriormente, es esperable que las características descriptivas de la muestra se mantuvieran iguales durante las ocho semanas de intervención. A pesar de esto, el grupo probiótico presentó una tendencia a la baja de peso durante el estudio ( $p = 0,06$ ) y con ello, una disminución del IMC ( $p = 0,05$ ).

## **II. Estructura de la microbiota intestinal de personas con diabetes tipo 2 que consumen kéfir, mediante análisis metagenómico de ARNs 16S**

Tanto la microbiota intestinal de un individuo sano como la de uno con diabetes mellitus tipo 2, está compuesta principalmente por los phylum Firmicutes y Bacteroidetes (38). La diferencia entre ambos radica en la proporción de bacterias por división de clase, orden, familia y géneros bacterianos entre los dos phylum anteriormente nombrados y el phylum Actinobacteria principalmente (40). En el presente estudio fue posible observar diferencias entre los principales phylums microbianos presentes en las heces de los pacientes pre y post intervención. Luego de consumir 150 g/d (conteniendo en promedio  $3,3 \times 10^8$  ufc/g de bacterias viables) de kéfir durante dos semanas, se encontró un aumento en la proporción de Firmicutes (+5,6%) y Actinobacterias (+2,2%), y una disminución en el porcentaje de Bacteroidetes (-7,6%) y Proteobacterias (-1,0%).

La literatura describe a Bacteroides, Prevotella y algunos Firmicutes como *Faecalibacterium* y *Ruminococcus* como los principales géneros bacterianos en sujetos sanos (84). Al comparar con los resultados obtenidos en el estudio, si bien es posible encontrar los géneros mencionados, la microbiota de los pacientes estudiados estaba representada principalmente por los géneros *Bacteroides*, *Faecalibacterium*, *Ruminococcus* y *Blautia*.

En cuanto a estudios que relacionen la microbiota intestinal con DM2, destacan los estudios realizados por Karlsson et al. (50) y Qin et al. (54) conducidos en Suecia y China respectivamente. En ellos, se encontró que las bacterias productoras de butirato *Roseburia* y *Faecalibacterium prausnitzii*, ambos del phylum Firmicutes y clase Clostridia, presentaban menor abundancia en pacientes con la patología (85). Es sabido que las bacterias que producen butirato (mayoritariamente Firmicutes Gram positivas) compiten con bacterias Gram negativas y mantienen en equilibrio la microbiota, evitando que cepas patógenas se reproduzcan a nivel intestinal (86). A pesar de esto, ninguno de los pacientes intervenidos en este estudio presentó la bacteria productora de butirato *Roseburia* y, se observó una disminución en la proporción del género *Faecalibacterium* luego del tratamiento con kéfir. Sin embargo, sí fue posible encontrar aumento de otras bacterias productoras de butirato como lo son los Clostridiales *Coprococcus* y *Lachnospiraceae* (86), indicando que el consumo de kéfir ayudaría a mantener el equilibrio de la MI y con ello, a disminuir la permeabilidad de la barrera intestinal.

Dentro del phylum Firmicutes, se encuentra el género bacteriano *Blautia* el cual, a pesar de ser un Firmicutes, no corresponde a una bacteria productora de butirato (87). En el presente estudio, esta bacteria fue una de las que presentó mayor proporción previo a la intervención, sin embargo, una vez transcurridas las dos semanas de tratamiento la proporción disminuyó. Esto puede relacionarse con un efecto beneficioso del kéfir puesto que según Tuovinen et al. *Blautia coccooides* tendría la capacidad de activar la secreción de citoquinas proinflamatorias en una medida aún mayor que los lipopolisacáridos (88). Así, al consumir kéfir y disminuir la abundancia relativa de este microorganismo se inhibiría la secreción de citoquinas proinflamatorias y, con esto, la estimulación de vías intracelulares de

señalización como el factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) y la vía de las MAPK/ERK, las cuales promueven mediadores como TNF- $\alpha$  e IL-6, y suprimen la expresión de los receptores de insulina IRS-1 e IRS-2 respectivamente (46, 47), por lo que el kéfir ayudaría a disminuir la inflamación crónica de la DM2 y a regular el metabolismo de la glucosa.

Se han identificado tres enterotipos de microbiota (89), y la asignación de un microbioma individual a un enterotipo se basa en el enriquecimiento relativo de dicho microbioma en uno de los tres géneros bacterianos: *Bacteroides* (enterotipo 1), *Prevotella* (enterotipo 2), o *Ruminococcus* (enterotipo 3). En el presente estudio, dentro del phylum Bacteroidetes, el género *Bacteroides* fue prevalente, por lo tanto, los microbiomas intestinales de los participantes al comienzo del estudio se clasifican dentro del enterotipo 1. Una vez realizada la intervención fue prevalente, dentro del phylum Firmicutes, el género *Ruminococcus*, por lo cual los participantes pasan a clasificarse dentro del enterotipo 3. Un estudio realizado por Larsen et al. que compara la composición de la microbiota intestinal de pacientes diabéticos tipo 2 con individuos sanos, encontró que la proporción de Bacteroidetes y Proteobacterias era mayor en diabetes, y que la abundancia de Firmicutes era significativamente menor al comparar con sujetos sanos (89). De acuerdo a esto, es posible inferir que el enterotipo 1, el cual se asocia a mayor cantidad de phylum Bacteroidetes y el cual era presentado por los pacientes antes de que fueran intervenidos, se asocia a la presencia de un estado diabético. Asimismo, la presencia de géneros pertenecientes al phylum Firmicutes y, por tanto, la clasificación dentro del enterotipo 3, se asocia a la microbiota intestinal de individuos sanos, por lo que es posible decir que la intervención con kéfir durante dos semanas muestra restitución de la microbiota intestinal a proporciones de bacterias dentro de los rangos normales para un sujeto sano.

En este estudio fue posible observar una disminución de *Bacteroides* y *Prevotella* de 7,1% a 0% y de 2,5% a 0%, respectivamente, una vez transcurridas dos semanas de consumo del probiótico. Estos resultados se respaldan por estudios que muestran que una reducción en estos géneros bacterianos se relaciona con una disminución de la endotoxemia metabólica e inflamación en ratas con diabetes mellitus tipo 2 (90).

La diabetes mellitus tipo 2 se asocia a una disminución de Firmicutes y Clostridia al comparar con sujetos sanos (89). En este estudio, estas bacterias fueron el phylum y clase bacterianos que presentaron mayor proporción antes del consumo de kéfir, lo que se mantuvo luego de las dos semanas de tratamiento ya que ambas aumentaron su abundancia relativa.

Otra de las alteraciones evidenciadas en la microbiota intestinal en pacientes diabéticos, es la disminución de la bacteria antiinflamatoria *Bifidobacterium* (91). En este estudio, la abundancia relativa de *Bifidobacterium* fue de sólo 0,4% previo a la intervención, proporción que aumentó a 1,0% con el tratamiento con kéfir, demostrando que el consumo del probiótico promueve el aumento de este tipo de bacterias las cuales son capaces de convertir ácidos orgánicos, producidos durante la fermentación de carbohidratos, en butirato a través de interacciones de alimentación cruzada (91).

Se debe destacar que todos los participantes de este estudio se encontraban en tratamiento con el hipoglicemiante oral metformina. Si bien la información disponible acerca de la relación entre metformina y microbiota es más bien acotada, existen algunos estudios acerca de los efectos de este fármaco sobre la microbiota intestinal de pacientes diabéticos. Un estudio realizado por Shin et al. en ratas diabéticas obesas que consumían una dieta alta en grasa encontró un aumento en las proporciones de los géneros bacterianos *Anaerotruncus*, *Parabacteroides*, *Odoribacter* y *Blautia*, sin embargo, los investigadores vieron que al

tratarlas con metformina estas alteraciones disminuían (51). Resultados similares fueron encontrados en la presente investigación, en la cual la proporción de las bacterias mencionadas fue más bien baja, con la excepción de *Blautia* el cual fue el género bacteriano con la tercera mayor proporción. A esto se suma que luego de la intervención, estas bacterias disminuyeron quedando *Anaerotruncus* y *Odoribacter* con un 0%, *Parabacteroides* con 0,1% y *Blautia* con un 1,5%.

Niveles altos de *Lactobacillus* han sido reportados en relación a DM2 en modelos con roedores (90) y a obesidad en modelos humanos (92, 93) y se ha visto que el consumo de metformina disminuye la proporción de estas bacterias. *Lactobacillus* representa un grupo heterogéneo con bien documentadas propiedades inmunomoduladoras, y podría contribuir a la inflamación crónica en sujetos diabéticos (94). Este género bacteriano no presentaba niveles característicamente altos en este estudio lo que podría estar relacionado a la terapia con metformina. En cuanto al efecto del kéfir sobre este tipo de bacterias, su proporción disminuyó a 0% luego del consumo del yogurt probiótico.

Estudios conducidos tanto a nivel animal (52) como humano (50) relacionan a la DM2 con una disminución de *Akkermansia muciniphila* (phylum Verrucromicrobia), bacteria que se asocia a la secreción de GLP-1 por parte de las células L, las cuales forman una comunidad simbiótica de células y mejoran la barrera intestinal al reducir su permeabilidad (95). Se ha demostrado que el tratamiento con metformina aumenta la proporción de *Akkermansia*, por lo que este fármaco contribuiría a reducir la permeabilidad de la barrera intestinal y mejoraría la endotoxemia metabólica característica de la diabetes. En el presente estudio, el 40% de los intervenidos no presentó el género bacteriano *Akkermansia*, mientras que la abundancia relativa promedio fue de 1,4% antes del consumo de kéfir. Si bien no es posible saber si esta

proporción era mayor o menor antes de que los participantes comenzaran a utilizar metformina, se puede asumir que, como la mayoría de los pacientes presentó un buen control metabólico incluso antes de comenzada la intervención, la metformina estaría ejerciendo su efecto tanto de aumentar los niveles de *Akkermansia* y mejorar la barrera intestinal, como de insulinosensibilizador e hipoglicemiante. Por otro lado, luego de consumir kéfir durante dos semanas, se observó una disminución en el phylum Verrucomicrobia, presentando disminución en la proporción del género bacteriano *Akkermansia* en el 100% de los pacientes que presentaban abundancia relativa de este microorganismo previo a la intervención.

### **III. Parámetros metabólicos de control en pacientes con diabetes tipo 2**

#### Glicemia en ayunas

El efecto antidiabético de los alimentos probióticos, entre ellos el kéfir, ha sido investigado en varios estudios en animales y humanos (61, 66, 67, 96), demostrando que el tratamiento con éstos puede reducir los niveles de glucosa plasmática al presentarse un estado diabético. Los posibles mecanismos que explican el efecto hipoglicémico postulan que los probióticos afectan a las bacterias intestinales para producir polipéptidos insulínotropicos y péptido similar al glucagón 1 (GLP-1), induciendo de esta forma la captación de glucosa por el músculo. También, el hígado estimula una mayor absorción de glucosa sanguínea en forma de glucógeno (97).

En el presente estudio, no se pudo demostrar ningún efecto significativo en la disminución de los niveles de glucosa en ayuno de pacientes diabéticos tipo 2 en tratamiento con metformina luego de tratarlos con 150 g diarios (conteniendo en promedio  $3,3 \times 10^8$  ufc/g de bacterias viables) de probiótico kéfir durante 8 semanas.

Existen distintos estudios que han obtenido resultados similares a los de esta investigación. Un ejemplo de ello fue la investigación realizada por Mazloom Z. et al donde la administración de cápsulas probióticas que contenían *Lactobacillus* no tuvo efectos favorables sobre los niveles de glucosa en sangre en ayunas, la resistencia a la insulina y los lípidos sanguíneos, después de 6 semanas de intervención a pacientes diabéticos tipo 2 que estuvieran o no en tratamiento con metformina u otro hipoglicemiante (69).

Al analizar los resultados del grupo placebo, el leve deterioro de la glucosa plasmática en ayunas (sin significancia estadística) durante las 8 semanas del estudio, puede explicarse por la naturaleza progresiva de la DM2, con una disminución en la función de las células  $\beta$ -pancreáticas. Así lo presenta Hove et al., quien realizó un ensayo clínico controlado de 12 semanas de duración con pacientes diabéticos tipos 2, donde dieron 300 ml de yogurt Cardi04, conteniendo *Lactobacillus* para el grupo intervenido y leche acidificada artificialmente para el grupo control, y en el cual vieron que en el grupo placebo la secreción de insulina, determinada por el péptido C, estaba significativamente disminuida luego de tratar con el yogurt (98).

Es importante mencionar también que la totalidad de los participantes de este estudio estaban con tratamiento farmacológico para el control de la diabetes mellitus tipo 2, por lo que sería interesante medir el efecto del probiótico kéfir en pacientes que estén sólo cambios en el estilo de vida.

Al momento de analizar los resultados, es importante tomar en cuenta que la mayoría de los pacientes presentaba niveles de glicemia dentro del rango normal, encontrándose un 20% de los pacientes del grupo probiótico con hipoglicemia. Esto podría ayudar a explicar la baja no significativa este parámetro, ya que los pacientes tenían un buen control metabólico

incluso antes de comenzar la intervención; de la misma forma, en aquellos pacientes con hipoglicemia, la disminución de los niveles de glicemia en ayunas no sería favorable para su salud. Estos resultados hacen necesario la realización de un futuro estudio donde se incluya como criterio de inclusión tener un mal control metabólico.

### Perfil lipídico

Los resultados para el parámetro de colesterol total, tanto dentro como entre los grupos, no se alcanzaron la significancia estadística. En cuanto a los niveles de triglicéridos, si bien hubo una disminución más bien marcada entre los grupos al terminar el estudio, este valor no fue significativo ( $p > 0,05$ ). Resultados similares a los encontrados en el estudio fueron descritos por Mohamadshahi et al. donde luego de 8 semanas de tratamiento con 300 g/d de yogurt probiótico (*Lactobacillus acidophilus* La-5 y *Bifidobacterium lactis* Bb-12) no tuvo efectos sobre los triglicéridos y colesterol total en comparación con el grupo placebo (99). En el estudio de St-Onge et al, el consumo de kéfir (500 ml/d por 4 semanas) por hombres hiperlipidémicos no afectó los niveles de colesterol total, c-LDL, c-HDL y triglicéridos (100). Por otro lado, similar a lo ocurrido en este estudio, Mazloom et al. encontró que luego de tratar diabéticos durante seis semanas con cápsulas probióticas, la concentración sérica de triglicéridos entre los grupos disminuyó, pero el cambio no fue estadísticamente significativo (69).

A pesar de esto, en el presente estudio, sí se encontraron diferencias significativas en cuanto a los niveles plasmáticos de triglicéridos en el grupo probiótico, los cuales disminuyeron en 21,10 mg/dl una vez finalizado en estudio ( $p = 0,03$ ). Estos resultados coinciden con los encontrados en un metaanálisis conducido por Sharma et al., el cual concluyó que la suplementación con probióticos disminuye los niveles séricos de

triglicéridos y c-LDL de manera significativa y, por lo tanto, reduce el factor de riesgo de desarrollar enfermedad coronaria (101).

Es importante mencionar que en el presente estudio sólo se midieron colesterol total y triglicéridos plasmáticos, pero no c-LDL ni c-HDL, por lo que no se puede concluir en cuanto al efecto del probiótico en estos parámetros. Así, esto debe ser tomando en cuenta al realizar un próximo ensayo clínico, con el fin de conocer los efectos del probiótico de manera más exacta.

Las posibles razones que pueden explicar los resultados obtenidos en este estudio, son las diferencias entre los probióticos utilizados, ya que la mayoría de los estudios utilizan cepas aisladas y no un consorcio metabólico como es el kéfir. Otro factor importante a considerar son las diferencias genéticas de los pacientes, al igual que el hecho de que los participantes del presente estudio presentaban un control metabólico relativamente estable y dentro de los rangos normales, lo que puede afectar en la disminución de los parámetros metabólicos. Por otro lado, la cantidad de yogurt diaria entregada en este estudio pudo guardar relación con los resultados obtenidos, puesto que, en casi la totalidad de los ensayos clínicos realizados de este tipo, la cantidad utilizada era mayor. También pueden afectar el pequeño tamaño de la muestra, definido como tal debido a la dificultad de encontrar pacientes que estuvieran dispuestos a participar del estudio y que cumplieran con la totalidad de los criterios de inclusión; a esto se suma la duración acotada del estudio. Por último, también puede influir el método utilizado para la medición de los parámetros metabólicos, puesto que el glucómetro Accutrend® Plus de la marca Roche si bien tiene un buen nivel de veracidad y exactitud, así como una baja imprecisión, no es igual a la medición realizada con el método de referencia para cada parámetro, puesto que los intervalos de medición del glucómetro son

acotados y necesita de condiciones específicas como rangos de temperatura, cantidad de sangre y humedad relativa.

#### **IV. Consumo de kéfir y su efecto en la tolerancia digestiva y frecuencia evacuatoria**

La evidencia sugiere que los probióticos pueden contribuir a la mejora de los síntomas de la constipación y la justificación para su uso se basa en datos que demuestran diferencias en la microbiota intestinal entre sujetos constipados y sanos, aunque se sabe poco acerca de los resultados cuantitativos o cambios cualitativos en las bacterias u otros organismos bajo estas condiciones (102). Khalif et al. demostraron que las poblaciones de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* se redujeron en pacientes adultos con estreñimiento (103).

Un 100% de los intervenidos con kéfir en el presente estudio señalaron mejoras en cuanto a la frecuencia evacuatoria ( $p < 0,01$ ) y un 80% lo hizo respecto a los malestares gástricos y/o digestivos. Al analizar la microbiota intestinal, es posible ver que la cantidad de *Bifidobacterium* aumentaron levemente, sin embargo, la abundancia relativa de *Lactobacillus* no aumentó, sino que disminuyó a pesar de las mejoras anteriormente descritas, difiriendo de lo dicho por Khalif et al. en su estudio (103). Esto puede deberse a que en el presente estudio el grupo de interés eran diabéticos en tratamiento con metformina y no adultos sanos.

Un estudio realizado por Möllenbrink y Bruckschen trató a 70 pacientes constipados con *E. coli* Nisle 1917 o placebo, y demostraron que luego de cuatro y ocho semanas de tratamiento, el número promedio de heces por semana fue significativamente mayor en el grupo probiótico (104). Asimismo, Koebnick et al. evaluaron los efectos de *Lactobacillus casei* Shirota en 70 pacientes con estreñimiento crónico, y vieron que el grupo probiótico presentó mejoras en la gravedad autoinformada de la constipación y en la consistencia de las

heces luego de cuatro semanas (105). Un tercer ensayo clínico controlado conducido por Yang et al. administró un lácteo fermentado que contenía *Bifidobacterium lactis* DN173010 durante dos semanas y demostraron que el grupo probiótico tenía una frecuencia evacuatoria significativamente mayor (106).

En cuanto a la relación entre frecuencia evacuatoria y kéfir, resultados similares a los del presente estudio fueron encontrados por Turan et al. quien trató con este probiótico a pacientes con constipación y encontró al final del estudio que éstos presentaban mejoras en la frecuencia evacuatoria, consistencia de las heces y disminución en el consumo de laxantes (107).

Concordante con lo anteriormente expuesto, el presente estudio proporciona evidencia de que el probiótico kéfir puede mejorar la frecuencia evacuatoria y los síntomas de malestar gástrico y/o digestivos en adultos diabéticos tipo 2 tratados con metformina.

## CONCLUSIONES

- Los individuos con diabetes mellitus tipo 2 tratados en el estudio metagenómico, presentan una microbiota intestinal compuesta principalmente por bacterias pertenecientes al phylum Firmicutes.
- El consumo de 150 g diarios kéfir (conteniendo en promedio  $3,3 \times 10^8$  ufc/g) durante dos semanas es suficiente para producir cambios en la microbiota intestinal de sujetos diabéticos tipo 2 en tratamiento con metformina.
- El consumo de 150 g diarios kéfir (conteniendo en promedio  $3,3 \times 10^8$  ufc/g) durante dos semanas afectó la abundancia relativa de la microbiota intestinal de sujetos diabéticos tipo 2, aumentado la proporción de Firmicutes y Actinobacteria y disminuyendo la de Bacteroidetes, Proteobacteria y Verrucomicrobia.
- El consumo de 150 g diarios kéfir (conteniendo en promedio  $3,3 \times 10^8$  ufc/g) durante dos semanas generó la restitución de la microbiota intestinal a un enterotipo asociado a individuos sanos.
- Es posible asociar el consumo de kéfir a efectos positivos en la salud de las personas al encontrar en mayor abundancia a bacterias Clostridiales como los géneros *Coprococcus* y *Lachnospira*, ambos productores de butirato el cual se relaciona con reducir los efectos negativos de los procesos inflamatorios presentes en pacientes diabéticos tipo 2.

- El consumo de 150 g diarios de kéfir (conteniendo en promedio  $3,3 \times 10^8$  ufc/g) durante ocho semanas por pacientes diabéticos tipo 2 tratados con metformina no generó aumento o disminución estadísticamente significativa en la glicemia y colesterol total de los pacientes tratados.
- El consumo de 150 g diarios de kéfir (conteniendo en promedio  $3,3 \times 10^8$  ufc/g) por ocho semanas redujo significativamente (según Wilcoxon) los niveles de triglicéridos de una media de  $216,00 \pm 130,75$  mg/dl a una de  $194,90 \pm 113,35$  mg/dl en los sujetos con diabetes mellitus tipo 2 tratados con el probiótico.
- El consumo de kéfir durante un tiempo sostenido de ocho semanas mejoró síntomas comunes como hinchazón, gases y acidez, además de mejorar la frecuencia evacuatoria de pacientes diabéticos tipo 2, lo cual fue estadísticamente significativo según el Test de Fisher.

## REFERENCIAS

- (1) Metchnikoff E et al. Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction. In: The prolongation of life: Optimistic studies. Ed Heinemann W. London 1907; 161-183.
- (2) Parvez S, Malik KA, Ah Kang S, Kim HY. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of applied microbiology*, 2006; 100(6): 1171-85.
- (3) FAO/WHO. FAO Food and Nutrition paper. In: Probiotics in food: Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. Ed FAO and WHO. 2006; 1-48.
- (4) Ashwell M. Conceptos sobre los alimentos funcionales. In: ILSI Europe Concise Monograph Series: International Life Science Institute. Ed Roberfroid M. 2004; 1-39.
- (5) Varela G. Alimentos funcionales. In: Alimentos funcionalesy salud en la tapa infantil y juvenil. Ed Aranceta J. Editorial médica Panamericana. 2010; 1-19.
- (6) Binns N. Perspectives on ILSI's International Activities on Functional Foods. Report commissioned by the ILSI Europe Functional Foods Task Force, 2009: 1-59.
- (7) Guarner F, Perdigon G, Corthier G, Salminen S, Koletzko B, Morelli L. Should yoghurt cultures be considered probiotic? *The British journal of nutrition*, 2005; 93(6): 783-6.
- (8) Cáceres, P., Gotteland, M. Probiotics in chile: which are the strains and what are their effects on human health?. *Revista Chilena de Nutrición*, 2010; 37(1): 97-109.
- (9) Otles S, Cagindi O. Kefir: A Probiotic Dairy-Composition, Nutritional and Therapeutic Aspects. *Pakistan Journal of Nutrition*, 2003; 2(2): 54-59.
- (10) Farnworth E. Kefir – a complex probiotic. *Food Science and Technol*, 2005; 2: 1-17.
- (11) Gilbert, J. A. et ál. Metagenomics. A foundling finds its feet. *Standards in Genomic Sciences*, 2010; 3(2): 212-213.
- (12) Jurkowski, A. & Handelsman, J. Metagenomics. *Nature Reviews Microbiology*, 2008; 34: 1-6.
- (13) Nalbantoglu U, Cakar A, Dogan H, Abaci N, Ustek D. Metagenomic analysis of the microbial community in kefir grains. *Food Microbiol*, 2014; 41: 42-51.
- (14) Gao J., Gu F., He J., Xiao J., Chen Q., Ruan H., et al. Metagenome analysis of bacterial diversity in Tibetan kefir grains. *Eur. Food Res. Technol*, 2013; 236: 549–556.
- (15) Korsak N, Taminiau B, Leclercq M, Nezer C, Crevecoeur S, Ferauche C, Detry E, Delcenserie V, Daube G. Short communication: Evaluation of the microbiota of kefir samples using metagenetic analysis targeting the 16S and 26S ribosomal DNA fragments. *J Dairy Sci*, 2015; 98(6): 3684-9.

- (16) Zamberi NR, Mohamad NE, Yeap SK, Ky H, Beh BK, Liew WC, Tan SW, Ho WY, et al. 16S Metagenomic Microbial Composition Analysis of Kefir Grain using MEGAN and BaseSpace. *Food Biotechnol*, 2016; 30: 219-230.
- (17) Sarkar S. Potential of kefir as a dietetic beverage - a review. *Br Food J*, 2007; 109: 280-290.
- (18) Hertzler S, Clancy S. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion, 2003; 103: 582-587.
- (19) De Oliveira Leite AM, Miguel MAL, Peixoto RS, Rosado AS, Silva JT, Paschoalin VMF. Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2013; 44(2): 341-349.
- (20) Khoury N, El-Hayek S, Tarras O, El-Sabban M, El-Sibai M, Rizk S. Kefir exhibits anti-proliferative and pro-apoptotic effects on colon adenocarcinoma cells with no significant effects on cell migration and invasion. *Int J Oncol*, 2014; 45(5): 2117-27.
- (21) Liu JR, Wang SY, Lin YY, Lin CW. Antitumor activity of milk kefir and soy milk kefir in tumor-bearing mice. *Nutrition and cancer*, 2002; 44(2): 183-7.
- (22) Rodrigues KL, Caputo LR, Carvalho JC, Evangelista J, Schneedorf JM. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. *Int J Antimicrob Agents*, 2005; 25(5): 404-8.
- (23) Miao J, Guo H, Chen F, Zhao L, He L, Ou Y, Huang M, Zhang Y, Guo B, Cao Y, Huang Q. Antibacterial Effects of a Cell-Penetrating Peptide Isolated from Kefir. *J Agric Food Chem*, 2016; 64(16): 3234-42.
- (24) Vinderola C, Duarte J, Thangavel D. Immunomodulating capacity of kefir. *Journal of Dairy Research*, 2005; 72: 115-202.
- (25) Chen HL, Tung YT, Chuang CH, Tu MY, Tsai TC, Chang SY, Chen CM. Kefir improves bone mass and microarchitecture in an ovariectomized rat model of postmenopausal osteoporosis. *Osteoporos Int*, 2015; 26(2): 589-99.
- (26) Friques AGF, Arpini CM, Kalil IC, et al. Chronic administration of the probiotic kefir improves the endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Translational Medicine*, 2015; 13: 390.
- (27) Li C, Li X, Han H, et al. Effect of probiotics on metabolic profiles in type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis of randomized, controlled trials. *Adrian. TE, ed. Medicine*, 2016; 95(26): e4088.
- (28) Guzel-Seydim ZB, Kok-Tas T, Greene AK, Seydim AC. Review: functional properties of kefir. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2011; 51(3): 261-8.

- (29) Alwan A et al. Monitoring and surveillance of chronic non-communicable diseases: progress and capacity in high-burden countries. *The Lancet*, 2010; 376:1861-1868.
- (30) Organización Mundial de la Salud OMS (2015). Enfermedades no transmisibles. Disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs355/es/>. Acceso 27 junio 2016.
- (31) Organización Mundial de la Salud OMS (2014). Global status report on alcohol and health 2014. Disponible en: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112736/1/9789240692763\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112736/1/9789240692763_eng.pdf?ua=1). Acceso 8 mayo 2016.
- (32) Organización Mundial de la Salud OMS (2016). Día Mundial de la Salud 2016: diabetes. Disponible en: <http://www.who.int/campaigns/world-health-day/2016/event/es/>. Acceso 8 mayo 2016.
- (33) Rodger W. Non-insulin-dependent (type II) diabetes mellitus. *CMAJ: Canadian Medical Association Journal*, 1991; 145(12): 1571-1581.
- (34) Ministerio de Salud. Encuesta Nacional de Salud ENS 2009-2010. Disponible en: <http://web.minsal.cl/portal/url/item/bcb03d7bc28b64dfe040010165012d23.pdf>. Acceso 8 mayo 2016.
- (35) Organización Mundial de la Salud OMS (2016). Diabetes: perfiles de los países 2016. Disponible en: <http://www.who.int/diabetes/country-profiles/es/>. Acceso 8 de mayo 2016.
- (36) World Health Organization 2006. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia: report of WHO/IDF. Disponible en: [http://www.who.int/diabetes/publications/Definition%20and%20diagnosis%20of%20diabetes\\_new.pdf](http://www.who.int/diabetes/publications/Definition%20and%20diagnosis%20of%20diabetes_new.pdf). Acceso el 8 de mayo 2016.
- (37) Gotteland, M. The role of intestinal microbiota in the development of obesity and type-2 diabetes. *Rev. Chil. Endocrinol*, 2013; 6(4): 155-162.
- (38) Moreno-Indias I, Cardona F, Tinahones FJ, Queipo-Ortuño MI. Impact of the gut microbiota on the development of obesity and type 2 diabetes mellitus. *Frontiers in Microbiology*, 2014; 5: 190.
- (39) Blandino G, Inturri R, Lazzara F, Di Rosa M, Malaguarnera L. Impact of gut microbiota on diabetes mellitus. *Diabetes & metabolism*, 2016; 42(5): 303-315.
- (40) Zhang Y, Zhang H. Microbiota associated with type 2 diabetes and its related complications. *Food Science and Human Wellness*, 2013; 2:167-172.

- (41) Puddu A, Sanguineti R, Montecucco F, Viviani GL. Evidence for the gut microbiota short-chain fatty acids as key pathophysiological molecules improving diabetes. *Mediators Inflamm*, 2014; 2014: 1620-21.
- (42) Den Besten G, van Eunen K, Groen AK, Venema K, Reijngoud D-J, Bakker BM. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of Lipid Research*, 2013; 54(9): 2325-2340.
- (43) Wang H-B, Wang P-Y, Wang X, Wan Y-L, Liu Y-C. Butyrate Enhances Intestinal Epithelial Barrier Function via Up-Regulation of Tight Junction Protein Claudin-1 Transcription. *Digestive Diseases and Sciences*, 2012; 57(12): 3126-35.
- (44) Musso G, Gambino R, Cassader M. Obesity, Diabetes, and Gut Microbiota: The hygiene hypothesis expanded? *Diabetes Care*, 2010; 33(10): 2277-2284.
- (45) Farías N MM, Silva B C, Rozowski N J. Microbiota intestinal: rol en obesidad. *Revista chilena de nutrición*, 2011; 38: 228-33.
- (46) Cani PD, Delzenne NM. The gut microbiome as therapeutic target. *Pharmacol Ther*, 2011; 130(2): 202-12.
- (47) Fujishiro M1, Gotoh Y, Katagiri H, Sakoda H. Three mitogen-activated protein kinases inhibit insulin signaling by different mechanisms in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol*, 2003; 17(3): 487-97.
- (48) Rotella CM, Monami M, Mannucci E. Metformin beyond diabetes: new life for an old drug. *Curr. Diabetes Rev*, 2006; 2: 307-315.
- (49) Wilcock C, Bailey CJ. Accumulation of metformin by tissues of the normal and diabetic mouse. *Xenobiotica*, 1994; 24: 49-57.
- (50) Karlsson FH, Tremaroli V, Nookaew I, et al. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature*, 2013; 498: 99-103.
- (51) Shin NR, Lee JC, Lee HY, Kim MS, Whon TW, Lee MS, Bae JW. 2013. An increase in the *Akkermansia* spp. population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in diet-induced obese mice. *Gut*, 2014; 63: 727-735.
- (52) Lee H, Ko G. Effect of metformin on metabolic improvement and gut microbiota. *Appl Environ Microbiol*, 2014; 80(19): 5935-43.
- (53) Forslund K, Hildebrand F, Nielsen T, et al. Disentangling the effects of type 2 diabetes and metformin on the human gut microbiota. *Nature*, 2015; 528(7581): 262-266.
- (54) Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, Liang S, Zhang W. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*, 2012; 490(7418) :55-60.

- (55) Mardinoglu A, Boren J, Smith U. Confounding Effects of Metformin on the Human Gut Microbiome in Type 2 Diabetes. *Cell Metab*, 2016; 23(1): 10-2.
- (56) Hemarajata P, Versalovic J. Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 2013; 6(1): 39-51.
- (57) Cani PD, Neyrinck AM, Fava F, et al. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia*, 2007; 50(11): 2374-83.
- (58) American Diabetes A. 5. Glycemic Targets. *Diabetes care*, 2016; 39 Suppl 1: S39-46
- (59) Ministerio de Salud (MINSAL). Guía Clínica Diabetes Mellitus tipo 2, 2010. Disponible en: <http://web.minsal.cl/portal/url/item/72213ed52c3e23d1e04001011f011398.pdf>. Acceso 8 de mayo de 2016.
- (60) Nathan DM, Buse JB, Davidson MB, et al. Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes care*, 2009; 32(1): 193-203.
- (61) Yadav H, Jain S, Sinha PR. Antidiabetic effect of probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in high fructose fed rats. *Nutrition*, 2007; 23:62-8.
- (62) Harisa GI, Taha EI, Khalil AF. Oral administration of *Lactobacillus acidophilus* restores nitric oxide level in diabetic rats. *Aust J Basic Appl Sci*, 2009; 3: 2963-9.
- (63) Ejtahed HS, Mohtadi-Nia J, Homayouni-Rad A, Niafar M, Asghari-Jafarabadi M, Mofid V. Probiotic yogurt improves antioxidant status in type 2 diabetic patients. *Nutrition*, 2012; 28(5): 539-43.
- (64) Asemi Z, Jazayeri S, Najafi M, Samimi M, Mofid V, Shidfar F, et al. Effect of daily consumption of probiotic yogurt on oxidative stress in pregnant women: A randomized controlled clinical trial. *Ann Nutr Metab*, 2012; 60: 62-8.
- (65) Kullisaar T, Zilmer M, Mikelsaar M, Vihalemm T, Annuk H, et al. Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics. *Int J Food Microbiol*, 2002; 72: 215-24.
- (66) Yun SI, Park HO, Kang JH. Effect of *Lactobacillus gasseri* BNR17 on blood glucose levels and body weight in a mouse model of type 2 diabetes. *J Appl Microbiol*, 2009; 107(5): 1681-86.

- (67) Ostadrahimi A, Taghizadeh A, Mobasser M, et al. Effect of probiotic fermented milk (kefir) on glycemic control and lipid profile in type 2 diabetic patients: a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Iranian Journal of Public Health*, 2015; 44(2): 228-37.
- (68) Khan HA, Sobki SH, Khan SA. Association between glycaemic control and serum lipids profile in type 2 diabetic patients: HbA1c predicts dyslipidaemia. *Clinical and experimental medicine*, 2007; 7(1): 24-9.
- (69) Mazloom Z, Yousefinejad A, Dabbaghmanesh MH. Effect of probiotics on lipid profile, glycemic control, insulin action, oxidative stress, and inflammatory markers in patients with type 2 diabetes: a clinical trial. *Iranian J. of medical scien*, 2013; 38: 38-43.
- (70) Klaver FA, van der Meer R. The assumed assimilation of cholesterol by *Lactobacilli* and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt-deconjugating activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993; 59(4): 1120-1124.
- (71) Cenesiz S, Yaman H, Ozcan A, Kart A, Karademir G. Effects of kefir as a probiotic on serum cholesterol, total lipid, aspartate amino transferase and alanine amino transferase activities in broiler chicks. *Medycyna Wet*, 2008; 64(2): 168-170.
- (72) Ros E. Prebióticos y probióticos en la regulación del metabolismo de los lípidos. *Gastroenterol Hepatol*, 2003; 26(1): 31-6.
- (73) Vujičić I.F., Vulic M, Könyves T, Assimilation of cholesterol in milk by kefir cultures. *Biotechnology Letters*, 1992, 14(9): 847-850.
- (74) Tortora G, Berdel R, Case C. Bases de la microbiología; Medición directa del crecimiento microbiano. En: *Introducción a la Microbiología*. Ed Cwi S. 2007; 178-181.
- (75) Firouzi S, Majid HA, Ismail A, Kamaruddin NA, Barakatun-Nisak M-Y. Effect of multi-strain probiotics (multi-strain microbial cell preparation) on glycemic control and other diabetes-related outcomes in people with type 2 diabetes: a randomized controlled trial. *European Journal of Nutrition*, 2016: 1-16.
- (76) Mazza, JC. Mediciones Antropométricas. Estandarización de las técnicas de medición, actualizadas según parámetros internacionales. *PubliCE Standard*, 2013; 1(2): 197.
- (77) Ministerio de Salud, Guía Clínica Examen de Medicina Preventiva 2013. Disponible en: [http://web.minsal.cl/sites/default/files/files/GPC%20Medicina%20 Preventiva.pdf](http://web.minsal.cl/sites/default/files/files/GPC%20Medicina%20Preventiva.pdf). Acceso 9 de mayo de 2016.
- (78) Bingham SA, Gill C, Welch A, Day K, Cassidy A, et al. Comparison of dietary assessment methods in nutritional epidemiology: weighed records v. 24 h recalls, food-frequency questionnaires and estimated-diet records. *Br J Nutr*, 1994; 72: 619-43.

- (79) Manual of Procedures for Human Microbiome Project. Disponible en: <http://commonfund.nih.gov/hmp/>. Acceso 20 de noviembre de 2016
- (80) MoBio PowerSoil® DNA Isolation Kit. Instruction Manual. Corporate Headquarters MO BIO Laboratories, Inc. 2746 Loker Avenue West Carlsbad, CA 92010.
- (81) Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011; 108: 4516-4522.
- (82) Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods*, 2010; 7(5): 335-336.
- (83) Babraham Institute. Babraham Bioinformatics FastQC. Disponible en: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>. Acceso 15 de enero de 2017.
- (84) Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 2012; 486: 207-214.
- (85) Arumugam M, Raes J, Pelletier E, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 2011; 473(7346): 174-180.
- (86) Louis P, Flint HJ. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS Microbiol Lett*, 2009; 294(1): 1-8.
- (87) Liu C, Finegold SM, Song Y, Lawson PA. Reclassification of *Clostridium coccoides*, *Ruminococcus hansenii*, *Ruminococcus hydrogenotrophicus*, *Ruminococcus luti*, *Ruminococcus productus* and *Ruminococcus schinkii* as *Blautia coccoides* gen. nov., comb. nov., *Blautia hansenii* comb. nov., *Blautia hydrogenotrophica* comb. nov., *Blautia luti* comb. nov., *Blautia producta* comb. nov., *Blautia schinkii* comb. nov. and description of *Blautia wexlerae* sp. nov., isolated from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2008; 58: 1896-1902.
- (88) Tuovinen E, Keto J, Nikkilä J, Mättö J, Lähteenmäki K. Cytokine response of human mononuclear cells induced by intestinal *Clostridium* species. *Anaerobe*, 2013;19:70-76.
- (89) Larsen N, Vogensen FK, van den Berg FWJ, et al. Gut Microbiota in Human Adults with Type 2 Diabetes Differs from Non-Diabetic Adults. Bereswill S, ed. *PLoS ONE*, 2010; 5(2): e9085.
- (90) Cani PD, Rottier O, Goiot Y, Neyrinck A, Geurts L, et al. Changes in gut microbiota control intestinal permeability-induced inflammation in obese and diabetic mice through unexpected dependent mechanisms. *Diabetologia*, 2008; 51: 34-35.
- (91) Xu X, Hui H, Cai D. Differences in fecal *Bifidobacterium* species between patients with type 2 diabetes and healthy individuals. *Nan fang yi ke da xue bao*, 2012; 32: 531-533, 564.

- (92) Santacruz A, Marcos A, Warnberg J, Marti A, Martin-Matillas M, et al. Interplay between weight loss and gut microbiota composition in overweight adolescents. *Obesity*, 2009; 17: 1906-1915.
- (93) Armougom F, Henry M, Vialettes B, Raccach D, Raoult D. Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in *Lactobacillus* in obese patients and methanogens in anorexic patients. *Plos One*, 2009; 4: e7125.
- (94) Zeuthen LH, Christensen HR, Frokiaer H. Lactic acid bacteria inducing a weak interleukin-12 and tumor necrosis factor alpha response in human dendritic cells inhibit strongly stimulating lactic acid bacteria but act synergistically with gram-negative bacteria. *Clin Vaccine Immunol*, 2006; 13: 365-375.
- (95) Belzer C, de Vos WM. Microbes inside—from diversity to function: the case of *Akkermansia*. *The ISME Journal*, 2012; 6(8): 1449-1458.
- (96) Andreasen AS, Larsen N, Pedersen-Skovsgaard T, Berg RMG, Moller K, Svendsen KD, et al. Effects of *Lactobacillus acidophilus* NCFM on insulin sensitivity and the systemic inflammatory response in human subjects. *Br J Nutr*, 2010; 104(12): 1831-1838
- (97) Al-Salami H, Butt G, Fawcett JP, Tucker IG, Golocorbin-Kon S, Mikov M. Probiotic treatment reduces blood glucose levels and increases systemic absorption of gliclazide in diabetic rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 2008; 33(2): 101-106.
- (98) Hove KD, Brøns C, Færch K, Lund SS, Rossing P, Vaag A. Effects of 12 weeks of treatment with fermented milk on blood pressure, glucose metabolism and markers of cardiovascular risk in patients with type 2 diabetes: a randomised double-blind placebo-controlled study. *Eur J Endocrinol*, 2015; 172(1): 11-20.
- (99) Mohamadshahi M, Veissi M, Haidari F, Javid AZ, Mohammadi F, Shirbeigi E. Effects of probiotic yogurt consumption on lipid profile in type 2 diabetic patients: A randomized controlled clinical trial. *Journal of Research in Medical Sciences: The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 2014; 19(6): 531-536.
- (100) St-Onge MP, Farnworth ER, Savard T, Chabot D, Mafu A, Jones PJ. Kefir consumption does not alter plasma lipid levels or cholesterol fractional synthesis rates relative to milk in hyperlipidemic men: a randomized controlled trial. *BMC Complement Altern Med*, 2002; 2: 1.
- (101) Sharma S, Kurpad AV, Puri S. Potential of probiotics in hypercholesterolemia: A meta-analysis. *Indian J Public Health*, 2016; 60: 280-6.
- (102) Quigley EM. The enteric microbiota in the pathogenesis and management of constipation. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2011; 25:119-26.

- (103) Khalif IL, Quigley EM, Konovitch EA, Maximova ID. Alterations in the colonic flora and intestinal permeability and evidence of immune activation in chronic constipation. *Dig Liver Dis*, 2005; 37: 838-49.
- (104) Mollenbrink M, Bruckschen E. Treatment of chronic constipation with physiologic *Escherichia coli* bacteria. Results of a clinical study of the effectiveness and tolerance of microbiological therapy with the *E. coli* Nissle 1917 strain (Mutaflor). *Med Klin (Munich)*, 1994; 89: 587-93.
- (105) Koebnick C, Wagner I, Leitzmann P, et al. Probiotic beverage containing *Lactobacillus casei* Shirota improves gastrointestinal symptoms in patients with chronic constipation. *Can J Gastr*, 2003; 17: 655-9.
- (106) Yang YX, He M, Hu G, et al. Effect of a fermented milk containing *Bifidobacterium lactis* DN-173010 on Chinese constipated women. *World J Gastr*, 2008; 14: 6237-43.
- (107) Turan İ, Dedeli Ö, Bor S, İlter T. Effects of a kefir supplement on symptoms, colonic transit, and bowel satisfaction score in patients with chronic constipation: a pilot study. *Turk J Gastroenterol*, 2014; 25(6): 650-6.

## ANEXOS

### ANEXO 1: CONSENTIMIENTO INFORMADO

Estimado(a) paciente:

Le invitamos a participar en un estudio para optar al Título de Nutricionista / Grado Académico Licenciado en Nutrición y Dietética desarrollado por Karoll González Pizarro, R.U.T 18.237.405 – 9, dirigido por Alejandro Dinamarca Tapia Docente de la Universidad de Valparaíso.

El estudio se titula *Evaluación del consumo de kéfir sobre los parámetros metabólicos de la diabetes mellitus tipo 2 en adultos de la quinta región* y su objetivo es determinar el efecto del consumo del probiótico kéfir durante dos meses, en el control de la glucosa y perfil lipídico en sujetos con diabetes mellitus tipo 2.

Su participación es **voluntaria** y puede elegir ser o no ser parte del estudio, de modo que si se niega a participar seguirá recibiendo la misma atención que hasta ahora. De igual forma, si usted acepta participar, puede retirarse en cualquier momento que estime conveniente, sin problemas ni sanciones. Durante el estudio se hará entrega de yogurt de pajaritos u otro convencional, mediciones antropométricas (peso y talla), encuestas alimentarias y mediciones de glicemias y colesterol durante un mes. Sus datos serán identificados por medio de sus iniciales, de manera que toda la información recopilada al respecto será **estrictamente confidencial**. Asimismo, es importante destacar que su participación es gratuita y ninguno de los miembros del equipo en este estudio recibirá dinero ni compensaciones por ello. El estudio tiene una duración aproximada de 8 semanas.

#### Formulario de consentimiento informado:

Yo, \_\_\_\_\_ R.U.T \_\_\_\_\_, con fecha \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_, declaro que me ha sido leída y he leído la información proporcionada, he podido aclarar mis dudas y mis preguntas han sido contestadas satisfactoriamente. Autorizo voluntariamente para que se utilice la \_\_\_\_\_ información \_\_\_\_\_ solicitada \_\_\_\_\_ anteriormente.

---

ACEPTO

## CONVENIO DE CONFIDENCIALIDAD

La suscrita, Karoll González Pizarro, R.U.T 18.237.405 – 9, alumno/a tesista para optar al Título de Nutricionista / Grado Académico Licenciado en Nutrición y Dietética que realizará el estudio, el profesor guía Alejandro Dinamarca Tapia, R.U.T 8.404.453 – 9 y la profesora Claudia Ibacache Quiroga, R.U.T 16.330.481 – 3, en el marco del proyecto *Evaluación del consumo de kéfir sobre los parámetros metabólicos de la diabetes mellitus tipo 2 en adultos de la quinta región*, aceptan en este acto las siguientes condiciones:

Confirmando que se me ha advertido explícitamente la prohibición de divulgar, utilizar o transferir información del proyecto mencionado. Dicha prohibición se mantendrá vigente durante el plazo de duración del proyecto e incluso después de que el mismo haya concluido.

La mencionada confidencialidad se refiere a todo tipo de información individual recolectada durante mi desempeño. Los resultados del estudio sólo se darán a conocer en situaciones formales.

En tal virtud, acepto mantener en secreto dicha información bajo las condiciones expuestas.



FIRMA

Karoll González  
Pizarro  
18.237.405 – 9



FIRMA

Alejandro Dinamarca Tapia  
8.404.453 – 9



FIRMA

Claudia Ibacache Quiroga  
16.330.481 – 3

En Valparaíso, (\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_)

## ANEXO 2: FORMULARIO ENCUESTA PARTICIPACIÓN EN ESTUDIO

Nombre: \_\_\_\_\_

N° de identificación: \_\_\_\_\_

Edad: \_\_\_\_\_ años

### INDICACIONES:

- Marque con una X.
- Responda con sinceridad todas las preguntas planteadas.
- La información entregada por usted se mantendrá en completa confidencialidad.

#### 1. Sexo

Femenino		Masculino	
----------	--	-----------	--

#### 2. En caso de ser de sexo femenino, ¿está embarazada o en periodo de lactancia actualmente?

Sí		No	
----	--	----	--

#### 3. ¿Hace cuánto fue diagnosticado/a con diabetes tipo 2?

Menos de 1 año	
1 – 2 años	
5 – 10 años	
Más de 10 años	
Alrededor de 15 años	
Más de 20 años	
Más de 30 años	

#### 4. ¿Padece algunas de estas patologías y/o condiciones?

Enfermedad renal	
Enfermedad hepática	
Hipotiroidismo	
HIV/SIDA	
Intolerancia a la lactosa	
Historia de accidentes vasculares	

#### 5. ¿Fuma?

Sí			No	
----	--	--	----	--

#### 6. De contestar sí en la pregunta anterior, ¿con qué frecuencia?

Todos los días	
4 a 6 veces a la semana	
2 a 3 veces a la semana	
1 vez a la semana	
Ocasionalmente (menos de 1 vez a la semana)	

7. ¿Consume o utiliza alguno de los siguientes medicamentos?

Metformina	
Glibenclamida	
Insulina	
Lovastatina	
Atorvastatina o Rosuvastatina	
Gemfibrozilo	

Otro:

---



---

8. ¿Qué tan estricto es Ud. con su terapia farmacológica?

Tomo mis medicamentos a diario y en los horarios estipulados por mi médico tratante	
Tomo mis medicamentos a diario pero no en los horarios indicados por mi médico	
Tomo mis medicamentos algunas veces a la semana	
No tomo los medicamentos recetados por mi médico	

9. ¿Consume de manera habitual algún probiótico de los enlistados a continuación?

Kéfir o yogurt de pajaritos	
Kéfir de agua u hongos tibetanos	
Chamito	
Uno al día	

Otro:

---



---

10. Si marcó alguna de las opciones anteriores, ¿Hace cuánto consume el probiótico?

Menos de 1 semana	
Entre 2 y 3 semanas	
Más de 4 semanas	
Más de 12 semanas	
Más de 6 meses	
Más de 1 año	

11. ¿Con qué frecuencia?

2 o más veces al día	
1 vez al día	
De 4 a 6 veces por semana	
De 2 a 3 veces por semana	
1 vez por semana	
Ocasionalmente (menos de 1 vez por semana)	

### **ANEXO 3: ACTA DE APROBACIÓN COMITÉ DE BIOÉTICA**

El Comité de Bioética para la Investigación (CBI) de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valparaíso, constituido por Sergio Blaimont, Asesor Jurídico externo y los académicos de la Facultad de Farmacia, Prof. Rafael Jiménez (Presidente del CBI), Prof. Raúl Vinet (Secretario del CBI) y Prof. Marcela Escobar (Miembro del CBI) declara haber evaluado el protocolo experimental del proyecto “EVALUACIÓN DEL CONSUMO DE KÉFIR SOBRE LOS PARÁMETROS METABÓLICOS DE LA DIABETES MELLITUS TIPO 2 EN ADULTOS DE LA QUINTA REGIÓN” presentado por la Srta. Karoll González, alumna regular de la carrera de Nutrición y Dietética, y dirigida por la Prof. Alejandro Dinamarca.

- I. El CBI considera que los objetivos del proyecto han sido bien definidos y que la metodología asociada a sus logros se ha establecido adecuadamente.
- II. En la valoración bioética del proyecto, el CBI no objetó otro aspecto que pudiera estar relacionado con el proyecto.
- III. Por lo anterior, el CBI de la Facultad de Farmacia APRUEBA el protocolo experimental, tal y cual se señala en el proyecto.

Firman el Acta los miembros del Comité:

 _____ Marcela Escobar	 _____ Claudia Vega
 _____ Sergio Blaimont	 _____ Rafael Jiménez
 _____ Raúl Vinet	

Valparaíso, 23 de agosto de 2016

## ANEXO 4: CUESTIONARIO DE AUTO-DIAGNÓSTICO SOBRE RIESGOS EN EL USO DE ALCOHOL (AUDIT)

Nombre: \_\_\_\_\_

N° de identificación: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

Pregunta	0	1	2	3	4	Puntos
1. ¿Con qué frecuencia consume alguna bebida alcohólica?	Nunca. Pase a la N° 9.	Una ó menos veces al mes	De 2 a 4 veces al mes	De 2 a 3 veces a la semana	4 ó más veces a la semana	
2. ¿Cuántas unidades estándar de bebidas alcohólicas suele realizar en un día de consumo normal?	1 ó 2	3 ó 4	5 ó 6	De 7 a 9	1 ó más	
3. ¿Con qué frecuencia toma 6 o más bebidas alcohólicas en un solo día?	Nunca	Menos de una vez al mes	Mensualmente	Semanalmente	A diario o casi a diario	
4. ¿Con qué frecuencia en el curso del último año ha sido incapaz de parar de beber, una vez había empezado?	Nunca	Menos de una vez al mes	Mensualmente	Semanalmente	A diario o casi a diario	
5. ¿Con qué frecuencia en el curso del último año, no pudo hacer lo que se esperaba de usted porque había bebido?	Nunca	Menos de una vez al mes	Mensualmente	Semanalmente	A diario o casi a diario	
6. ¿Con qué frecuencia en el curso del último año, ha necesitado beber en ayunas para recuperarse después de haber bebido mucho el día anterior?	Nunca	Menos de una vez al mes	Mensualmente	Semanalmente	A diario o casi a diario	
7. ¿Con qué frecuencia en el curso del último año, ha tenido remordimientos o sentimientos de culpa después de haber bebido?	Nunca	Menos de una vez al mes	Mensualmente	Semanalmente	A diario o casi a diario	
8. ¿Con qué frecuencia en el curso del último año, no ha podido recordar lo que sucedió la noche anterior porque había estado bebiendo?	Nunca	Menos de una vez al mes	Mensualmente	Semanalmente	A diario o casi a diario	
9. ¿Usted o alguna otra persona ha resultado herido, porque usted había bebido?	No		Sí, pero no en el curso del último año		Sí, el último año	
10. ¿Algún familiar, amigo, médico o profesional sanitario, ha mostrado preocupación por un consumo de bebidas alcohólicas o le ha sugerido que deje de beber?	No		Sí, pero no en el curso del último año		Sí, el último año	
					<b>TOTAL</b>	

## ANEXO 5: CUESTIONARIO INTERNACIONAL DE ACTIVIDAD FISICA (IPAQ)

Nombre: \_\_\_\_\_

N° de identificación: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

*Piense en todas las actividades intensas que usted realizó en los últimos 7 días. Las actividades físicas intensas se refieren a aquellas que implican un esfuerzo físico intenso y que lo hacen respirar mucho más intensamente que lo normal. Piense solo en aquellas actividades físicas que realizó durante por lo menos 10 minutos seguidos.*

- 1. Durante los últimos 7 días, ¿en cuántos realizó actividades físicas intensas tales como levantar pesos pesados, cavar, hacer ejercicios aeróbicos o andar rápido en bicicleta?**

\_\_\_\_\_ días por semana

..... Ninguna actividad física intensa → Vaya a la pregunta 3

- 2. Habitualmente, ¿cuánto tiempo en total dedicó a una actividad física intensa en uno de esos días?**

\_\_\_\_\_ horas por día

\_\_\_\_\_ minutos por día

..... No sabe/No está seguro

*Piense en todas las actividades moderadas que usted realizó en los últimos 7 días. Las actividades moderadas son aquellas que requieren un esfuerzo físico moderado que lo hace respirar algo más intensamente que lo normal. Piense solo en aquellas actividades físicas que realizó durante por lo menos 10 minutos seguidos.*

- 3. Durante los últimos 7 días, ¿en cuántos días hizo actividades físicas moderadas como transportar pesos livianos, andar en bicicleta a velocidad regular o jugar dobles de tenis? No incluya caminar.**

\_\_\_\_\_ días por semana

..... Ninguna actividad física moderada → Vaya a la pregunta 5

**4. Habitualmente, ¿cuánto tiempo en total dedicó a una actividad física moderada en uno de esos días?**

\_\_\_\_\_ horas por día

\_\_\_\_\_ minutos por día

..... No sabe/No está seguro

*Piense en el tiempo que usted dedicó a caminar en los últimos 7 días. Esto incluye caminar en el trabajo o en la casa, para trasladarse de un lugar a otro, o cualquier otra caminata que usted podría hacer solamente para la recreación, el deporte, el ejercicio o el ocio.*

**5. Durante los últimos 7 días, ¿En cuántos caminó por lo menos 10 minutos seguidos?**

\_\_\_\_\_ días por semana

..... Ninguna caminata → Vaya a la pregunta 7

**6. Habitualmente, ¿cuánto tiempo en total dedicó a caminar en uno de esos días?**

\_\_\_\_\_ horas por día

\_\_\_\_\_ minutos por día

..... No sabe/No está seguro

*La última pregunta es acerca del tiempo que pasó usted sentado durante los días hábiles de los últimos 7 días. Esto incluye el tiempo dedicado al trabajo, en la casa, en una clase, y durante el tiempo libre. Puede incluir el tiempo que pasó sentado ante un escritorio, visitando amigos, leyendo, viajando en ómnibus, o sentado o recostado mirando la televisión.*

**7. Durante los últimos 7 días ¿cuánto tiempo pasó sentado durante un día hábil?**

\_\_\_\_\_ horas por día

\_\_\_\_\_ minutos por día

..... No sabe/No está seguro

**ANEXO 6:                    FORMULARIO CONSUMO DE MEDICAMENTOS**

Nombre: \_\_\_\_\_

N° de identificación: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

<b>Medicamento</b>	<b>Dosis diaria</b>
Metformina	
Otro	

**ANEXO 7:****FORMULARIO CONSUMO DE YOGURT**

Nombre: \_\_\_\_\_

N° de identificación: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

<b>Día de la semana</b>	<b>Yogurt consumido</b>				
	<b>100%</b>	<b>75%</b>	<b>50%</b>	<b>25%</b>	<b>0%</b>
Lunes					
Martes					
Miércoles					
Jueves					
Viernes					
Sábado					
Domingo					

<b>Semana</b>	<b>Yogurt consumido</b>				
	<b>100%</b>	<b>75%</b>	<b>50%</b>	<b>25%</b>	<b>0%</b>
Semana 1					
Semana 2					
Semana 3					
Semana 4					
Semana 5					
Semana 6					

**ANEXO 8: FORMULARIO REGISTRO DE PARÁMETROS METABÓLICOS**

Nombre: \_\_\_\_\_

N° de identificación: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

<b>Variable</b>	<b>Medición inicial (Pre intervención)</b> ( / / )	<b>Medición final (Post intervención)</b> ( / / )
Glicemia en ayunas		
Triglicéridos		
Colesterol Total		

## ANEXO 9:

## FORMULARIO RECORDATORIO DE 24 HORAS

Nombre del Encuestado: \_\_\_\_\_

N° de identificación: \_\_\_\_\_

Nombre del Encuestador: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

## INDICACIONES:

- Responda con sinceridad todas las preguntas planteadas.
- La información entregada por usted se mantendrá en completa confidencialidad.

Señale si el día de ayer fue:

Hábil \_\_\_\_\_

Festivo \_\_\_\_\_

Víspera Festivo \_\_\_\_\_

¿La alimentación en el día de ayer fue similar a la del resto de los días o cambió su alimentación respecto al resto de los días?:

- Fue similar al resto de los días \_\_\_\_\_

- Fue un día especial \_\_\_\_\_

TIEMPO COMIDA	HORA	PREPARACIÓN	INGREDIENTES	CANTIDAD	
				Medida casera	g/cc
Desayuno					
Almuerzo					
Once					
Cena					
<b>COLACIONES</b>					
1					
2					
3					

## ANEXO 10: FORMULARIO CUESTIONARIO DE TOLERANCIA DIGESTIVA

Nombre: \_\_\_\_\_

N° de identificación: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

### INDICACIONES:

- Marque con una X.
- Responda con sinceridad todas las preguntas planteadas.

1. Con su alimentación habitual, ¿suele padecer estreñimiento, diarrea, gases, molestias digestivas tras comer, indigestión, pesadez o dolor de abdomen?

Todos los días	
Al menos una vez a la semana	
De vez en cuando	
Nunca	

2. Desde que comenzó a consumir el yogurt, ¿Padece alguno de los siguientes síntomas?

Estreñimiento	
Diarrea	
Gases	
Molestias digestivas	
Indigestión	
Pesadez o dolor abdominal	

3. De haber marcado alguna de las opciones anteriores, ¿con qué frecuencia las experimenta?

Todos los días	
Al menos 1 vez a la semana	
De vez en cuando	

4. ¿Cómo le afectan esas molestias digestivas?

Afectan en mi día a día, mi trabajo y el modo en que funciono habitualmente	
A veces me preocupan o me ponen malhumorado	
A veces me afectan, pero lo puedo controlar	

## ANEXO 11: PARÁMETROS METABÓLICOS DETALLADOS POR PACIENTE

A continuación, se presentan de manera detallada los resultados obtenidos por los 20 participantes del estudio en cuanto a las mediciones realizadas de glucosa en ayunas, colesterol total y triglicéridos plasmáticos.

Grupo Probiótico (kéfir)							
N° paciente	Sexo	Glicemia (mg/dl)		Colesterol (mg/dl)		Triglicéridos (mg/dl)	
		<i>Pre intervención</i>	<i>Post intervención</i>	<i>Pre intervención</i>	<i>Post intervención</i>	<i>Pre intervención</i>	<i>Post intervención</i>
1	F	114	104	163	150	152	150
2	F	102	85	160	218	184	197
3	M	153	271	257	264	427	346
4	F	78	76	230	202	236	222
5	F	120	109	200	215	149	145
6	M	115	112	159	159	90	90
7	F	76	75	239	224	122	106
8	F	200	208	280	280	230	228
9	F	232	129	222	180	186	155
10	F	100	99	183	170	384	310

Grupo Control (placebo)							
N° paciente	Sexo	Glicemia (mg/dl)		Colesterol (mg/dl)		Triglicéridos (mg/dl)	
		<i>Pre intervención</i>	<i>Post intervención</i>	<i>Pre intervención</i>	<i>Post intervención</i>	<i>Pre intervención</i>	<i>Post intervención</i>
1	M	130	129	300	300	384	432
2	F	98	95	220	225	160	160
3	M	122	159	150	150	206	182
4	M	180	216	162	150	101	188
5	F	84	87	168	176	97	101
6	F	111	87	198	194	258	179
7	M	74	78	202	202	78	78
8	F	88	118	179	185	186	131
9	F	95	94	150	150	115	112
10	F	112	110	216	202	264	250