



**Universitat de les
Illes Balears**

**Efectos del consumo de pan de masa madre en el perfil glucémico y la
composición de la microbiota intestinal, de una población de pacientes con
diabetes tipo 2.**

DAVINIA FRUTOS MOLINA

(Enfermera, 2004, Universidad de Murcia)

Memoria del Trabajo Final de Máster

Máster Universitario en Nutrición y Alimentación Humana

de la

UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS

Mayo, 2020

Firmas

Autor

DAVINIA FRUTOS MOLINA

15/06/2020

Certificado

MARTA MONJO CABRER

Tutora del Trabajo

Aceptado

JOSEP ANTONI TUR MARI

Director del Máster Universitario en Nutrición y Alimentación Humana

INDICE

	Pág.
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	3
RESUMEN.....	4
ABSTRACT	5
1. INTRODUCCION	6
2. OBJETIVOS.....	16
3. HIPOTESIS.....	16
4. MATERIAL Y METODOS.....	17
4.1. Diseño del estudio.....	17
4.2. Participantes.....	17
4.3. Criterios de inclusión y exclusión	17
4.4. Cálculo del tamaño de la muestra.....	18
4.5. Instrumentos y medidas.....	18
4.6. Variables.....	19
4.7. Procedimiento de recogida de datos.....	20
4.8. Intervención.....	20
4.9. Análisis de datos	20
5. ASPECTOS ÉTICOS.....	21
REFERENCIAS.....	22
Anexo 1.	

INDICE DE ABREVIATURAS

AGCC:	Ácidos Grasos de Cadena Corta
DM2:	Diabetes Mellitus tipo 2
EC:	Enfermedad Celiaca
GDM:	Diabetes Gestacional
HDL:	Colesterol Bueno
Kcal:	Kilocaloría
Kj:	Aporte Calórico/Nivel de Energía
LDL:	Colesterol Malo
LPS:	Lipopolisacárido
MMC:	Masa Madre de Cultivo
PH:	Medida de Acidez
SCFA:	Ácidos Orgánicos
SM:	Síndrome Metabólico
T1DM:	Diabetes Tipo 1
T2M:	Diabetes Tipo 2

RESUMEN

La masa madre de cultivo (MMC) conocida comúnmente como masa madre, es la mezcla de harina y agua, que de forma espontánea es fermentada por bacterias y/o levaduras de ácido láctico, que se originan en la harina y el medio ambiente circundante. El cultivo iniciador de masa fermentada toma un promedio de siete días e implica reponer los microbios con harina fresca y agua diariamente. Una vez que el iniciador está listo, se agrega una pequeña porción a los ingredientes base de la masa madre para iniciar el proceso de fermentación. A diferencia del pan estándar, que se produce a través de un proceso rápido de fermentación solo con levadura, se cree que el pan de MMC mejora la calidad del pan, incluida la textura, el sabor, el contenido nutricional y la vida útil, y reemplaza los aditivos. Además, durante la fermentación, se producen conversiones microbianas y enzimáticas de carbohidratos de cereales, proteínas, lípidos y compuestos fenólicos, proporcionando determinados sustratos que permiten el crecimiento de determinados microorganismos que forman parte de la microbiota intestinal.

Recientemente, se ha reportado que una microbiota intestinal saludable juega un papel muy importante en la salud, y que un desequilibrio o disbiosis en la microbiota normal puede contribuir a la patología de determinadas enfermedades, aumentando la inflamación y contribuyendo a la disfunción metabólica, como puede ser el caso de la diabetes tipo 2.

El objetivo final de la investigación que nos ocupa es evaluar los potenciales efectos beneficiosos del pan con MMC en el perfil glucémico y en la composición de la microbiota intestinal en pacientes que tienen diabetes tipo 2.

En relación a la metodología que se propone en el proyecto de investigación a llevar a cabo, el diseño será de corte cuantitativa mediante un estudio longitudinal y prospectivo, analítico experimental de tipo ensayo clínico a simple ciego (dieta con pan integral de MMC / dieta con pan integral no elaborado con MMC). Los sujetos de estudio son dos poblaciones de 50 personas que sufran diabetes tipo 2 pertenecientes a la pedanía de San José de la Vega del municipio de Murcia, que cumplan los criterios de inclusión (diagnosticados de diabetes tipo 2, con un índice de masa corporal entre 18,5 y 40, que no están medicados con insulina, análogos de GLP-1 o inhibidores de DPP4, y que no hayan consumido suplementos con prebióticos o tomado probióticos en los últimos 2 meses), durante medio año. Los efectos beneficiosos para la salud de estos pacientes se intentarán demostrar mediante perfiles glucémicos distribuidos en varias veces al día a ambas poblaciones, medidas con test válidos, y mediante la composición de la microbiota intestinal a partir de las heces.

Palabras Claves: masa madre de cultivo, perfil glucémico, microbiota intestinal, diabetes tipo 2.

ABSTRACT

The cultivated sourdough (MMC) commonly known as sourdough, is the mixture of flour and water, which is spontaneously fermented by bacteria and / or lactic acid yeasts, which originate in the flour and the surrounding environment. The sourdough starter culture takes an average of seven days and involves replenishing the microbes with fresh flour and water daily. Once the starter is ready, a small portion is added to the base ingredients of the sourdough to start the fermentation process. Unlike standard bread, which is produced through a rapid yeast-only fermentation process, MMC bread is believed to improve bread quality, including texture, flavor, nutritional content, and shelf life, and replace additives. Furthermore, during fermentation, microbial and enzymatic conversions of cereal carbohydrates, proteins, lipids and phenolic compounds occur, providing certain substrates that allow the growth of certain microorganisms that are part of the intestinal microbiota.

Recently, it has been reported that a healthy intestinal microbiota plays a very important role in health, and that an imbalance or dysbiosis in the normal microbiota can contribute to the pathology of certain diseases, increasing inflammation and contributing to metabolic dysfunction, as it can be the case of type 2 diabetes.

The final objective of the investigation that concerns us is to evaluate the potential beneficial effects of bread with MMC on the glycemic profile and on the composition of the intestinal microbiota in patients with type 2 diabetes.

In relation to the methodology proposed in the research project to be carried out, the design will be of a quantitative nature through a longitudinal and prospective, analytical, experimental study of the simple blind clinical trial (diet with MMC wholemeal bread / diet with wholemeal bread not made with MMC). The study subjects are two populations of 50 people suffering from type 2 diabetes belonging to the district of San José de la Vega of the municipality of Murcia, who meet the inclusion criteria (diagnosed with type 2 diabetes, with a body mass index between 18.5 and 40, who are not medicated with insulin, GLP-1 analogues or DPP4 inhibitors, and who have not taken prebiotic supplements or taken probiotics in the last 2 months), for half a year. The beneficial health effects of these patients will be attempted by demonstrating glycemic profiles distributed several times a day to both populations, measured with valid tests, and by the composition of the intestinal microbiota from the faeces.

Key Words: culture sourdough, glycemic profile, intestinal microbiota, diabetes

1. INTRODUCCION

La diabetes está adquiriendo características de pandemia, es un mal que cada día tiene mayor fuerza y cuando se habla de alimentación, surgen varias alternativas para tratar de frenar este crecimiento. La incidencia de diabetes mellitus tipo 2 aumenta constantemente y se prevé a nivel mundial supere los 500 millones en el 2030 (1). La prevalencia mundial de la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) se ha convertido en una preocupación importante, con varias implicaciones para la salud pública, la economía y el bienestar social. (2). El cuidado de la alimentación tiene gran influencia en este aspecto, por lo que el Especialista en Nutrición debe realizar aportes ajustados a las necesidades.

En este sentido, varios estudios previos han investigado el impacto de los alimentos en el perfil glucémico y la composición en la microbiota intestinal, considerando el cuadro clínico de pacientes con diabetes tipo 2.

Houghton et al (2018) señalan que los avances en la secuencia molecular y los métodos computacionales han proporcionado una comprensión sin precedentes de cómo funciona la microbiota intestinal de forma simbiótica con el huésped, contribuyendo a la nutrición, el metabolismo, la respuesta inmune y la arquitectura intestinal (1). El término "microflora" o "microbiota" hace referencia a la comunidad de microorganismos vivos reunidos en un nicho ecológico determinado. (3)

La microbiota intestinal influye en la recolección de energía, la sangre y glucosa. Además, se ha demostrado que atacar la microbiota intestinal con intervenciones de estilo de vida produce cambios significativos en composición bacteriana que está alineada con mejoras en control de glucosa (1).

Esta investigación está dirigida a determinar los efectos del consumo de MMC, con las características que lo hacen diferente al pan blanco y su influencia en la glucemia, como índices establecidos para una buena salud, así como en la flora o microbiota intestinal.

Pan de Masa Madre de Cultivo

El pan de MMC es aparentemente una nueva propuesta en tendencia, aunque su elaboración data de 150 años atrás, de cuando no se utilizaba ningún tipo de levadura comercial, es un compuesto de harina y agua que se fermenta de forma natural, es un proceso lento, bajo en gluten, además de propiciar la reproducción de hongos, un cultivo simbiótico de las levaduras en alimentos, es precisamente en las bacterias que se debe poner minuciosa atención y su influencia en la microbiota intestinal, así como puede llegar a alterar los parámetros glucémicos, ya que éstos están interrelacionados en sus funciones.

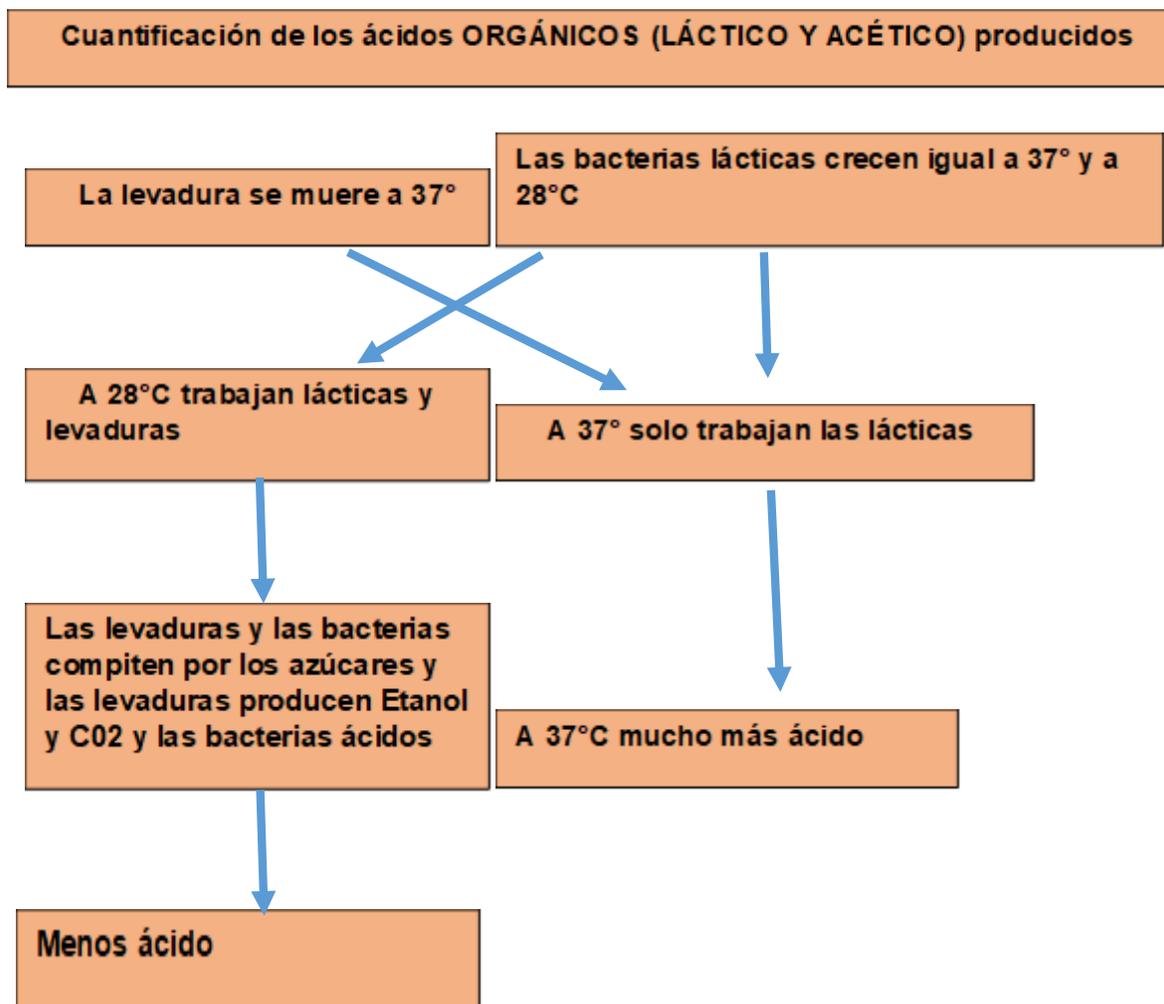
En la propia harina hay multitud de levaduras y bacterias que provocan la fermentación de las masas de manera espontánea. Esta forma de fermentación, tan antigua como los panes que con ella se elaboran, aporta un sabor y aroma especiales a las masas y ayuda a controlar su acidez (4).

La MMC no tiene nada que ver con la harina, sino con el método de fermentación, pues es una levadura “viva”: un hongo unicelular que produce enzimas, y que, a su vez, producen la fermentación de los hidratos de carbono (5).

En la preparación de masa madre debe representar una proporción igual o superior al 5% del peso total de la harina de la masa final y sin incluir aditivos. La MMC preparada para asegurar la fermentación de la masa de pan deberá tener, antes de incorporarla, un pH inferior a 4,2 y una acidez total titulable superior a 6. La masa de pan deberá tener un pH inferior a 4,8 antes y después de la cocción. (6)

Un trabajo realizado por Dossche Mills, Evaluación y caracterización de la influencia de las principales variables de la masa madre sobre las propiedades de ésta, menciona la influencia del tipo de harina en las características de la MMC y el pan final. Independientemente del tipo de harina, en este proceso de elaboración de MMC las bacterias lácticas se imponen a las levaduras. Se tiene 10 veces más bacterias lácticas que levaduras; este hecho apunta a que los panes que se elaboren con esta masa serán ácidos. (7)

En esta investigación se estudia la influencia de la temperatura en las características de la MMC y en el pan final, obteniendo lo siguiente: figura 1(7).



Como conclusión se obtuvo que una diferencia de temperatura de 9°C (de 28°C a 37°C) modifica significativamente el comportamiento de la población microbiana y de las características de la MMC y del pan:

- Las bacterias lácticas crecen más rápido a 37°C que a 28°C y en 24 horas están en su máximo crecimiento.
- Las levaduras crecen y mantienen los recuentos a 28°C pero a 37°C tras alcanzar sus recuentos máximos, mueren.

- c) Se acumulan más ácidos a la temperatura de 37°C que a la de 28°C.
- d) La MMC final se desarrolla mucho menos a 37°C que a 28°C (las levaduras no producen CO₂ porque están muertas).
- e) El pan obtenido a 28°C es sensorialmente más apto (textura y apariencia y menos ácido).
- f) El pan obtenido a 37°C presenta peores características sensoriales.

Efectos de la Harina de Trigo

Los efectos del trigo en el organismo son estudiados para determinar sus beneficios, incluso la enfermedad celíaca, la alergia al trigo, la sensibilidad al trigo no celíaca, la malabsorción de fructosa y el síndrome del intestino irritable (8). Así mismo, Kissigin (2015) en su artículo resalta que las tecnologías de germinación y fermentación pueden alterar efectivamente ciertos componentes inmunorreactivos (8).

El trigo pertenece a la familia de las semillas y dispone de espigas terminales que están conformadas por tres o más galopadas de granos, a partir de los cuales, una vez triturados, dan como resultado a la harina. El grano del trigo es utilizado para hacer también la harina integral, sémola, cerveza y una gran variedad de productos alimenticios.

El trigo es muy rico en sales minerales, elementos catalíticos; calcio, magnesio, sodio, potasio, cloro, azufre, silicio, zinc, magnesio, cobalto, cobre, yodo, arsénico, vitaminas A, B, E, K, D, PP y fermentos, por ello representa una de las bases de la nutrición humana. Asimismo, combate el colesterol ya que contiene ácidos grasos esenciales que impiden la acumulación del mismo en las paredes de los vasos sanguíneos, al incrementar el colesterol bueno o HDL y reducir el colesterol malo o LDL (9). De esto deriva la necesidad de incorporarlo a la dieta diaria para mantener una buena alimentación.

Ahora bien, el trigo posee gluten que es la sustancia pegajosa que queda cuando se quita el almidón de la harina de trigo. Cuenta con 4 componentes proteicos (gliadinas, gluteninas, albúminas y globulinas), de las cuales las gliadinas (alfa, beta, gama y omega) y las gluteninas son las proteínas más abundantes del grano de trigo (10) y son las responsables de proporcionar las propiedades elásticas de masa de pan que le permite subir. Gliadina, es responsable de los problemas que enfrentan las personas con intolerancia al gluten.

En tal sentido, existe una nueva mezcla de lactobacilos de masa madre seleccionados y proteasas fúngicas para eliminar la toxicidad de la harina de trigo durante la fermentación a largo plazo, a fin de disminuir o evitar la celiaquía, que es cuando la proteína gliadina se digiere en el intestino delgado. Es una enfermedad digestiva y genética que causa lesiones en el intestino delgado y provoca que se altere la absorción de las vitaminas, minerales y demás nutrientes que contienen los alimentos (10).

En estos el sistema de defensa autoinmune del cuerpo confunde esta porción de proteína con un patógeno y ataca a las células del intestino que lo han absorbido. Esto da como resultado daños graves en el revestimiento del pequeño intestino, volviendo al paciente sensible al gluten. Algunas personas presentan diarrea, hinchazón, fatiga y síndrome del intestino irritable, que se desencadena por el gluten en su dieta (9).

En el caso de la MMC la fermentación es lenta, esto radica en el hecho de que las levaduras y las bacterias tienen tiempo para predigerir la gliadina en la masa de pan, cortándola en trozos que son tan pequeños que no irritan el intestino delgado.

Rizzello, C. et al. (11), señalan que la enfermedad celíaca (EC) es un trastorno inflamatorio del intestino delgado que afecta a individuos genéticamente predispuestos cuando ingieren gluten de cualquier especie de *Triticum* y proteínas similares de cebada y centeno y sus variedades cruzadas. Una vez aplicado el proceso de estudio donde se utilizó MMC para la fabricación del pan y pan elaborado de forma industrial, se obtuvo como resultado que la harina MMC es

idónea para garantizar la calidad del pan dada la degradación completa del gluten. La harina secada por aspersión de S2E12 se usó como ingrediente en el pan hecho por fermentación convencional a corto plazo con levadura de panadería y agentes estructurantes. El volumen de pan específico de este pan era ligeramente más bajo que el del pan de levadura de panadería, y el pan tenía el sabor típico del pan de trigo de masa fermentada como se juzga mediante una prueba de panel interno. Dados los resultados alentadores de este estudio, la investigación incluye un desafío a largo plazo para pacientes con EC que está en progreso.

Por último, los parámetros de textura del pan están determinados por la acidificación microbiana y la velocidad de descomposición del sustrato, es importante caracterizar los microorganismos responsables de esas actividades. La ecología microbiana de la fermentación de este tipo de masa está determinada por factores ecológicos (12).

Diferencias entre el pan blanco y el pan elaborado con MMC, a fin de comprender su aporte nutricional en los pacientes diabéticos:

Tabla 1. Información nutricional Pan Blanco y Pan elaborado con MMC

(13-14)

Información Nutricional / Porción 100 g.

	Pan Masa Madre	Pan Blanco
Energía	1000 Kj.	277 Kj
	239 Kcal	
Grasa	1,5 g.	1 g.
Grasa Saturada	0,3 g.	
Grasa Monoinsaturada	0,6 g.	
Grasa Poliinsaturada	0,4 g.	
Carbohidratos	45 g.	58
Azúcar	3,8 g.	
Fibra	4 g.	2,2 g.
Proteína	9,4 g.	7,8 g.
Sal	2,75g.	Agua 31

Microbiota intestinal en determinadas patologías y diabetes

Muchos estudios se han llevado a cabo para determinar la influencia de los alimentos en los niveles de glicemia en el organismo humano, en el caso de esta investigación se relacionan tres factores importantes como son el consumo de pan elaborado con masa madre de cultivo (MMC) y como incide en el índice glucémico y la microbiota intestinal para el caso de un diabético tipo 2, siendo esta condición la más común.

Se ha demostrado que la microbiota intestinal de los obesos y de los pacientes con diabetes tipo 2 está alterada, siendo en estos casos más eficiente en la extracción de energía a partir de los alimentos, cuando es comparada con aquella de los individuos sanos. Estos eventos conllevan al aumento de las concentraciones plasmáticas de LPS y el consiguiente desarrollo de un estado inflamatorio de bajo grado que facilita la aparición de resistencia insulínica y diabetes tipo 2. En la actualidad, es considerada como un actor importante en la regulación del metabolismo energético del organismo (15).

Icaza-Chávez en su investigación “Microbiota intestinal en la salud y la enfermedad”, señala que Alrededor del 50% de la masa fecal está constituida por bacterias. Esta población se compone de trillones de microorganismos pertenecientes, fundamentalmente, a 4 filas: Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria y Proteobacteria, con un predominio de las 2 primeras en un 90%. (16)

También, mencionan que la función de la microbiota intestinal es considerada como un órgano metabólico, con funciones en la nutrición, la regulación de la inmunidad y la inflamación sistémica. Tiene enzimas que transforman a los polisacáridos complejos de la dieta, que el intestino humano no puede digerir ni absorber, en monosacáridos y ácidos grasos de cadena corta (AGCC), principalmente acético, propiónico y butírico. Los 2 primeros se absorben a la circulación portal y el tercero es empleado por los colonocitos como fuente de energía. Los AGCC pueden ser transportados al hígado para ser usados en la síntesis lipídica; de hecho, se estima que las calorías derivadas de esta digestión

bacteriana constituyen alrededor del 10% de toda la energía que absorbemos. La cantidad de AGCC en el colon y en la sangre son importantes para la inmunorregulación del hospedero. Algunos estudios reportan efectos positivos de los AGCC en pacientes con alteraciones inflamatorias del intestino; dichos individuos tienen concentraciones mucho menores de AGCC.

La obesidad es el resultado del consumo de alimentos altos en energía, azúcares y grasas saturadas, sin embargo, parece ser que el simple incremento en la ingestión de calorías no explica completamente la actual epidemia de obesidad.

El metabolismo y la inflamación se asocian de manera estrecha y hallazgos recientes han identificado que, en particular, el sistema inmune innato, que nos protege de infecciones, puede contribuir con la obesidad y la resistencia a la insulina. El efecto metabólico de la microbiota en relación con la extracción de la energía se entiende gracias al rol que juegan estas bacterias al transformar nutrientes complejos, como fibra dietética y mucina, en azúcares simples y ácidos grasos de cadena corta. Sin el efecto de la microbiota intestinal tanto la fibra dietética como la mucina serían eliminadas en las deposiciones (10).

La ingesta de una comida con alto contenido de grasa en sujetos sanos aumenta las concentraciones plasmáticas de LPS, al aumentar la proporción de bacterias gram negativas en el intestino, contribuyendo al desarrollo de un estado inflamatorio post-prandial y a la activación de las células endoteliales. Se incrementa la presencia de Bacteroidetes y un mantenimiento de la cantidad de Firmicutes en sujetos obesos sometidos a dietas de restricción calórica, bajas en carbohidratos y/o grasas. (10)

Ahora bien, existen factores nutricionales que pueden afectar o modular el sistema inmunitario. Entre ellos se incluyen la ingesta total de calorías (tanto el exceso como el déficit), grasas totales, tipo de grasas, vitaminas A, B6, C, D y E, carotenoides, hierro, zinc y selenio. Las investigaciones sugieren que la alteración o modulación de la respuesta inmunitaria a través de la dieta puede ser útil para prevenir o para tratar una amplia variedad de patologías como hipertensión arterial, resistencia a la insulina, diabetes, infecciones, asma, alergias alimentarias, etc. (17)

En este sentido, se deben mencionar los probióticos y prebióticos, los cuales ayudan en la modulación de la microbiota intestinal. Los probióticos se definen como microorganismos viables, inocuos, que, al ser ingeridos en cantidades suficientes, influyen beneficiosamente sobre la salud del hospedador, a través de sus efectos en el tubo intestinal, mientras que los prebióticos se definen como oligosacáridos no digeribles, como la inulina y la oligofruktosa, que sirven de sustrato para fermentación a la microbiota intestinal y mejora el crecimiento de microorganismos beneficiosos como *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* spp. Se ha demostrado que el consumo de probióticos y prebióticos se asocia a una mayor concentración de bacterias positivas y a una disminución de las gran negativas en las heces, con la consiguiente disminución de los niveles de LPS circulante, lo cual podría disminuir el desarrollo de la endotoxemia, y por ende, el desarrollo de obesidad y resistencia insulínica (10).

Por otro lado, los efectos de los probióticos en la diabetes tipo 2 han sido ampliamente demostrados en estudios con animales, con reducción de bacteroidetes, mayor abundancia de SCFA- bacterias productoras, disminución de los niveles de inflamación moléculas TNF α , IL-1, IL-6; niveles aumentados de GLP-1; y mejor resistencia a la insulina. Además, los probióticos reducen los fenotipos inflamatorios, mejoran la disfunción celular, y pueden tener efectos beneficiosos en la pared intestinal, reduciendo la permeabilidad intestinal y prevención de la translocación de LPS bacteriano (18).

Otra definición importante de desarrollar para esta investigación es la diabetes, la cual es una enfermedad crónica causada por herencia o adquirida, es la deficiencia en la producción de insulina por el páncreas o la incapacidad del cuerpo para hacer un uso adecuado de la insulina producida (19). Es frecuente encontrar que la diabetes se asocia a obesidad, diabetes o a hipertensión e hipercolesterolemia, y que forma parte del llamado síndrome metabólico (SM), que se relaciona con una alta probabilidad de desarrollar problemas cardiovasculares (20).

La diabetes mellitus (DM) tiene tres tipos: T1DM, T2M y DM gestacional (GDM), de ellos T2DM es más frecuente. Múltiples genes y sus interacciones están involucrados en la vía de secreción de insulina. El receptor de sulfonilurea codificado por el gen ABCC8, junto con el canal de iones de potasio rectificador interno (Kir6.2) regula la secreción de insulina por el canal K⁺ (KATP) sensible a ATP ubicado en las membranas plasmáticas. La interrupción de estas moléculas por diferentes mutaciones es responsable del riesgo de DM. Varios polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) del gen ABCC8 y su interacción están involucrados en la patogenicidad de la DM. Esta revisión resume la evidencia actual de la contribución de las variantes genéticas ABC8 al desarrollo de DM. (21)

Como ya se ha dicho, en resumen, la DM puede ser hereditaria o adquirida y la alimentación tiene mucha importancia, sobre todo por los efectos que tiene en la microbiota intestinal, varios estudios han llevado a descubrimientos interesantes que abren las fronteras para innovadores tratamientos de muchas enfermedades, incluida la diabetes tipo 2. Datos disponibles sugieren que la microbiota humana juega un papel importante en el inicio y mantenimiento de la resistencia a la insulina en estos pacientes. (22)

2. OBJETIVOS

Evaluar los potenciales efectos beneficiosos del pan con Masa Madre de Cultivo (MMC) en el perfil glucémico y en la composición de la microbiota intestinal en pacientes que tienen diabetes tipo 2.

Como objetivos específicos se han establecido:

1. Determinar los efectos del consumo de pan de masa madre en el perfil glucémico de pacientes diabéticos tipo 2.
2. Determinar los efectos del consumo de pan de masa madre en la composición de la microbiota intestinal de pacientes diabéticos tipo 2.
3. Identificar los beneficios o ventajas del consumo de pan de masa madre para pacientes diabéticos tipo 2.

3 HIPOTESIS

Se han planteado 2 hipótesis relacionadas con los objetivos de estudio:

- H1: El consumo de pan de MMC mejora el índice glucémico y otros parámetros sanguíneos como la hemoglobina glucosilada en pacientes diabéticos tipo 2.
- H2: El consumo de pan MMC ayuda en el restablecimiento o cambio significativo en la composición de la microbiota intestinal de pacientes diabéticos tipo 2.

4. MATERIAL Y METODOS

4.1. Diseño del estudio

Este estudio es de tipo cuantitativo mediante un estudio longitudinal y prospectivo, analítico experimental de tipo ensayo clínico a simple ciego, donde se establecerán 2 grupos: uno con pan integral de MMC y el otro con dieta de pan integral no elaborado con MMC. Los efectos beneficiosos para la salud de estos pacientes se intentarán demostrar mediante perfiles glucémicos distribuidos en varias veces al día a ambas poblaciones, medidas con test válidos, y mediante la composición de la microbiota intestinal a partir de las heces.

4.2. Pacientes

Los sujetos de estudio son 50 personas que sufran diabetes tipo 2 pertenecientes a la pedanía de San José de la Vega del municipio de Murcia, que cumplan los criterios de inclusión (diagnosticados de diabetes tipo 2, con un índice de masa corporal entre 18,5 y 40, que no están medicados con insulina, análogos de GLP-1 o inhibidores de DPP4, y que no hayan consumido suplementos con prebióticos o tomado probióticos en los últimos 2 meses), durante medio año.

4.3. Criterios de inclusión y exclusión

Aquellas personas que cumplan con los criterios establecidos serán incluidas en este estudio:

- a) Pacientes que sufran de diabetes de tipo 2.
- b) Pacientes de ambos sexos con un índice de masa corporal entre 18,5 y 40.
- c) Usuarios de San José de la Vega del Municipio de Murcia (España).
- d) Pacientes no medicados con insulina, análogos de GLP-1 o inhibidores de DPP4.

f) Personas que no hayan consumido suplementos con prebióticos o probióticos en los últimos 2 meses.

Los pacientes excluidos son:

- a) Pacientes que no sean diabéticos.
- b) Personas que no pertenezcan a San José de la Vega del Municipio de Murcia (España).
- c) Menores de 18 años.
- d) Quienes no firmen la autorización para el seguimiento médico respectivo.

4.4. Calculo del tamaño de la muestra

El tamaño de la muestra se determinará por la incidencia del nivel glucémico anual entre el periodo 2018-2019 en España. Se realizará el procesamiento de datos con el software Epidat®. En la investigación habrá 50 participantes, de allí 25 consumirá pan integral con MMC y los otros 25 sujetos consumirán pan integral sin MMC. Las variables cuantitativas se compararán mediante una prueba F de ANOVA.

4.5. Instrumentos y medidas

Para los datos sociodemográficos. Se empleará, antes de la intervención un cuestionario con datos sociodemográficos donde se obtendrá: la edad (años), sexo (hombre, mujer), nivel académico (básico/sin estudios, medios, superiores), estado civil (soltera, casado-en pareja, separado-divorciado y viudo) y ocupación (trabaja, desempleado, jubilado/pensionado).

En cuanto a los datos antropométricos y clínicos. Se hará una evaluación antropométrica, midiendo el peso (kg) y la estatura (m), con ello, se calculará el índice de masa corporal (IMC) en kilogramo por metro cuadrado (kg/m²). A la vez se efectuará un examen médico de heces y sangre, para registrar el perfil glucémico y los valores de la microbiota intestinal antes y después de la intervención en ambos grupos de participantes.

Para obtener los datos nutricionales, se aplicará un cuestionario antes, durante y después de la intervención para llevar un control y seguimiento del mismo. A los sujetos de estudio se les realizará una serie de preguntas (cuestionario) para conocer sobre su frecuencia alimentaria y consumo del pan integral en cada grupo de participantes. Un nutricionista se encargará de registrar los datos de la ingesta del pan integral con MMC y sin MMC.

Las variables de la glucosa en la sangre se medirán en ayuno por la mañana, y luego dos horas post prandial de glucosa en la sangre, a través de un glucómetro donde los pacientes registrarán los resultados diariamente por 6 meses consecutivos. La hemoglobina glucosilada (HbA1c) y un test bioquímica completo (Colesterol, colesterol LDL, colesterol HDL y TG) y un test de disbiosis intestinal, determinando la ultrasecuenciación de 16S rRNA través del análisis bioinformática comparativo al inicio, 3 meses y 6 meses.

4.6. Variables

La variable independiente será cualitativa: consumo de pan integral con MMC y sin MMC.

La variable dependiente será la incidencia de la MMC en los participantes:

- Sexo (hombre, mujer)
- Edad (años)
- Estado civil (soltero, casado-en pareja, separado-divorciado, viudo)
- Nivel de estudios (básicos/sin estudios, medios, superiores)
- Ocupación (trabaja, desempleado, jubilado-pensionista)
- Estatura (m)
- Peso (kg)
- IMC (kg/m^2)

- Examen de heces (microbiota intestinal), al inicio del estudio, a los 3 meses y a los 6 meses, por medio del test de disbiosis intestinal, para evaluar la microbiota intestinal, su actividad metabólica, marcadores intestinales y su composición. Determinando los géneros bacterianos mediante ultrasecuenciación de 16S rRNA (RNA ribosomal 16S) para compararlo con el resto de microbioma sanos secuenciados a través del análisis bioinformática comparativo.
- Nivel de glicemia a través de prueba de sangre, hemoglobina glucosilada (HbA1c) inferior al 7 %, al inicio del estudio, a los primeros 3 meses y luego a los 6 meses, prueba con glucómetro diaria (preprandial y postprandial) por parte del paciente donde anote los resultados durante los últimos 6 meses, más la realización de test bioquímica completo (Colesterol, colesterol LDL, colesterol HDL y TG) al inicio del estudio, a los 3 meses y a los 6 meses.

4.7. Procedimiento de recogida de datos

Los cuestionarios de recogida de datos serán aplicados en el centro de atención primaria del lugar de residencia de los participantes pertenecientes a la pedanía de San José de la Vega del municipio de Murcia. Los participantes serán convocados en grupos de 10 para la aplicación de los cuestionarios. La aplicación será llevada a cabo por una enfermera del centro médico que previamente instruida para los efectos de la investigación. Se acondicionará la sala con suficientes luz, en la aplicación del cuestionario primeramente se recolectarán datos personales, bajo fecha, edad y sexo, para hacer una codificación para registrar de manera adecuada la información de los mismos. Esta información será custodiada en el centro médico y bajo confidencialidad. Luego, serán vaciados y digitalizados para un posterior análisis estadístico.

4.8. Intervención

La intervención consistirá en la ingesta diaria de pan integral con masa madre (MMC) durante medio año (6 meses), 2 piezas de pan por la mañana y 2 piezas de pan en la cena. Mientras que el 2do grupo consumirá pan integral no elaborado sin masa madre, también por medio año, consumiendo 2 piezas de pan en los desayunos y 2 piezas de pan en las cenas. Ambos tipos de panes (con masa madre y sin masa madre) será producido en panaderías seleccionadas para los participantes, previo estudio de la información nutricional y contenido de bacterias presentes en las masas y registrado en una base de datos por el nutricionista.

Los investigadores estarán cegados a los tratamientos, ya que no tendrán conocimientos sobre las sucesivas evaluaciones y de los participantes que han sido incluidos en los diferentes grupos.

4.9. Análisis de los datos

El análisis de los datos será estadístico utilizando el software SPSS® de IBM®. Se hará un estudio descriptivo univariante de las variables en cada uno de los grupos, calculando estadísticamente la media y desviación estándar de las variables cuantitativas, en frecuencia y porcentaje de las variables cualitativas.

Las variables cuantitativas serán comparadas a través de la prueba F de ANOVA simple, previa comprobación de los supuestos de normalidad, con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

Si no se cumple con el supuesto de normalidad. Las variables cualitativas se compararán por medio de la prueba chi-cuadrado. Calculando la incidencia anual de las de personas con niveles glucémicos, comparando la incidencia mediante una prueba chi-cuadrado.

Por último, se aplicará un modelo predictivo teniendo en cuenta los datos de la ingesta nutricional correspondientes al consumo de pan integral con MMC y pan

integral sin MMC, en relación en edad, sexo, nivel académico, estado civil, entre otros.

5. ASPECTOS ETICOS

La investigación será aprobada los órganos correspondientes del centro de atención primaria pertenecientes a la pedanía de San José de la Vega del municipio de Murcia para su aprobación y conformidad.

El estudio cumplirá con los principios éticos establecidos por la Declaración de Helsinki para la experimentación con personas, aprobada por la Asociación Médica Mundial.

Igualmente se les informará a los participantes sobre el propósito y procedimientos del estudio, ya que para su participación, deberán firmar un consentimiento informado. El estudio se regula por lo plasmado en la guía de Buena Práctica Clínica, bajo la norma internacional de calidad ética y científica aplicable al diseño de los ensayos clínicos con seres humanos, promulgada por la Conferencia Internacional de Armonización. También se ajustará a los principios de la Declaración de Helsinki en relación a la investigación Biomédica.

REFERENCIAS

- 1.Houghton D, Hardy T, Stewart Ch, Errington L, y Christopher P. Day, Trenell MI & Avery L. Systematic review assessing the effectiveness of dietary intervention on gut microbiota in adults with type 2 diabetes. *Diabetología*. 2018 (citado el 28 de mayo de 2020); 68:1700-1711. Disponible en <https://link.springer.com/article/10.1007/s00125-018-4632-0>
- 2.Salgaço, M.K., Oliveira, L.G.S., Costa, G.N. et al. Relationship between gut microbiota, probiotics, and type 2 diabetes mellitus. *Appl Microbiol Biotechnol* 2019 (Citado el 28 de mayo de 2020) vol. 103, 9229–9238. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10156-y>
- 3.Guarner F. Papel de la flora intestinal en la salud y en la enfermedad. *Nutrición Hospitalaria*. 2007 (Citado el 28 de mayo de 2020) vol.22 supl.2. Disponible en http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112007000500003

4. Webedia. 8 abril 2015 Actualizado 16 Abril 2020. (Acceso el 10 de mayo de 2020). Directo al paladar. (2 plantillas). Disponible en <https://www.directoalpaladar.com/ingredientes-y-alimentos/masa-madre-natural-que-es-como-se-elabora-y-como-se-conserva>
5. Hola Living. 2010. Citado e 12 de mayo de 2010. Hola.Com Life Styl. Disponible en Hola.com Styl <https://www.hola.com/estar-bien/20190205136789/dieta-diabetes-pan-integral-cs/>
6. Rizello, C; De Ángelis, M.; Di Cagno, R. et al. Degradación de gluten altamente eficiente por lactobacilos y proteasas fúngicas durante el procesamiento de alimentos: nuevas perspectivas para la enfermedad celíaca. *América Society for Microbiology* (2007) Vol. 73(p.14). Acceso el 15 de mayo de 2020. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1932817/>
7. Dossche Mills. evaluación y caracterización de la influencia de las principales variables de la masa madre sobre las propiedades de ésta. Acceso el 15 de mayo de 2020. Recuperado de <https://mail.google.com/mail/u/0/?tab=rm&ogbl#inbox?projector=1>
8. Kissing, L. Veenstra, L. Una guía fundamentada para el gluten: cómo los genotipos modernos y el procesamiento impactan la sensibilidad al trigo. *Comprehensive Reviews in food Science and food safety*. (2015); Vol 14 (285-302) Acceso el 15 de mayo de 2020. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/272524692_A_Grounded_Guide_to_Gluten_How_Modern_Genotypes_and_Processing_Impact_Wheat_Sensitivity
9. Agromonegros. Propiedades nutricionales del trigo. (2016) Acceso el 15 de mayo de 2020. Recuperado de <http://www.agromonegros.com/blog/propiedades-nutricionales-del-trigo/>
10. Valero Y, Colina J y Herrera H. La microbiota intestinal y su rol en la diabetes. *Anales Venezolanos de Nutrición*. 2015 (Citado el 13 de mayo de 2020); Vol. 28, núm. 2. Recuperado en <https://www.analesdenutricion.org.ve/ediciones/2015/2/art-6/>
11. Rizzello C, De Angelis Ma., Dicagno, Raffaella et al. Highly Efficient Gluten Degradation by Lactobacilli and Fungal Proteases during Food Processing: New Perspectives for Celiac Disease. *America Society for Microbiology*.

2007. (Citado el 2 de junio de 2020) Vol. 73(14). Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1932817/>

12. American Diabetes Association. 2020 (Acceso el 10 de mayo de 2020) Su Consejo de diabetes. (2 pantallas). Disponible en https://professional.diabetes.org/sites/professional.diabetes.org/files/media/Type_2_Spanish.pdf

13. News Medicals Life Sciences. Medical Home. 2018 (Acceso el 10 de mayo de 2020) El papel de la insulina en el cuerpo humano. Disponible en [https://www.news-medical.net/health/Insulins-role-in-the-human-body-\(Spanish\).aspx](https://www.news-medical.net/health/Insulins-role-in-the-human-body-(Spanish).aspx)

14. Martin Gotteland, PhD. El papel de la microbiota intestinal en el desarrollo de la obesidad y de la diabetes de tipo 2 (Rev. chil. endocrinol. diabetes) 2013 (acceso el 10 de mayo de 2020); 6(4) 155-162. Disponible en https://www.researchgate.net/profile/Martin_Gotteland/publication/259800959_El_papel_de_la_microbiota_intestinal_en_el_desarrollo_de_la_obesidad_y_de_la_diabetes_de_tipo-2/links/5df78b04a6fdcc2837249b36/El-papel-de-la-microbiota-intestinal-en-el-desarrollo-de-la-obesidad-y-de-la-diabetes-de-tipo-2.pdf

15. Guarner F. Papel de la flora intestinal en la salud y en la enfermedad. Nutrición Hospitalaria. 2007 (Citado el 28 de mayo de 2020) vol.22 supl.2. Disponible en http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112007000500003

16. Icaza-Chávez, M.E. Microbiota intestinal en la salud y la enfermedad. Revista de Gastroenterología de México. (2013) Vol. 78 núm. 4 (p. 240-248). Acceso el 01 de junio de 2020. Recuperado de <http://www.revistagastroenterologiamexico.org/es-microbiota-intestinal-salud-enfermedad-articulo-S0375090613001468>

17. García-Casal Ma. y Pons-García H. Dieta e Inflamación. *Anales Venezolanos de Nutrición*. (2014). Vol. 27 (p 47-56). (Citado el 30 de mayo de 2020). Recuperado de <https://www.analesdenutricion.org.ve/ediciones/2014/1/art-9/>
18. López-Jaramillo Patricio, Sánchez Ramiro, Díaz M, Cobos Leonardo et al. Consenso Latinoamericano de Hipertensión en pacientes con Diabetes tipo 2 y Síndrome Metabólico¹. *Anales Venezolanos de Nutrición*. 2013 (Consultado el 30 de mayo de 2020); Vol. 26, núm. 1, p. 40-61. Disponible en <https://www.analesdenutricion.org.ve/ediciones/2013/1/art-6/>
19. Kawata Salgaco M, Segura Oliveira Liliane, Nobre Costa Giselle, et al. Relationship between gut microbiota, probiotics, and type 2 diabetes *Appl Microbiol Biotechnol*. 2019. (Consultado el 2 de junio de 2020). Vol. 103, p. 9229–9238. Disponible en <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10156-y>
20. Riobó S. Pautas dietéticas en la diabetes y en la obesidad. *Nutrición Hospitalaria* 2018; (Consultado el 2 de junio de 2020); Vol. 35(Extra 4): p. 109-115. Disponible [de https://www.medes.com/Public/ResumePublication.aspx?idmedes=138373](https://www.medes.com/Public/ResumePublication.aspx?idmedes=138373)
21. Haghverdizadeh P, Sadat Haerian Monir, Haghverdizadeh P & Sadat Haerian B. ABCC8 genetic variants and risk of diabetes mellitus. *Elsevier*. 2014. (Consultado el 2 de junio de 2020). Vol. 545, p.198-204. Disponible en <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378111914004715?via%3Dihub>
22. Sircana A., Framarin L., Leone N. et al. Altered Gut Microbiota in Type 2 Diabetes: Just a Coincidence?. *Curren Diabetes Reports*. 2018. (Concultado el 3 de junio de 2020). Vol. 18, 98. <https://doi.org/10.1007/s11892-018-1057-6>