

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Título: Modificación de la microbiota intestinal en base al tratamiento para la Diabetes Mellitus II

Alumno: Cenis Cifuentes, Laura

Tutor: Candela García, Inmaculada

**Master Universitario de Investigación en Atención Primaria
Curso: 2019-2020**

Índice:

Pregunta de investigación:	3
Pregunta en formato PICO:	4
Antecedentes y estado actual del tema:	4
Justificación:	6
Hipótesis:	6
Objetivos de la investigación:	8
Material y métodos:	8
Tipo de diseño:	8
Población diana y población a estudio:	8
Criterios de inclusión y exclusión:	8
Cálculo del tamaño de la muestra:	9
Método de muestreo:	9
Método de recogida de datos:	10
Descripción de la intervención:	10
Estrategia de análisis estadístico: test y procedimientos	11
Programa estadístico a utilizar:	11
Aplicabilidad y utilidad de los resultados si se cumpliera la hipótesis:	11
Estrategia de búsqueda bibliográfica:	11
Calendario y cronograma previsto para el estudio:	11
Limitaciones y posibles sesgos, y métodos utilizados para minimizar los posibles riesgos:	12
Posibles problemas éticos:	13
Modelo de Consentimiento:	13
Ley de protección de datos:	13
Personal que participara en el estudio y cuál es su responsabilidad:	14
Presupuesto	14
Anexo 1: Consentimiento Informado	16
Anexo 2: Entrevista clínica	18

Resumen:

En el presente protocolo pretendemos crear un estudio de medidas repetidas, en el cual se analice la composición taxonómica y porcentual de las bacterias que pueblan el aparato intestinal, conocido como microbiota, de los pacientes diabéticos de reciente debut, antes y después de la administración de metformina, demostrando como objetivo principal que esta va a provocar un cambio en esta composición.

Esto es porque recientemente se está demostrando la implicación de la microbiota en los procesos metabólicos a nivel de todo el organismo de los seres vivos, incluyendo en esta implicación a enfermedades tan prevalentes como la Diabetes tipo II.

Si la metformina, como principal fármaco antidiabético, tuviera una de sus dianas de actuación sobre la modulación de la microbiota, se abre la pregunta de si podrían existir otro tipo de medidas de actuación sobre la misma, como por ejemplo probióticos o suplementos de fibra, que pudieran modificarla para conseguir un efecto similar al del fármaco, sin los efectos secundarios indeseables que se pudieran derivar de la utilización del mismo.

Dado que no solo la metformina puede cambiar la composición de la microbiota, encontramos interesante como objetivo secundario analizar también si se produce una diferencia entre las poblaciones predominantes de bacterias en pacientes que toman además estatinas y/o IECAS, pues no tener esto en consideración podría producir un sesgo importante en el estudio.

El estudio va a ser realizado a nivel de Atención Primaria, usando como sujetos a pacientes del cupo del centro de salud. Si conseguimos encontrar una manera efectiva, eficiente y simple de analizar las muestras de heces de los pacientes, a nivel de consulta, podríamos aplicarla en la individualización de tratamientos dirigidos a los mismos, no únicamente para el tratamiento de la diabetes, sino también en muchas otras enfermedades donde se ha demostrado la gran implicación de la microbiota.

Pregunta de investigación:

La pregunta a responder con este protocolo sería: ¿En pacientes con diagnóstico de debut de diabetes tipo II, hay una diferencia en su microbiota intestinal antes y después del tratamiento farmacológico con metformina? ¿Hay otros fármacos que influyan en este cambio, y que a menudo estén asociados a pacientes diabéticos, como son estatinas e IECAS, dentro del síndrome metabólico?

Pregunta en formato PICO:

- **Pacientes:** personas con reciente diagnóstico de diabetes.
- **Intervención:** estudio de la microbiota
- **Comparación:** diferencias entre la microbiota del mismo paciente antes y después del tratamiento con metformina. Análisis comparativo entre los diferentes grupos según si han tomado tratamiento previo para hipertensión o dislipemia.
- **Resultados:** Cambio en la flora intestinal tras el tratamiento farmacológico con metformina. Diferencias la microbiota previo al uso de metformina si el paciente usaba o no otros fármacos.

Antecedentes y estado actual del tema:

Entendemos por microbiota intestinal la multitud de bacterias que pueblan el aparato gastrointestinal de los seres vivos, como seres colonizadores naturales, y que participan en procesos metabólicos que afectan al resto del organismo.

Recientemente, y con el desarrollo de nuevas técnicas de análisis, se ha podido comprobar hasta qué punto influyen en la regulación de la homeostasis del cuerpo, y sus vías metabólicas de actuación. Por ejemplo, producen metabolitos como ácidos grasos de cadena corta, ácidos biliares secundarios, y participan en el metabolismo de la glucosa (1). Son también mediadores de la permeabilidad de la mucosa intestinal.

Variaciones en la composición y la funcionalidad de la microbiota, conocido como disbiosis, puede llevar a procesos patológicos, como obesidad, resistencia a la insulina y diabetes mellitus tipo II (en adelante DM II), enfermedades inflamatorias crónicas intestinales, cáncer, alteraciones hepáticas, y enfermedades cardiovasculares entre otras (2).

Centrándonos en su implicación en la DM II, se ha visto una clara diferencia entre las poblaciones de microbiota que predominan en estos pacientes respecto a los pacientes sanos, con consecuencias directas de este contraste. Las bacterias intestinales producen abundantes metabolitos relacionados con un riesgo aumentado de padecer DM II, estando estos asociados a una disminución de la secreción y de la sensibilidad a la insulina. Esto hace que se puedan postular los metabolitos de ciertas familias de la microbiota como marcadores de riesgo previos al diagnóstico de DM II (3).

Hay multitud de procesos que pueden afectar la respuesta glucémica post prandial de un individuo a un mismo alimento, siendo esta respuesta un factor de riesgo independiente para el desarrollo de la diabetes (4). Entre los responsables de esta variación entre individuos encontramos, entre otros, la composición taxonómica de la microbiota intestinal, estando ciertas familias de bacterias asociadas.

En estudios previos (5) se demuestra esta relación y se desarrolla un algoritmo, junto con otros parámetros clínicos, permiten una personalización de

intervenciones dietéticas, alcanzando de esta manera una mejor respuesta glucémica y una mejora en el metabolismo de la glucosa, y demostrando un camino interesante a seguir con respecto al análisis de la microbiota intestinal y su papel en la personalización del tratamiento.

Así pues, hay familias de bacterias, como la *Roseburia inulinivorans*, *Eubacterium eligens*, *Bacteroides vulgatus* y *Bacteroidetes phylum* cuyos niveles bajos se han relacionado con un peor metabolismo de la glucosa, y que aumentan su proporción tras una dieta adecuada. En cambio, familias como *Anaerostipes* disminuyen con una dieta equilibrada, y se relacionan con una disminución de la tolerancia a la glucosa y con triglicéridos elevados en ratones. Finalmente, bajos niveles de *Alistipes putredinis* se asocian con la obesidad, y sus niveles aumentan siguiendo una buena dieta (5).

Recientemente, en un estudio de casos y controles, comparaban pacientes con prediabetes con un control de pacientes con buena regulación de la glucosa (6), destacando en los primeros un predominio de especies como *Prevotella copri* y *Bacteroides vulgatus*, que sintetizan BCAAs (aminoácidos ramificados), cuyos niveles elevados activan la diana del complejo de rapamicina 1, resultando en provocar resistencia a la insulina a través de la fosforilación de la insulina receptor substrato 1. El género *Clostridium*, por su parte, estaba disminuido, mientras *Dorea*, *Sutterella* y *Streptococcus* estaban incrementados. Miembros del orden *Clostridiales* y *Akkermansia muciniphila* estaban especialmente descendidos, provocando una producción muy baja de ácido butírico, un ácido graso de cadena corta que es el principal substrato de las células intestinales, y cuyo descenso se ha relacionado con la diabetes.

Respecto a la metformina, uno de los antidiabéticos más utilizados, Sun et al (7), realizaron un estudio en 2018 de muestras de heces de individuos con reciente diagnóstico de DM II, tratados por primera vez con metformina durante únicamente tres días, comprobándose una reducción del porcentaje total de la familia *Bacteroides fragilis* en el total de la microbiota. Esta especie de bacterias se encarga de convertir ácidos biliares primarios en secundarios, mediante la acción de una enzima conocida como Hidrosilasa de sales biliares, y esto desemboca en un aumento de los antagonistas del Receptor X fernesioide, aumentando la sensibilidad a la insulina.

Estos y otros descubrimientos han desembocado en propuestas para terapias con objetivos de regulación sobre la microbiota, ya sea con probióticos, complementos de fibra en la dieta o con trasplante de heces (8). Sería muy interesante disponer de líneas terapéuticas que reforzaran el tratamiento farmacológico ya establecido, o que incluso previnieran la aparición de la enfermedad.

Por último, es importante señalar que la microbiota, además de constituir una posible diana terapéutica en sí misma, puede interactuar con los fármacos administrados a los pacientes, alterando así su metabolismo, y consecuentes modificaciones en la farmacocinética y farmacodinamia, o incluso en la formación de compuestos tóxicos que pueden interferir con la respuesta del

paciente al fármaco, afectando a la eficacia del mismo (9). Se ha llegado a proponer un importante papel de la microbiota en la variabilidad de respuesta a los fármacos administrados de manera oral (10).

Es por esto que el análisis de la microbiota se está irguiendo como uno de los objetivos más interesantes y prometedores del campo de la medicina.

Justificación:

Se ha comprobado, pues, que el uso de la metformina altera la composición taxonómica de la microbiota, pudiendo ser la modulación de la misma una de sus dianas de acción en el resultado hipoglucemiante del fármaco. Sin embargo, las bacterias específicas afectadas aún no se conocen (11)(7).

Basándonos entonces en la abundante bibliografía apoyando la relación de la microbiota en la actividad de la metformina, (12) busquemos comprobarlo a nivel de campo, en nuestra consulta de Atención Primaria.

Consideramos que, si los resultados son significativos, y el método de análisis de heces sencillo, podría resultar beneficioso el estudio de las heces en un futuro para optimizar e individualizar el tratamiento de cada paciente (5).

Por ejemplo, podría aplicarse el análisis en un paciente con prediabetes con el fin de regular la disbiosis de su microbiota con suplementos de fibra o de familias de bacterias, previo al tratamiento farmacológico. O bien en pacientes ya diagnosticados de DM II que no obtienen buenos resultados únicamente con la metformina, complementando el tratamiento farmacológico con estos suplementos, previo a añadir o cambiar a otro fármaco.

Hipótesis:

A raíz de la bibliografía consultada, podemos inferir que existen numerosas evidencias que apuntan a que una disbiosis intestinal desempeña un papel etiopatogénico importante en la DM II. Por otro lado, la presencia de disbiosis podría afectar significativamente a las acciones farmacológicas y farmacocinéticas de los tratamientos utilizados en esta enfermedad, con una consecuente reducción o ineficacia y el impacto negativo en la vida de los pacientes que esto conllevaría.

Por lo tanto, las hipótesis planteadas son:

- La DM II se asocia con una alteración de la composición que podría condicionar una alteración en la eficacia del tratamiento farmacológico.
- El conocimiento de las características de la microbiota intestinal antes de iniciar el tratamiento farmacológico correspondiente podría informar sobre su eficacia futura, permitiendo de esta forma una individualización del mismo, y un aumento de su adecuación y eficacia.

- Se produce una diferencia después del uso de la metformina en la microbiota intestinal de los pacientes, con un cambio de la abundancia y la composición de unas determinadas bacterias frente a otras.
- Es habitual que un paciente diabético tenga asociados otros problemas concomitantes como son la dislipemia o la hipertensión arterial, por lo cual será habitual que consuma previo a nuestro análisis IECAS o estatinas. Estos fármacos podrían producir de manera independiente un cambio propio en la microbiota intestinal, por lo que será interesante comprobar si existe esta diferencia pretratamiento con metformina dividiendo a los pacientes en tres grupos de tratamiento: un primer grupo sin tratamiento previo, otro con tratamiento con IECAS y otro con tratamiento con estatinas.

Como variables principales vamos a estudiar aquellas bacterias presentes en la microbiota, cuyos niveles están relacionados con la DM II. Por lo tanto, las variables son el número total de las siguientes bacterias y su cambio porcentual tras el tratamiento: *Roseburia inulinivorans*, *Eubacterium eligens*, *Bacteroides vulgatus*, *Bacteroidetes phylum*, *Alistipes putredinis*, *Clostridium*, *Dorea*, *Sutterella*, *Streptococcus*, *Bacteroides Fragilis*, *Faecalibacterium*, *Oscillibacter*, *Roseburia*, *Bifidobacterium*, *Coprococcus*, *Butyrivibrio*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Clostridiaceae/Lachnospiraceae*, *Coprococcus*, *Collinsella* y *Eggerthella*.

Es de esperar lo siguiente en pacientes diabéticos:

- Niveles bajos de *Roseburia inulinivorans*, *Eubacterium eligens*, *Bacteroides vulgatus*, *Bacteroidetes phylum*, *Alistipes putredinis* y *Clostridium*.
- Abundancia de *Dorea*, *Sutterella*, *Streptococcus* y *Bacteroides Fragilis*.
- Tras el tratamiento con metformina, esperamos que la población haya cambiado, aumentando o disminuyendo su abundancia, especialmente con una disminución de la población de *Bacteroides Fragilis*, y con una mejoría de los índices glucémicos.

En pacientes hipertensos, por su parte:

- Reducción en los niveles de bacterias pertenecientes a los géneros *Faecalibacterium*, *Oscillibacter*, *Roseburia*, *Bifidobacterium*, *Coprococcus* y *Butyrivibrio*, junto con un incremento en *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Prevotella* y *Fusobacterium* (13).

Y en pacientes dislipémicos:

- *Clostridiaceae/Lachnospiraceae* está especialmente asociada con los niveles de LDL, mientras que los géneros *Coprococcus*, *Collinsella* o *Eggerthella* se relacionan con niveles elevados de triglicéridos, estando las bacterias del último género asociadas a niveles bajos de HDL.

Otros datos que nos interesa registrar de nuestros sujetos son: historia clínica y hábitos diabéticos, estudio de comorbilidades (dislipemia y/o hipertensión), cifras glucemia en sangre (mg/dL), hemoglobina glicosilada (%), tensión arterial (mmHg), nivel LDL (mg/dL), HDL (mg/dL), y Triglicéridos (mg/dL).

Objetivos de la investigación:

Por lo mencionado anteriormente, el objetivo principal del estudio, consiste en estudiar la composición porcentual de las diferentes poblaciones que componen la microbiota intestinal de pacientes recientemente diagnosticados de diabetes tipo II, previo y posterior a la administración de la metformina para comparar este posible cambio, usando a cada paciente como caso-control. Como objetivo secundario, comprobaremos si previo al uso de la metformina hay diferencias entre las microbiotas de los pacientes en base a si usan estatinas, IECAS, o no han recibido ningún tratamiento previo.

Material y métodos:

Tipo de diseño:

Vamos a utilizar un estudio de medidas repetidas, con el objetivo de analizar la población bacteriana de las heces antes y después del tratamiento con metformina, elaborando un análisis intrapersonal. Así mismo, compararemos los resultados pretest entre los diferentes grupos de pacientes, realizando un análisis interpersonal, y dividiendolos en tres grupos en base a si no tomaban ningún tratamiento previo, si tomaban IECAS o estatinas.

Población diana y población a estudio:

Nuestra población diana la componen pacientes diabéticos de entre 35 y 75 años de edad de residencia en España, que es la franja de edad de mayor prevalencia de diagnóstico de la enfermedad. Excluimos a pacientes más mayores suponiéndoles una mayor dificultad para participar en el estudio. La población a estudio va a estar compuesta por pacientes asignados al centro de salud de Vistabella, en Murcia.

Criterios de inclusión y exclusión:

Los criterios de inclusión en el estudio son los establecidos por la ADA para el diagnóstico de diabetes (4):

- Glucosa en ayuno > o igual a 126 mg/dL,
- Glucosa plasmática a las 2h > o igual a 200mg/dL durante una prueba oral de tolerancia a la glucosa, con una carga de 75g de glucosa disuelta en agua.
- Hemoglobina glicosilada > o igual a 6.5%

Deberán ser pacientes que no hayan recibido tratamiento anteriormente con antidiabéticos orales, ni otro tipo de fármacos. Únicamente se admitirán IECAS o Estatinas concomitantes.

Se excluirá así mismo a:

- Pacientes que no acepten firmar el consentimiento informado.
- Que presenten algún tipo de enfermedad de afectación intestinal.
- Pacientes polimedicados con fármacos diferentes a IECAS o estatinas.
- Pacientes con dificultades para recoger de manera adecuada la muestra
- Pacientes que no puedan desplazarse al centro de salud.
- Embarazadas o lactantes.

Cálculo del tamaño de la muestra:

Dado que la población de diabéticos en el centro de salud de Vistabella, en Murcia, es de 1432 pacientes, para un nivel de confianza de un 95%, una precisión del 3% y una proporción del 5% estimamos un tamaño muestral de 178 pacientes. Con un cálculo de pérdidas en el estudio de un 15%, aumenta hasta 209 pacientes.

Método de muestreo:

Las responsables del estudio explicaremos al comienzo del estudio los criterios de inclusión y exclusión del mismo a los diferentes doctores y doctoras del centro de salud (8 consultas en total que han aceptado participar).

Utilizaremos dentro del estudio el OMI-AP, que es un programa informático de uso generalizado en las consultas de Atención Primaria de Murcia. En este se recogen las historias clínicas de los pacientes, incluyendo antecedentes personales y familiares, resultados de analíticas y resto de pruebas complementarias, planes personales de cribado y prevención de enfermedades según edad y sexo del paciente, e informes de resto de especialistas. Nos permite crear episodios separados para cada enfermedad que padezca el paciente, para dividir y ordenar la información.

El primer momento en el que utilizaremos el programa es para localizar dentro de los cupos de cada médico del Centro de Salud los posibles candidatos a participar en el estudio, mediante los episodios de OMI-AP correspondientes a “glucemia basal alterada”, “prediabetes” o “diabetes tipo II” (en este último caso solo a los que aún no hayan iniciado tratamiento), pues una de las herramientas que ofrece el programa es un listado de los pacientes que presentan dichos episodios dentro de sus historias clínicas.

Además, mediante los episodios podremos preseleccionar a los pacientes de cada grupo antes descrito, si también tienen un episodio correspondiente a “dislipemia” o “hipertensión arterial”, ambas ya en tratamiento.

De esta manera, escogeremos e iremos citando a los pacientes, llamándoles por teléfono para explicarles brevemente el estudio y acordando una cita según su disponibilidad. Se incluirán de manera progresiva en el estudio tras firmar el consentimiento informado, siguiendo un muestreo consecutivo según su orden de llegada a la consulta tras la cita acordada telefónicamente.

Método de recogida de datos:

Dentro de la primera cita con el paciente, y tras la firma del consentimiento informado, se realizará una entrevista al paciente sobre sus hábitos alimenticios básicos, en busca de posibles sesgos derivados de su tipo de alimentación. Dentro de la entrevista, se indagará por la historia familiar de diabetes, y los fármacos que haya consumido previamente el paciente en los últimos 5 años. Se recurrirá a la historia clínica del paciente reflejada en el sistema informático del centro de salud (OMI- AP) si faltan por completar datos.

En esta primera cita, además, se indicará al paciente como recoger la muestra de heces y se realizará una analítica ex profeso. Si el paciente ya cumple los criterios de ADA antes descritos y su doctor lo considera conveniente, prescribirá el tratamiento con Metformina.

A la mañana siguiente, el paciente traerá la muestra de heces al centro de salud, y ya podrá comenzar el tratamiento en su domicilio.

Según si previamente tomaba estatinas, IECAS, o ningún fármaco se asignará a cada grupo de estudio.

En la siguiente cita se realizará una nueva toma de glucemia y el paciente aportará una nueva muestra de heces.

Descripción de la intervención:

Una vez decido que el paciente cumple los criterios necesarios de inclusión, se decidirá su permanencia a uno de los tres grupos (no tratamientos previos, tratamiento con estatinas y tratamiento con IECAS) y se recogerá una muestra de heces previo al tratamiento con metformina.

Esta muestra se conservará en frío hasta su correspondiente análisis, por parte de una empresa externa, y se objetivaran las poblaciones predominantes de bacterias intestinales en la misma.

Se realizarán el máximo número de citas en uno o dos días, de manera que podamos acumular y enviar varias muestras a la vez a la empresa, mediante mensajería, y no pase más de dos días desde la recogida de las heces.

Posteriormente a la recogida de las heces, se administrará la metformina y un mes más tarde se volverá a solicitar una nueva muestra de heces para compararla con la muestra previa, siendo analizada por la misma empresa.

Estrategia de análisis estadístico: test y procedimientos:

Dado que nuestra variable es la composición bacteriana de manera porcentual, aplicaremos como estadístico el Chi cuadrado, para comparar variables categóricas. Se aplicará la prueba exacta de Fisher cuando fuera necesario.

Programa estadístico a utilizar:

Todos los procedimientos estadísticos se realizarán utilizando la aplicación SPSS en un ordenador PC (SPSS base v25, SPSS Inc, Chicago, USA). El error alfa será en todos los casos del 5%. Utilizamos también el software libre R Commander 3.1.1 versión portable, R foundation for statistical computation 2014.

Aplicabilidad y utilidad de los resultados si se cumpliera la hipótesis:

El objetivo general de este proyecto va encaminado a la búsqueda de una mejora en la individualización del tratamiento de la DM II. Si se incorpora el estudio mediante las muestras de heces, se puede llegar a usar como una herramienta complementaria, a la hora de decidir el fármaco que mejor se ajusta a las características del paciente según su microbiota del paciente, y de esta manera conseguir una mejor respuesta terapéutica.

Estrategia de búsqueda bibliográfica:

Para la búsqueda bibliográfica hemos utilizado predominantemente el buscador Pubmed, utilizando los Mesh "Gastrointestinal Microbiome" AND "Diabetes Mellitus" AND "Metformin" principalmente, así como "Drug response", "Hipertension" y "Dyslipidemias" Hemos utilizando como filtro que fueran artículos de los últimos 5 años, y que se trataran principalmente de ensayos clínicos y revisiones sistemáticas.

Calendario y cronograma previsto para el estudio:

El comienzo del estudio y la toma de muestras va a ser en octubre de 2020. Previamente a esto, durante agosto y septiembre de 2020, localizaremos dentro de los cupos de cada médico del Centro de Salud los posibles candidatos a participar en el estudio, mediante los episodios del programa OMI-AP correspondientes a "glucemia basal alterada", "prediabetes" o "diabetes tipo II" (en este último caso solo a los que aun no hayan iniciado tratamiento). Además, mediante los episodios podremos preseleccionar a los pacientes de cada grupo antes descrito, si también tienen un episodio correspondiente a "dislipemia" o "hipertensión arterial", ambas ya en tratamiento.

Contactaremos con ellos telefónicamente para explicarles las características del mismo y averiguar los que están interesados en participar.

A los que sí, los citaremos a partir de octubre, intentando agrupar el máximo número de citas posibles.

En esta primera cita se realizará la entrevista clínica y la toma de glucemia. Al día siguiente deberán traer la muestra de heces, que recibirán las auxiliares de

enfermería en la recepción, y posteriormente a esto comenzarán con la toma de Metformina en su domicilio.

Calculamos que el proceso de toma de datos y muestras se prolongará desde octubre hasta diciembre, hasta completar el tamaño muestral requerido.

Un mes más tarde de la toma de la primera muestra para cada paciente y del comienzo de la toma del fármaco se citará al paciente para una nueva entrevista clínica, toma de glucemia y la segunda muestra de heces. Esto se prolongará durante otros tres meses.

Durante abril se analizarán estadísticamente los datos recibidos desde el laboratorio con respecto a la muestras primera y segunda de heces. En mayo se realizará la interpretación de los datos obtenidos y las conclusiones derivadas.

LISTADO DE TAREAS	ago-20	sep-20	
	Selección de candidatos Contacto telefónico Planear citas		
	oct-20	nov-20	dic-20
	Primera cita: Firmar consentimiento informado Entrevista clínica Toma de glucemia (Mañana siguiente): Recogida de la primera muestra de heces Comienzo toma Metformina		
	ene-21	feb-21	mar-21
	Segunda cita: Indagar cumplimiento terapéutico Segunda toma de glucemia Recoger segunda muestra de heces		
	abr-21	may-21	
Análisis estadístico de los datos recibidos del laboratorio externo.	Interpretación de los datos obtenidos y conclusiones.		

Figura 1. Cronograma del estudio

Limitaciones y posibles sesgos, y métodos utilizados para minimizar los posibles riesgos:

Probablemente el sesgo más frecuente al que nos enfrentamos es el sesgo de selección, bien en el momento del comienzo del estudio a la hora de aplicar correctamente los criterios de inclusión o exclusión de los pacientes, o durante el seguimiento por las pérdidas de los pacientes. Para minimizar lo primero,

aplicaremos los criterios previamente descritos estrictamente, y ante cualquier duda de su idoneidad no incluiremos al paciente candidato. Para evitar las posibles pérdidas, hemos intentado que el tiempo entre la primera y segunda toma de muestras sea el mínimo posible, y de esta manera no perder al paciente por cambio de domicilio y/o centro de salud, olvido de su participación u otras circunstancias derivadas de un seguimiento a largo plazo.

Se puede dar el sesgo de autoselección, siendo los pacientes que aceptan participar en el estudio de unas características diferentes a los no voluntarios. Sin embargo, consideramos que esto no va a ser un problema por la inocuidad de la prueba y la probabilidad de que la mayoría de los seleccionados quieran participar.

También se puede producir un sesgo de memoria, si los pacientes no recuerdan haber tomado una determinada medicación en el último año, al realizar la entrevista, y de esta manera la modifica la microbiota. Para minimizar este sesgo, comprobaremos las prescripciones realizadas por su médico, que quedan reflejadas en OMI-AP.

Por último, otro posible sesgo es por la existencia de alguna variable modificadora del efecto en la que no hayamos pensado, es decir alguna característica intrínseca del paciente, o bien algún alimento o fármaco que nos pueda modificar la microbiota de manera significativa. Si en las primeras muestras de heces obtenemos algunas muy heterogéneas al resto tendremos que indagar con mayor profundidad en las características de ese paciente en concreto, y extraerla del estudio.

Posibles problemas éticos:

Los pacientes preseleccionados serán invitados a participar y tras la explicación detallada del procedimiento, firmarán un consentimiento informado, disponible en el Anexo 1, siguiendo la Declaración de Helsinki (Brasil, 2013), Las muestras y datos clínicos serán almacenados y custodiados de acuerdo a la legislación autonómica y estatal.

Las muestras biológicas donadas y sus datos personales y clínicos asociados a dichas muestras serán confidenciales y se tratarán de acuerdo con el Reglamento (UE) 2016/679, General de Protección de Datos y la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica.

En principio, dada la inocuidad de la muestra solicitada y la falta de intervención por nuestra parte en el tratamiento o diagnóstico habitual de los pacientes con prediabetes no hay un claro problema ético.

Modelo de Consentimiento:

Se incluye el modelo en el Anexo 1. Se ha realizado siguiendo la Declaración de Helsinki (Brasil, 2013).

Ley de protección de datos:

Se anonimizarán los pacientes en la base de datos, utilizando el SIP para la extracción de los datos necesarios en su Historia Clínica y posteriormente se le asignará un número consecutivo aleatorio a cada paciente, de tal forma que la base de datos con la que se trabajará no dispondrá de los datos de SIP.

Personal que participara en el estudio y cuál es su responsabilidad:

Las principales responsables del estudio somos tres compañeras médicas residentes de Medicina Familiar y Comunitaria, del Centro de Salud de Vistabella, en Murcia.

Formaremos un equipo investigador destinado a seleccionar los pacientes que queremos incluir en el estudio, de realizar los consentimientos informados, de recibir y enviar las muestras de heces y de la interpretación de los datos obtenidos.

Para la toma de glucemia contaremos con la ayuda de las enfermeras del centro.

El análisis de las heces, se realizará a través de un laboratorio privado que se encargará, mediante técnicas de PCR, de analizar y proporcionarnos los datos sobre las familias de bacterias que componen la microbiota de cada muestra de heces y su proporción con respecto al resto de familias.

Con estos datos recibidos desde la empresa, un médico adjunto del centro de salud aplicará el programa estadístico SPSS Statistics, y con los resultados nosotras realizaremos las conclusiones del estudio.

Instalaciones, instrumentación si fuera necesario:

Respecto a las instalaciones, necesitaremos una consulta médica como habitación en la que entrevistar a los pacientes, así como una consulta de enfermería para la medición de la glucemia capilar y la extracción sanguínea. Para esto necesitaremos glucometer, tiras reactivas para el mismo, y material de extracción sanguíneo.

Para el análisis de heces utilizaremos un kit específico (Fisherbrand Commode Specimen Collection System), que consiste en un bastoncillo donde se impregna las heces y un tubo para proteger el mismo. Se deberá conservar en frío hasta enviarlo al laboratorio.

Presupuesto

La empresa de análisis de heces cobra 50 euros por cada muestra, aportando ellos el medio para recoger las muestras. Los análisis de sangre forman parte de el procedimiento habitual para el diagnostico de diabetes, proporcionado por el sistema sanitario público de Murcia. No se realizarán más análisis de los indicados habitualmente en beneficio de este estudio.

Presupuesto desglosado:

- Análisis de heces del total de la muestra: 50 euros x 209 pacientes
- Trabajo estadístico: Comentado caso con presupuesto de 500 euros por trabajo completo
- Licencia SPSS base v25 de 1 mes para realización de tablas y obtener datos del estadístico: 95.53 euros
- TOTAL: 11,045.53

Bibliografía:

1. Caesar R. Pharmacologic and Nonpharmacologic Therapies for the Gut Microbiota in Type 2 Diabetes. *Can J Diabetes [Internet]*. 2019;43(3):224–31. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jcjd.2019.01.007>
2. Zhang YJ, Li S, Gan RY, Zhou T, Xu DP, Li H Bin. Impacts of gut bacteria on human health and diseases. *Int J Mol Sci*. 2015;16(4):7493–519.
3. Vangipurapu J, Fernandes Silva L, Kuulasmaa T, Smith U, Laakso M. Microbiota-Related Metabolites and the Risk of Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2020;dc192533.
4. American Diabetes Association 2020 Resumen de clasificación y diagnóstico de la diabetes. 2020;1.
5. Zeevi D, Korem T, Zmora N, Israeli D, Rothschild D, Weinberger A, et al. Personalized Nutrition by Prediction of Glycemic Responses. *Cell*. 2015;163(5):1079–94.
6. Allin KH, Tremaroli V, Caesar R, Jensen BAH, Damgaard MTF, Bahl MI, et al. Aberrant intestinal microbiota in individuals with prediabetes. *Diabetologia*. 2018;61(4):810–20.
7. Sun L, Xie C, Wang G, Wu Y, Wu Q, Wang X, et al. Gut microbiota and intestinal FXR mediate the clinical benefits of metformin. *Nat Med [Internet]*. 2018;24(12):1919–29. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41591-018-0222-4>
8. Lee SE, Choi Y, Jun JE, Lee Y Bin, Jin SM, Hur KY, et al. Additional effect of dietary fiber in patients with type 2 diabetes mellitus using metformin and sulfonylurea: An open-label, pilot trial. *Diabetes Metab J*. 2019;43(4):422–31.
9. Tuteja S, Ferguson JF. Gut Microbiome and Response to Cardiovascular Drugs. *Circ Genomic Precis Med*. 2019;12(9):421–9.
10. Sharma A, Buschmann MM, Gilbert JA. Pharmacomicrobiomics: The Holy Grail to Variability in Drug Response? *Clin Pharmacol Ther*. 2019;106(2):317–28.
11. Guo GL, Xie W. Metformin action through the microbiome and bile acids. *Nat Med*. 2018;24(12):1789–90.
12. Greenhill C. Effects of metformin mediated by gut microbiota. *Nat Rev Endocrinol [Internet]*. 2018;15(1):2. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41574-018-0133-y>
13. Li J, Zhao F, Wang Y, Chen J, Tao J, Tian G, et al. Gut microbiota dysbiosis contributes to the development of hypertension. *Microbiome [Internet]*. 2017;5(1):1–19. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s40168-016-0222-x>

Anexos:

Anexo 1: Consentimiento Informado

Hoja de información para el paciente

Los miembros del equipo de investigación, liderado por Laura Cenis Cifuentes, están llevando a cabo un estudio titulado: Modificación de la microbiota intestinal en base al tratamiento para la Diabetes Mellitus II.

Para este estudio se pretende analizar la microbiota intestinal de pacientes diabéticos en relación a la toma de metformina. Esto se hace mediante un análisis de heces, que se recogen de manera indolora. El resto de actuaciones que se necesitan para el estudio por parte del paciente forman parte del algoritmo diagnóstico y terapéutico habitual para la Diabetes Mellitus II. Como parte del estudio le pediremos que rellene también una entrevista con una serie de preguntas sobre sus antecedentes personales y sus hábitos diabéticos.

En el contexto de esta investigación, solicitamos su colaboración para beneficiarse de los posibles valores y conocimientos derivados del estudio, puesto que cumple con los siguientes criterios de inclusión:

- Ser paciente varón o mujer, de entre 35-75 años con reciente diagnóstico de Diabetes tipo II, no tratada hasta el momento con fármacos antidiabéticos.
- No tomar ningún otro fármaco que pueda alterar la microbiota intestinal, o bien únicamente tomar fármacos de las familias de los IECAS o las Estatinas (fármacos antihipertensivos y hipolipemiantes respectivamente).
- No padecer de ninguna enfermedad intestinal que pueda afectar a los datos obtenidos de la microbiota.

El participante tiene que leer y responder las siguientes preguntas:

- He leído toda la información proporcionada en este proyecto SÍ / NO
- He tenido la oportunidad de hacer preguntas sobre el proyecto SÍ / NO
- He recibido suficiente información sobre este proyecto SÍ / NO
- He recibido respuestas satisfactorias a todas mis preguntas SÍ / NO
- ¿Has comprendido que eres libre de abandonar este proyecto sin que esta decisión te afecte de manera negativa? SI / NO
- En cualquier momento SI / NO
- Sin dar ninguna razón SI / NO
- ¿Has comprendido los posibles riesgos asociados a tu participación en este proyecto? SI / NO

- ¿Aceptas participar? SI / NO
- ¿Recibirá algún tipo de compensación económica? SI / NO
- ¿Autoriza la participación en este proyecto de la persona de la que es responsable? SI / NO

Nombre y apellido del participante:

Nombre y apellido del tutor legal:

(Firma)

(Firma)

Investigador principal:

(Firma)

Murcia, a _____

En el caso de querer abandonar este proyecto, rellene a continuación y póngase en contacto con Laura Cenis Cifuentes (Tefl: xxxxxxxxxxxx, o por mail: laura.cenis.cifuentes@gmail.com)

Yo, _____, bajo mi decisión, abandono este proyecto.

(nombre del participante)

(Firma)

Anexo 2: Entrevista clínica.

La entrevista clínica constará de las siguientes preguntas:

1. ¿Tiene el paciente antecedentes familiares de primer grado de diabetes? (Si/No)
2. ¿En analíticas previas ha presentado HDL \leq 35 mg/dl, LDL $>$ 180mg/dL o triglicéridos \geq 250 mg/dl?
3. ¿Tiene antecedentes de diabetes gestacional o macrosomía fetal? (Si/No).
4. ¿Historia de enfermedad cardiovascular? (Si/No)
5. ¿Hipertensión arterial? (Si/No)
6. ¿Mujeres con síndrome de ovario poliquístico? (Si/No)
7. Otras condiciones clínicas asociadas con resistencia a la insulina (por ejemplo, obesidad grave, acantosis nigricans) (Si/No y cuál)
8. ¿Sedentarismo o escaso ejercicio físico (menos de 30 min diarios)? (Si/No)
9. Fármacos consumidos en los últimos 5 años.
10. Existencia de enfermedades de afectación intestinal diagnosticadas o en actual estudio por sintomatología intestinal. (Si/No. Criterio de exclusión en caso afirmativo).
11. Hábitos alimenticios:
 - a. ¿Con qué frecuencia comes fruta o verdura?
 - i. Menos de 1 a la semana.
 - ii. Entre 1-5 a la semana.
 - iii. Más de 5 a la semana.
 - b. ¿Con qué frecuencia comes carne?
 - i. Menos de 1 a la semana.
 - ii. Entre 1-5 a la semana.
 - iii. Más de 5 a la semana.
 - c. ¿Con qué frecuencia comes pescado?
 - i. Menos de 1 a la semana.
 - ii. Entre 1-5 a la semana.
 - iii. Más de 5 a la semana.
 - d. ¿Con qué frecuencia tomas alimentos con alto nivel de azúcar refinado (¿Bollería, galletas o cereales industriales, pastelería...)?
 - i. Menos de 1 a la semana.
 - ii. Entre 1-5 a la semana.
 - iii. Más de 5 a la semana.