



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

CAMPO DE CONOCIMIENTO: EPIDEMIOLOGÍA CLÍNICA

“Efecto de la Linagliptina + Metformina vs Metformina sola sobre la composición del microbioma intestinal y su relación con resistencia a la insulina y secreción de insulina en pacientes con prediabetes durante 12 meses”.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

Yoscelina Estrella Martínez López.

TUTORES:

Dr. Osbaldo Resendis Antonio.

Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN).

Dr. Rodolfo Guardado Mendoza.

Hospital Regional de Alta Especialidad del Bajío (HRAEB).

COMITÉ TUTOR:

Dra. María Elizabeth Tejero Barrera.

Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN).

Dr. Juan Carlos López Alvarenga.

University of Texas Rio Grande Valley (UTRGV).

Ciudad de México, México. Octubre 2022.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Índice general

Abreviaturas	9
Resumen	14
I. Introducción	16
II. Marco teórico	19
1 Diabetes Mellitus 2	19
1.1 Definición y Etiología	19
1.2 Epidemiología	19
1.3 Complicaciones	21
1.4 Fisiopatología	22
1.5 Disfunción de los Islotes Pancreáticos	24
1.6 Disminución del efecto incretina	25
1.6.1 Incretinas	25
1.6.1.1 Péptido Similar al Glucagón tipo 1 (GLP-1)	26
1.6.1.2 Polipéptido Insulinotrópico dependiente de glucosa (GIP)	27
1.6.1.3 Fisiología de las incretinas	27
1.6.2 Efecto Incretina	28
1.6.3 Incretinas en DM2 y sujetos con alto riesgo	29
1.6.4 Efecto de las incretinas en las acciones pancreáticas	31
1.6.4.1 Efectos de la señalización del receptor de GLP-1	31
1.6.4.2 Efectos de la señalización del receptor de GIP	32
2 Prediabetes	33
2.1 Definición	33
2.2 Epidemiología	34
2.3 Clasificación	34
2.4 Resistencia a la insulina en prediabetes	36
2.5 Secreción de insulina en prediabetes	38
2.6 Riesgo de DM2 y Enfermedad cardiovascular en prediabetes	40
3 Tratamiento de la prediabetes	41
3.1 Tabla de evidencia 1	46
4 Linagliptina	47
4.1 Tabla de evidencia 2	48

5	Microbiota Intestinal Humana	49
5.1	Microbiota intestinal y Metabolismo	50
5.2	Microbiota Intestinal y su relación con la obesidad	51
5.3	Microbiota Intestinal e Inflamación crónica	52
5.4	Microbiota Intestinal y su relación con prediabetes y diabetes	54
5.5	Intervención del microbioma en el metabolismo glucídico	58
5.5.1	Influjo de bacterias productoras de ácidos grasos de cadena corta	58
5.5.2	Incremento en la endotoxemia	62
5.5.3	Influencia de los ácidos biliares secundarios	64
5.5.4	Modificación de la secreción de incretinas relacionadas con la resistencia a la insulina y funcionalidad de la célula beta	65
5.6	Efecto de los fármacos antidiabéticos en el Microbioma Intestinal	65
5.6.1	Efecto de la Metformina sobre el MI	66
5.6.2	Efecto de los fármacos tipo incretinas sobre el MI	71
5.7	Tabla de evidencia 3	74
III.	Planteamiento del problema	81
IV.	Justificación	82
V.	Pregunta de investigación	83
VI.	Hipótesis	83
VII.	Objetivos	85
VIII.	Material y métodos	86
A.	Diseño del estudio	86
B.	Tamaño de la muestra	86
C.	Universo de trabajo	87
D.	Criterios de Selección	88
E.	Operacionalización de variables	89
F.	Duración total del estudio	94
G.	Descripción detallada del estudio	94
IX.	Procedimientos	100
1.	Somatometría	100
2.	Parámetros bioquímicos	100
3.	Cálculo de Resistencia a la Insulina	102
4.	Cálculo de función de las células β pancreáticas	103

5.	Muestras de Heces -----	106
X.	Análisis Estadístico -----	110
XI.	Implicaciones éticas -----	114
XII.	Recursos, financiamiento y factibilidad -----	115
XIII.	Implicaciones de Bioseguridad -----	117
XIV.	Resultados -----	123
XV.	Discusión -----	173
XVI.	Conclusiones -----	182
XVII.	Fortalezas y limitaciones -----	182
XVIII.	Bibliografía -----	185
XIX.	Anexos -----	218

Índice de tablas

Tabla 1. Características del eje enteroinsular en sujetos con DM e individuos con alto riesgo-----	30
Tabla 2. Composición del MI en sujetos con Prediabetes y DM2-----	57
Tabla 3. Tabla de evidencia-----	75
Tabla 4. Operacionalización de variables-----	89
Tabla 5. Características de la población de estudio por mes de seguimiento-----	126
Table 6. Contraste entre grupos con 6 y 12 meses de seguimiento-----	128
Tabla 7. ANOVA de dos vías para los grupos de tratamiento-----	130
Table 8. Contrastes entre grupos de tratamiento farmacológico-----	136
Tabla 9. Contraste entre grupos con tratamiento farmacológico a los 6 meses de seguimiento-----	137
Tabla 10. Contraste entre grupos con tratamiento farmacológico a los 12 meses de seguimiento-----	139
Tabla 11. Rendimiento de los algoritmos de Machine Learning-----	148
Tabla 12. Modelos lineales generalizados mixtos para los índices de RI y función de las células β pancreáticas y tamaño del efecto e intervalo de confianza para cada bacteria-----	152
Tabla 13. Modelos lineales generalizados mixtos para los genus bacterianos y tamaño del efecto e intervalo de confianza para cada bacteria-----	154
Tabla 14. Modelo jerárquico para el Índice Matsuda-----	157
Tabla 15. Modelo jerárquico para <i>Catabacter</i> -----	158
Tabla 16. Modelo jerárquico para Disp_Index2-----	159
Tabla 17. Modelo jerárquico para <i>Lachnospiraceae UCG-004</i> -----	160

Tabla 18. Modelos lineales generalizados mixtos para el género *Catabacter* y tamaño del efecto e intervalo de confianza para cada bacteria-----170

Tabla 19. Modelos lineales generalizados mixtos para el género *Lachnospiraceae* UCG-004 y tamaño del efecto e intervalo de confianza para cada bacteria-----170

Tabla 20. Matriz de componentes rotados. Los conglomerados se encuentran ordenados de acuerdo a los loadings de cada componente-----171

Tabla 21. Modelos lineales generalizados mixtos para los géneros bacterianos de los componentes principales-----172

Índice de figuras y diagramas

Índice de Figuras

Figura 1. Efecto Incretina-----	29
Figura 2. Concentración de glucosa sérica en función del tiempo durante la CTOG para los diferentes tipos de prediabetes-----	36
Figura 3. Concentración de insulina sérica en función del tiempo durante la CTOG para los diferentes tipos de prediabetes-----	38
Figura 4. Acción de la Metformina en la MI-----	69
Figura 5. Tamaño de la muestra en función de la potencia estadística para un análisis de ANOVA-----	87
Figura 6. Descripción detallada del estudio-----	99
Figura 7. Índice de Matsuda y HOMA-IR basal, seis y 12 meses en los grupos metformina (A) y linagliptina/metformina (B)-----	140
Figura 8. Función de las células β pancreáticas basales, seis y 12 meses en los grupos metformina y linagliptina/metformina. A) AIR, B) ORAL-DI, C) Disp_Index2 y D) AUCinsgluc_OGTT-----	141
Figura 9. Niveles de glucosa e insulina durante la OGTT en los meses basal, seis y 12 en los grupos metformina (A) y linagliptina/metformina (B)-----	142
Figura 10. Diagrama esquemático del procedimiento propuesto para el análisis clínico y metagenómico de los datos-----	143
Figura 11. Análisis de la diversidad α -----	145
Figura 12. Análisis de diversidad β -----	146

Figura 13. Gráfico SHAP para cada tratamiento farmacológico y mes de seguimiento-----149

Figura 14. Heatmap resultante del análisis de los modelos lineales generalizados mixtos-----151

Figura 15. Modelado de ecuaciones estructurales con coeficientes de trayectoria estandarizados para índice de Matsuda por fármacos antidiabéticos-----165

Figura 16. Modelado de ecuaciones estructurales con coeficientes de trayectoria estandarizados para índice de Matsuda y mes de seguimiento-----166

Figura 17. Modelado de ecuaciones estructurales con coeficientes de trayectoria estandarizados para Disp_Index2 por fármacos antidiabéticos-----169

Figura 18. Modelado de ecuaciones estructurales con coeficientes de trayectoria estandarizados para Disp_Index2 por fármacos antidiabéticos y mes de seguimiento-----170

Índice de diagramas

Diagrama 1. Diagrama de flujo del estudio-----124

Abreviaturas

ADA. American Diabetes Association*.

ADN. Ácido Desoxirribonucleico.

ADP. Adenosín Difosfato.

AGCC. Ácidos Grasos de Cadena Corta.

AGCR. Ácidos Grasos de Cadena Ramificada.

AGL. Ácidos Grasos Libres.

AIR. Respuesta Aguda de la Insulina.

AMPK. Activated Protein Kinase*.

ATP. Adenosine Triphosphate*/Adenosín Trifosfato.

COFEPRIS. Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios.

CTOG. Curva de Tolerancia Oral a la Glucosa.

DB. Ratón inducido a Diabetes Mellitus.

DM. Diabetes Mellitus.

DM2. Diabetes Mellitus 2.

DPP-4. Dipeptidil Peptidasa 4.

DPP-8. Dipeptidil Peptidasa 8.

DPP-9. Dipeptidil Peptidasa 9.

ELISA. Enzime Linked InmunoSorbent Assay. *

ENSANUT. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición.

EA. Eventos Adversos.

F/B. *Firmicutes/Bacteroidetes.*

FDA. Food and Drug Administration*.

GAA. Glucosa Alterada de Ayuno.

GIP. Polipéptido Insulinotrópico Dependiente de Glucosa.

GLP-1. Péptido Similar al Glucagón Tipo 1.

GLP-1r. receptor del Péptido Similar al Glucagón Tipo 1.

GLUT-2. Transportador de Glucosa tipo 2.

GLUT-4. Transportador de Glucosa tipo 4.

GOD. Glucosa Oxidasa.

GPA. Glucosa en Plasma en Ayuno.

GPR. G-Protein-Coupled receptor*.

HAS. Hipertensión Arterial Sistémica.

HC. Hiperglucemia Control.

HDL. Lipoproteína de Alta Densidad.

HFD. Dieta Alta en Grasa.

HFD-CT. Dieta Alta en Grasa / Control.

HFD-Met. Dieta Alta en Grasa / Metformina.

HL. Hiperglucemia + Liraglutida.

HRAEB. Hospital Regional de Alta Especialidad del Bajío.

HS. Hiperglucemia + Saxagliptina.

HV. Hiperglucemia + Vildagliptina (dosis alta).

IAPP. Islet Amyloid Polypeptide*.

ICC. Índice Cintura - Cadera.

IDOI. Índice de Disposición Oral a la Insulina.

IKKs. Complejo de Proteínas Cinasas de IKB.

IL-1. Interleucina 1.

IL-6. Interleucina 6.

IMC. Índice de Masa Corporal.

INMEGEN. Instituto Nacional de Medicina Genómica.

K-ATP. Canales de potasio sensibles a ATP.

NC. Normogluccemia Control.

NG. Normogluccemia.

NL. Normogluccemia + Liraglutida.

NS. Normogluccemia + Saxagliptina.

IPAQ. Cuestionario Internacional de Actividad Física. *

IRS-1. Substrato del Receptor de Insulina 1.

ISI. Índice de Sensibilidad a la Insulina.

ITG. Intolerancia a la Glucosa.

JNK. Cinasa del N-Terminal de C-jun.

LDL. Lipoproteína de Baja Densidad.

LEFSe. Linear Discriminant Analysis Effect Size. *

LM. Linagliptina +Metformina

LPS. Lipopolisacaridos.

LV. Low Vildagliptina (dosis baja).

M. Metformina.

MAMP. Patrones Moleculares Asociados a Microbios.

MAPK. Mitogen Activated Protein Kinases*/ Proteínas Quinasas Activadas por Mitógenos.

MCP-1. Proteína Quimiotactica de Monocitos.

METs. Unidad de Medida del Índice Metabólico.

MI. Microbiota Intestinal.

NCD. Dieta Normal.

NCD-CT. Dieta Normal / Control.

NCEP ATP III. National Education Program Adult Treatment Panel III.

NCD-Met. Dieta Normal / Metformina.

NF-KB. Factor Nuclear Potenciador de las Cadenas Ligeras Kappa de las Células Beta Activadas.

NGT. Tolerancia Normal a la Glucosa.

NL. Peso dentro del rango normal.

OB. Obesidad.

OMS. Organización Mundial de la Salud.

ONS. Óxido Nítrico Sintasa.

ONSi. Óxido Nítrico Sintasa inducible.

OTU. Unidades Taxonómicas Operacionales.

PCR. Proteína C Reactiva.

PDX-1. Factor Pancreático Duodenal homeobox -1.

PKA. Protein Kinasa A.*

POD. Peroxidasa.

Pre-DM. Prediabetes.

PRR. Receptores de Reconocimiento de Patrones.

PTGIV. Prueba de Tolerancia Oral a la Glucosa Intravenosa.

QUIIME. Quantitative Insights Into Microbial Ecology. *

RI. Resistencia a la Insulina.

rRNA. Ácido Ribonucleico ribosómico.

SD. Sprague Dawley. *

SNUT. Sistema de evaluación de hábitos nutricionales y consumo de nutrimentos.

SSA. Secretaria de Salud.

ST. Sitagliptina.

STZ. Estreptozotocina.

Tg. Triglicéridos.

TGF- β 1. Factor de Crecimiento Tumoral β 1.

TGI. Tracto Gastrointestinal.

TLR. Receptores Toll-like.

TLR-2. Toll-like receptor 2.

TLR-4. Toll-like receptor 4.

TNF- α . Factor de Necrosis Tumoral α .

VET. Valor Energético Total.

VLDL. Lipoproteínas de muy baja densidad.

VO. Vía Oral.

4-AAP-4. 4 – aminoantipirina.

*Por sus siglas en inglés.

Resumen

Antecedentes: La prediabetes es un problema de salud de alta prevalencia, con alto riesgo de complicaciones y progresión a diabetes mellitus tipo 2 (DM2). El cambio en estilo de vida y el consumo de fármacos antidiabéticos reducen la incidencia de DM2. La eficacia de estas intervenciones puede mejorarse a través de la microbiota intestinal (MI), que desempeña un rol esencial en la mediación de los efectos hipoglucemiantes de estos fármacos al regular la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC).

Objetivo: Determinar el efecto de la linagliptina + Metformina en comparación con Metformina sola sobre la composición de la MI y su relación con la resistencia a la insulina y secreción de insulina en pacientes con prediabetes sin tratamiento y comparado con metformina y linagliptina + metformina durante 12 meses.

Material y Métodos: Ensayo clínico aleatorizado, doble ciego, paralelo, unicéntrico, con 12 meses de seguimiento en pacientes con prediabetes que fueron aleatorizados a linagliptina 5 mg + metformina 1700 mg diarios + estilo de vida (grupo LM) o metformina 1700 mg diarios + estilo de vida (grupo M) y grupo sin tratamiento (basal). Resultados primarios fueron los cambios en la composición de la MI; los niveles de glucosa, resistencia a la insulina y la función de las células β pancreáticas fueron resultados secundarios.

Resultados: Los sujetos fueron evaluados para elegibilidad por CTOG y 167 pacientes con prediabetes fueron asignados aleatoriamente a los grupos; Sin tratamiento (basal) [total (n=51): LM (n=25) y M (n=26)], 6 meses de seguimiento [total (n=55): LM (n=20) y M (n=35)] y 12 meses de seguimiento [total (n=61): LM (n=33) y M (n=28)]. La composición de la MI fue diferente en los grupos en los diferentes meses de seguimiento. Ambos grupos incrementaron la abundancia de bacterias productoras de AGCC, y las bacterias que ayudaron a clasificar a los tratamientos fueron: M *Fisucatenibacter*, *Blautia* y *Roseburia*, LM *Coprococcus 1*, *Roseburia* y [*Eubacterium*] *hallii* group. Ambas intervenciones redujeron *Escherichia-Shigella*. Los niveles de glucosa durante la CTOG mejoraron más en el grupo LM. El índice de sensibilidad a la insulina mejoró significativamente en el grupo de M con 12 meses de seguimiento, aumentando de la condición sin

tratamiento (basal) 2.45 ± 2.03 a 5.22 ± 3.57 . La LM incremento la función de las células beta pancreáticas significativamente durante los primeros meses en el grupo LM, aumentando de la condición sin tratamiento (basal) 1.09 ± 0.43 a 2.03 ± 0.79 a los 6 meses de seguimiento. No se observaron efectos secundarios importantes durante el estudio. *Catabacter* y *Lachnospiraceae* UCG-004 están asociadas al incremento en la sensibilidad y secreción de insulina; SEM#1 *Catabacter* → Matsuda Index ($b = -0.18$, $p = 0.045$) en tratamiento con LM y *Lachnospiraceae* UCG-004 → Disp_Index2 ($b = -0.44$, $p = 0.0001$) con M y ($b = -0.37$, $p = 0.0001$) con LM.

Conclusión: La M y LM alteran la composición de la MI en pacientes con prediabetes, lo que se manifiesta como cambios en la abundancia de ciertas bacterias a nivel de género. Tanto la M como la LM pueden mejorar la homeostasis de la glucosa y la función de las células β pancreáticas al afectar la condición clínico-metabólica y la MI, manteniendo la función de barrera intestinal e incrementando la producción de AGCC. Los resultados de este ensayo clínico permitieron identificar que la pérdida de peso y grasa corporal y el cambio en la condición metabólica generada por los fármacos mejoran la homeostasis de la glucosa y función de las células β pancreáticas.

Palabras clave: Prediabetes, Microbioma intestinal, Resistencia a la insulina y Secreción de Insulina.

I. Introducción

Actualmente, se ha producido un aumento progresivo de la prevalencia global de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y sus complicaciones. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), 422 millones de personas en todo el mundo tienen diabetes¹. Los mecanismos y factores que desencadenan la patología han sido objeto de una intensa discusión. Los factores genéticos, la ingesta elevada de calorías y grasa, aunado a la inactividad física están establecidos como factores de riesgo importantes². Sin embargo, existe un consenso creciente que niega la atribución del incremento de la prevalencia de la enfermedad únicamente a estos componentes clásicos de riesgo. Otros factores que están siendo estudiados y se han encontrado que tienen relevancia son la microbiota intestinal (MI), y los marcadores inflamatorios³.

La evidencia reciente sobre la interconexión entre el metabolismo del huésped y la MI ha generado un cambio de paradigma en el estudio de DM2 y sus etapas tempranas, tanto en la fisiología subyacente como en su tratamiento potencial. Así, el microbioma intestinal hipotéticamente se percibe como un biorreactor alimentado por macronutrientes de la dieta que conducen a la producción de compuestos bioactivos con funciones potenciales en el metabolismo del huésped, conocidos como metabolitos. Estos metabolitos derivados de la MI envían señales a órganos distales del cuerpo a través de la estimulación directa del nervio vago desde el sistema nervioso entérico, permitiendo que las bacterias en el intestino se conecten mediante los patrones moleculares asociados a microbios (MAMP) u otros componentes estructurales microbianos, los cuales son reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) vinculándose al sistema inmunitario y endocrino, al cerebro (formando el eje intestino-cerebro) y al metabolismo del huésped⁴. Cuando falla la comunicación neurohumoral bidireccional entre las bacterias y sus metabolitos con el huésped, las funciones inmunes y metabólicas del hospedero se interrumpen, causando desregulación inmunometabólica⁵.

Cohortes chinas, europeas, americanas y mexicanas han demostrado las diferencias en la composición de la MI de adultos con DM2 y sujetos control^{6,7} sugiriendo que la composición de la MI puede influir en la extracción de energía de los alimentos ingeridos, inmunidad de las mucosas, permeabilidad intestinal, inflamación sistémica, que posteriormente generan resistencia a la insulina (RI), progresión a DM2 y la presencia de complicaciones^{8,9,10}.

Por otra parte, los estudios que analizan la función potencial del microbioma intestinal han identificado una serie de vías inmunometabólicas que están vinculadas a las diferentes etapas de la RI. Estas se dividen en cuatro vías: 1) el metabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada (BCAA), 2) endotoxemia metabólica asociada a el incremento de riesgo cardiovascular debido al exceso de lipopolisacáridos (LPS) derivadas de las bacterias gram-negativas, 3) disminución de los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), y 4) reducción de ácidos biliares secundarios conjugados^{6,11,12,13}. Además, la disbiosis asociada a la prediabetes incrementa la permeabilidad intestinal, y a su vez la translocación de bacterias enteras, metabolitos bacterianos y componentes de la pared bacteriana en la circulación y los tejidos distantes, contribuyendo al daño de órganos de forma remota, producido por la interferencia entre el microbioma intestinal y los órganos periféricos como el hígado, tejido adiposo, sistema muscular y el páncreas. Así, la disbiosis de la MI, evidenciada por reducción de bacterias productoras de AGCC y *Verrucomicrobia*, incremento en *Firmicutes* y patógenos oportunistas parece ser capaz de influir en el metabolismo del huésped mediante la utilización de nutrientes y la producción de metabolitos^{6,7}, promoviendo la susceptibilidad a trastornos metabólicos^{9,14,15}.

En consecuencia, a la condición patológica, los fármacos antidiabéticos empleados pueden modular la composición y las actividades de la MI en sujetos con DM2¹⁶. Específicamente, el tratamiento con fármacos tipo incretinas aumenta la biosíntesis y la secreción de la insulina por las células β pancreáticas. Sumado a su efecto potencializador de incretinas, se ha establecido la existencia de interacción bidireccional fármaco antidiabético – MI, la cual se ha asociado con los resultados

clínicos, basado en su capacidad para manipular la composición y función metabólica del MI. Los metabolitos de la MI pueden ejercer influencia en los efectos del fármaco y el metabolismo del huésped, por lo tanto, el microbioma intestinal contribuye a la eficacia y variabilidad de los fármacos en la práctica clínica, de tal manera que el discernimiento de esta interfaz fármaco antidiabético – MI puede facilitar nuevos enfoques de medicina de precisión en patologías como DM2 y sus etapas tempranas como prediabetes.

II. Marco teórico

1 Diabetes Mellitus tipo 2

1.1. Definición y Etiología

La DM2 se considera un síndrome con un metabolismo intermedio alterado, causado por la inadecuada secreción de insulina, resistencia al efecto de la misma o bien la combinación de ambas, como consecuencia ocasionan hiperglucemia tanto en ayuno como postprandial¹⁷.

Los factores de riesgo para DM2 son:

- Sobrepeso y obesidad.
- Familiares de primer grado con DM2.
- ≥ 45 años de edad.
- Mujeres con antecedentes de productos macrosómicos (>4 kg) y/o con antecedentes de diabetes gestacional, mujeres con antecedentes de ovarios poliquísticos.
- Hipertensión arterial $\geq 140/90$ mmHg.
- Dislipidemias (colesterol HDL ≤ 40 mg/dl, triglicéridos ≥ 250 mg/dl).
- Enfermedad cardiovascular (cardiopatía isquémica, insuficiencia vascular cerebral o insuficiencia arterial de miembros inferiores).
- Inadecuada alimentación.
- Sedentarismo.

1.2. Epidemiología

La DM2 es una enfermedad multifactorial, compleja y progresiva actualmente con incremento alarmante en la prevalencia en todo el mundo. En el 2015 la Federación Internacional de Diabetes (FID) estimó que existían aproximadamente

415 millones de adultos de 20 a 79 años con DM2, en esta cifra se incluyeron 193 millones de sujetos infradiagnosticados¹⁸. Además, se estima de manera turbadora, que, para finales de 2040, 642 millones de personas vivirán con la enfermedad¹⁸.

Considerando la velocidad en la progresión de la enfermedad, en 1998, se estimó que alrededor de 11.7 millones de mexicanos tendrían DM2 para el año 2025, lo que representaba un incremento del 207.8%, situación que colocaría a México en el 7º lugar con más casos a nivel mundial, cifra que actualmente se superó antes de la fecha estimada¹⁹. A detalle, en México se puede estudiar el incremento de acuerdo a los datos presentados por la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) realizada en el año 2000, en donde se encontró una prevalencia de DM2 del 8.2%, reportando que dicho incremento es en parte debido al mayor número de pacientes con DM2 menores de 40 años y la alta prevalencia de factores de riesgo que contribuyen al desarrollo de complicaciones crónicas, de esta manera se explica que sea la principal causa de muerte²⁰. Sin embargo, la ENSANUT 2006 reportó una prevalencia global de DM2 de 14.42%, con mayor representación en el centro y centro-oeste del país²¹, de la misma forma, en dicha encuesta se encontró un incremento importante en el número de personas <40 años de edad con DM2²². En la encuesta realizada en el 2012 el grupo que comprende edades de 60 a 69 años tuvo la mayor prevalencia de 26.3%, con un incremento de 6.6% en referencia a ENSANUT 2006, seguido del grupo de 50 a 59 años con 19.4%¹⁷. La ENSANUT 2016 indicó una prevalencia global de 9.4%, los adultos de 60 a 69 años son la población con mayor número de sujetos con DM2 hombres con 27.7% y mujeres 32.7%. Con un incremento de 26.3% a 30.3% respecto a la ENSANUT 2012²³. La última cifra reportada en la ENSANUT 2018 indica que 8.6 millones de sujetos padecen DM2 y prevalencia de 10.3%²⁴. La prevalencia en 2020 fue similar a la encontrada en 2018. En los últimos ocho años hubo un aumento en la prevalencia de DM2 por diagnóstico médico de 9.2% a 10.6% de 2012 a 2020. Al desagregar por sexo, el aumento a lo largo del tiempo fue mayor en mujeres, quienes presentaron un aumento de 9.7 a 11.6%, mientras que, en los hombres, el aumento fue de 8.6 a 9.4%²⁵.

Actualmente en países en vías de desarrollo como México la DM2 constituye uno de los problemas más importantes de salud pública alcanzando características de epidemia. El impacto de esta patología es muy importante ya que anualmente se registran más de 180 mil casos nuevos y causa alrededor de 36 mil defunciones. Se estima que el costo anual de la diabetes para los mexicanos es de 430 millones de dólares por año, 15 millones para su control metabólico, 85 millones para servicios de salud adicionales y 330 millones para costos indirectos. Estas cifras representan un costo aproximado de 45 dólares por persona al año y este gasto corresponde a tres cuartas partes de todo el presupuesto otorgado para la Salud²⁶.

1.3. Complicaciones

Las complicaciones de la DM2 pueden ser de 2 tipos: 1) Microvasculares: retinopatía, neuropatía y nefropatía, o 2) Macrovasculares: cardiopatía, enfermedad vascular cerebral y enfermedad vascular periférica.

La DM2 es la principal causa de enfermedad renal terminal en el mundo, la principal causa de amputaciones no traumáticas y la principal causa de ceguera. Por otro lado, la enfermedad cardiovascular representa la primera causa de muerte en más del 75 % de los pacientes con diabetes, ya que presentan un riesgo incrementado de enfermedad arteria coronaria, con mayor incidencia de eventos isquémicos y muerte después de un infarto agudo de miocardio con ausencia de cardiopatía isquémica, el riesgo de presentarla es igual que aquellos sujetos sin diabetes con antecedente de cardiopatía isquémica. Lo cual implica que las medidas de prevención para los pacientes con diabetes asintomáticos deberían de ser similares a las medidas de prevención secundaria de los pacientes sin diabetes con cardiopatía isquémica²⁷.

1.4. Fisiopatología

Existe una compleja interrelación entre los diferentes componentes que intervienen en el proceso de producción, consumo y almacenamiento de energía. La producción endógena de glucosa está dada en un 85 % por el hígado, y el consumo basal de la misma es de aproximadamente 2 mg/kg/min, siendo el cerebro el principal consumidor durante el ayuno, con una captación del 50 % de la producción hepática de glucosa y el músculo durante el periodo postprandial tiene una captación de hasta el 80 % de la glucosa ingerida. Posterior a la ingesta de alimentos, hay un aumento rápido en la secreción de insulina, estimulada en parte por la secreción de incretinas a nivel intestinal, para a continuación, disminuir un poco y tener una nueva elevación después de los 30 minutos. Este incremento de insulina ocurre junto con una supresión en la secreción de glucagón, que en conjunto tienen como objetivo disminuir la producción hepática de glucosa, y aumentar la captación periférica de esta, principalmente a nivel muscular²⁶.

La forma en que el incremento en los niveles de glucosa produce secreción de insulina hace referencia a un mecanismo compuesto por varios pasos: Inicialmente la glucosa es captada por la célula β pancreática mediante los transportadores de glucosa 2 (GLUT2), posteriormente la glucosa ingresa a la vía glucolítica y al ciclo de Krebs dando como resultado final la producción de Adenosín Trifosfato (ATP) la cual va a aumentar la relación intracelular de Adenosín Trifosfato/Adenosín Difosfato (ATP/ADP) y esto va a cerrar los canales de potasio ocasionando despolarización de la membrana y posteriormente la apertura de los canales de calcio con el consecuente ingreso al espacio intracelular de este catión, siendo el principal estimulador de la secreción de insulina, mediante la migración y fusión de vesículas contenedoras de gránulos de insulina con la membrana de la célula β ²⁸.

El conocimiento de la patogénesis de la DM2 hasta ahora establecido, indica una fuerte influencia ambiental, sin una importante contribución del factor genético²⁹. Los dos factores más importantes que contribuyen a la fisiopatología de

la DM2, y por los que se conoce a la misma como una enfermedad dual o bipolar, son la RI y la disfunción de la célula β ²⁸. La secuencia de eventos fisiopatológicos parece indicar que lo primero en aparecer es la RI, condicionada por varios factores como son la falta de actividad física, la dieta occidentalizada alta en hidratos de carbono (HCO) simples y ácidos grasos saturados, el grupo étnico y tal vez una influencia genética hasta ahora no bien determinada³⁰.

Varios mecanismos fisiopatológicos han sido descritos en la RI a diferentes niveles. A nivel hepático se ha observado que hay una disminución en el número y actividad de receptores de insulina, disminución en la captación de glucosa debido a una reducción en el número y actividad de los glucotransportadores y por afección de algunas enzimas de la vía glucolítica que secundariamente impiden el ingreso de la glucosa, así como un efecto de los ácidos grasos libres a este nivel interfiriendo con la señalización de insulina. Por otra parte, a nivel muscular esta RI es también muy importante, porque como se comentó previamente este es el sitio donde se lleva a cabo la mayor captación de glucosa dependiente de insulina, aproximadamente del 80 %. Asimismo, se ha observado una disminución en los glucotransportadores (en este caso los GLUT4), acumulación de triglicéridos y ácidos grasos libres en exceso que compiten con la glucosa como sustrato de energía y aumentan los niveles de Malonil CoA, que tienen la capacidad de inhibir la carnitin palmitoil transferasa tipo 1, enzima importante para la beta oxidación de los ácidos grasos³⁰.

Conjuntamente, tanto a nivel hepático, muscular y principalmente a nivel adiposo, se ha encontrado una interrelación interesante entre diferentes citocinas, como el TNF- α que condiciona RI al causar fosforilación de la parte intracelular del receptor de insulina y del sustrato del receptor de insulina 1 (IRS-1) y su contraparte, la adiponectina que es la única citocina protectora contra la RI. Debido a esta RI, a nivel periférico disminuye la captación (muscular) de glucosa y a nivel hepático no es capaz de suprimir la producción de glucosa, por lo tanto, como un mecanismo compensatorio la célula β incrementa la secreción de insulina y gracias

a esta hiperinsulinemia se logra alcanzar el equilibrio y mantener la euglucemia, por lo que la hiperinsulinemia es un marcador indirecto de RI³¹. Sin embargo, con el paso del tiempo y la persistencia de RI y el aumento de algunos factores tóxicos para la célula β (glucosa y lípidos), esta comienza a agotarse y a disminuir la secreción de insulina, por lo que se pierde esa capacidad de mantener suprimida la producción hepática de glucosa y aparece la hiperglucemia de ayuno, hasta alcanzar niveles diagnósticos de DM2 donde se presenta un 50-80 % de reducción en la capacidad funcional y en el volumen de las células β ^{28,32}.

1.5. Disfunción de los Islotes Pancreáticos

La presencia de RI condiciona a que aparezca la disfunción de las células β y en los islotes pancreáticos, que son considerados unidad funcional. Los factores asociados a esta disfunción, son de orden genético aun cuando su contribución no está bien establecida, alteraciones en el ciclo celular en la regeneración y apoptosis, que se caracteriza en la disminución de la primera e incremento de la segunda, efecto tóxico de la glucosa conocido como glucotoxicidad, exposición prolongada a los ácidos grasos libres³³, deficiencia o bien resistencia al efecto de las incretinas³⁴, el estrés oxidativo e incremento de producción de superóxido a nivel de las células β ^{35,36} y anomalías en la secreción de amilina (IAPP, por sus siglas en inglés), condicionando formación y depósito de amiloide a nivel de los islotes pancreáticos así como un remodelamiento disfuncional de los mismos^{37,38,39,40}.

Con base a lo descrito anteriormente, las principales alteraciones fisiopatológicas que se encuentran presentes en los pacientes con DM2 son:

- Resistencia a la insulina a nivel muscular^{40,41,42}.
- Resistencia a la insulina a nivel hepático⁴⁰.
- Disfunción de la célula β pancreática con la consecuente reducción en la secreción de insulina^{32,37,40,41,43-45}.

- Disfunción de la célula α pancreática, expresada como la no supresión de la secreción de glucagón ante la hiperglucemia^{37,46-49}.
- Disminución del efecto incretina⁵⁰⁻⁵².
- Anormalidades en la secreción de amilina y depósitos de amiloide⁵³⁻⁵⁸.

Es trascendental señalar que existen entonces dos fenómenos fisiopatológicos principales conocidos en la progresión de la enfermedad:

1. Resistencia a la insulina.
2. Disfunción del islote pancreático.

Se destaca que el control de la secreción de insulina y de glucagón por las células del islote pancreático es dependiente de la glucosa circulante, además de otros estímulos como: aminoácidos, estímulos nerviosos y el efecto de algunas hormonas producidas por el tracto gastrointestinal; haciendo relevante el “efecto incretina”⁵⁹ reconocido dentro de los factores etiopatogénicos de importancia y considerado como primario en la DM2.

1.6. Disminución del efecto incretina.

1.6.1. Incretinas

Las incretinas son péptidos intestinales, ejercen como hormonas producidas en el tracto gastrointestinal por células enteroendocrinas en respuesta a la ingesta de alimentos, tienen efecto en las células de los islotes de Langerhans, aumentan la secreción y liberación de insulina en un 70% en el estado postprandial y disminuyen la secreción de glucógeno dependiente de la glucosa circulante. Las principales incretinas son: Péptido Similar al Glucagón tipo 1 (GLP-1) y Péptido Insulinotrópico Dependiente de Glucosa (GIP)⁵⁹.

1.6.1.1. Péptido Similar al Glucagón tipo 1 (GLP-1).

El GLP-1 es escindido del pro glucagón de las células de la mucosa intestinal L y secretado como un péptido amidado de 30 aminoácidos⁶⁰, las células L están distribuidas en el intestino distal y colon, liberado en respuesta a la ingesta de lípidos e HCO. También se produce en el Sistema Nervioso Central (SNC), las neuronas encargadas de generarlo se encuentran en el núcleo del tracto solitario y se extienden a regiones del hipotálamo, que tienen relevancia en la regulación de la ingesta de alimentos⁵⁹.

Dentro de las funciones que realiza se encuentran, la liberación de insulina en respuesta a la concentración de glucosa, de esta manera reduce la secreción de glucagón, retrasa el vaciamiento gástrico y suprime la producción hepática de glucosa⁶¹⁻⁶³. Es relevante destacar el conocimiento aportado de algunos estudios, en los cuales se sugiere que esta incretina en el SNC induce saciedad como lo establece Gutzwiller et al., instaurando que la infusión de GLP-1 muestra tener efecto dosis dependiente en la reducción de la ingesta de alimentos en humanos, puede incrementar el gasto energético en relación a la elevación de la temperatura corporal. El GLP-1 periférico se asocia a la homeostasis de glucosa y energía⁶³. La concentración plasmática en ayuno de GLP-1 es muy baja, alrededor de 10 – 20 pmol/L, su vida media es muy corta de 1 a 2 minutos, debido a que es rápidamente degradada por la enzima dipeptidil peptidasa 4 (DPP-4), la cual se encuentra soluble en plasma y unida a la superficie endotelial⁶⁴.

En cambio, el GLP-2 es otra incretina estudiada exhaustivamente, producida por las células L del intestino al igual que el tipo 1, y su acción es ejercida sobre la absorción de los nutrientes e inhibe la secreción de jugo gástrico y la motilidad. Al mismo tiempo se asocian sus efectos sobre la apoptosis de las células de la mucosa intestinal, disminuyendo y estimulando la proliferación de los enterocitos⁶⁵.

1.6.1.2. Polipéptido Insulinotrópico dependiente de Glucosa (GIP).

El GIP es un péptido de 42 aminoácidos producidos por las células enteroendocrinas específicas, las células K del duodeno y yeyuno, su secreción es estimulada por glucosa y lípidos enterales, en forma dosis dependiente, produciendo un incremento de 10 a 20 veces en su concentración plasmática⁶¹. Los productos de la digestión regulan su liberación y esta incretina actúa como un mecanismo de retroalimentación para señalar al páncreas endocrino del flujo inminente de sustratos desde el intestino⁶⁶. Se encuentra expresado en las células β de los islotes, en el tracto gastrointestinal superior, adipocitos, corteza adrenal, huesos, hipófisis y regiones cerebrales⁶¹.

Se conoce un receptor para GIP (GIPr) y su función es mediar todos los efectos fisiológicos del péptido. La unión del GIP a su receptor en las células β es insulinotrópico, pero solo cuando las concentraciones de glucosa en sangre están elevadas, generalmente por encima de 5 o 6 mM⁶⁷. La concentración del GIP en plasma es de 100 pmol/L, vida media circulante de 7 a 8 minutos, degradada por la dipeptidil péptidasa 4 (DPP-4). Tanto en GLP-1 y GIP, la DPP-4 corta a las hormonas a nivel del aminoácido alanina, situado en la posición 2 del extremo amino terminal, convirtiéndolas en fragmentos inactivos⁶⁴.

1.6.1.3. Fisiología de las incretinas.

El GLP-1 es producido en su mayoría por el intestino delgado y colon proximal y el GIP en el intestino delgado proximal, el efecto principal de ambas hormonas se asocia al incremento en la secreción de insulina en forma dependiente a la concentración de glucosa, activando a los receptores específicos (7-transmembrana, acoplados a proteína G) en las células α y β ⁶². Cabe señalar que los receptores ya mencionados con antelación están distribuidos en diversos tejidos del organismo, como: SNC, estómago, nervio vago, pulmón, corazón, adipocitos, riñones, etc.; presentando efectos diversos⁶⁸.

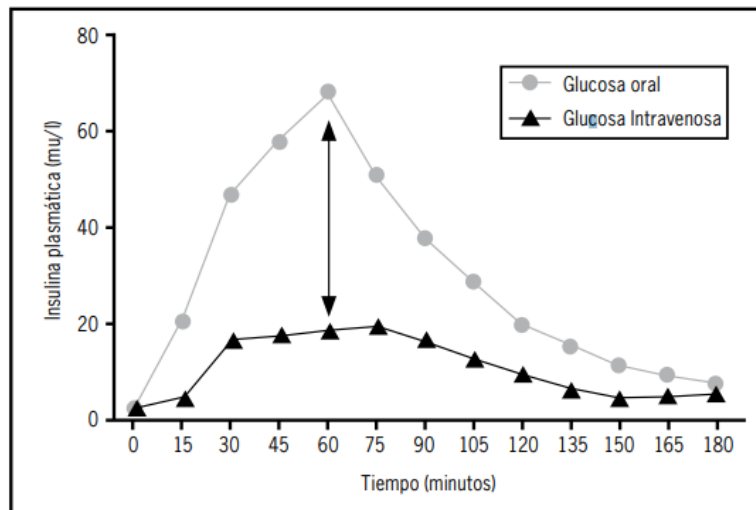
Analizando el comportamiento de las incretinas en el sujeto con DM2 de reciente diagnóstico y con adecuado control glucémico, se destaca la secreción de incretinas en respuesta a la ingesta de alimentos en comparación con sujetos sanos, se encuentra preservada o bien ligeramente aumentada. Sin embargo, el efecto sobre las células del islote se encuentra disminuido, posiblemente debido a una acción incrementada de la enzima DPP-4, encargada de neutralizar a las hormonas incretinas. En cambio, en el paciente con el diagnóstico de DM2 de larga evolución o bien con inadecuado control glucémico, presenta respuesta de GLP-1 disminuida y de GIP sin cambios⁶⁹.

Debido a que la DPP-4 inactiva inmediatamente después de ser liberada a la circulación, a las incretinas, su efecto es muy breve. La DPP-4 pertenece al grupo de las proteasas séricas, enzima ampliamente distribuida en el organismo particularmente en hígado, riñón e intestino. La inactivación de las hormonas gastrointestinales GLP-1 y GIP se ejerce al unirse a los dipéptidos N-terminales (His-Ala) del GLP-1, 7-36, para dar origen a sus metabolitos inactivos GLP-1, 9-36. En cuanto al GIP, 1-42, su inhibición por esta proteasa produce el metabolito inactivo GIP, 3-42, ambos se eliminan por vía renal. Por lo anterior los inhibidores de la DPP-4 son, actualmente, parte del arsenal terapéutico para alcanzar niveles endógenos activos mayores de GLP-1, con el objetivo de prolongar la vida media de ambas hormonas gastrointestinales y a su vez generar mayor eficiencia en su acción⁵⁹.

1.6.2. Efecto incretina.

El efecto incretina hace referencia a que la administración oral de una cantidad de glucosa causa un estímulo mayor de la secreción de insulina que la misma cantidad de glucosa administrada por vía intravenosa (Figura 1)⁷⁰. Existen dos incretinas responsables de este efecto, las cuales han sido mencionadas a lo largo de este subtema: GLP-1 y GIP, son hormonas enteroendocrinas liberadas a la circulación en respuesta al consumo de nutrientes, producen su efecto

principalmente en los islotes de Langerhans sobre las células α y β , potencializando 70% la secreción de insulina y a su vez suprimiendo la producción de glucosa hepática en sujetos sanos^{63,69,71,72}. De acuerdo a la evidencia los sujetos con prediabetes y DM2 tienen disminuido este efecto, de tal manera, se reduce la respuesta pancreática, la secreción de insulina y la homeostasis de la glucosa, produciendo hiperglucemia⁵⁹.



Fuente: Tomado de Burgos A, et al. 2012⁷².

Figura 1. Efecto Incretina.

1.6.3. Incretinas en DM2 y sujetos con alto riesgo.

El efecto incretina está alterado en pacientes con DM2. Este evento se ha demostrado con concentraciones elevadas de GIP posterior al consumo de alimentos y comparando con sujetos sin DM2. Sin embargo, a pesar de ser un fenómeno fisiopatológico propio de la enfermedad, existe poca evidencia, debido a la discrepancia reportada en los resultados de algunos estudios discordantes, como es el caso de aquellos donde se analiza el GLP-1 y se observan concentraciones elevadas, disminuidas o similares^{65,69,73} considerando sujetos con o sin DM2.

El GIP actúa como secretagogo de insulina en sujetos sanos, en cambio aquellos con diagnóstico de DM2 es relativamente inactivo. La información generada a partir de ensayos clínicos en esta población demuestra que la administración intravenosa de GLP-1 disminuye los valores de glucosa a un rango de normalidad en un tiempo de 3 a 4 horas⁷⁴. Sumando a los hallazgos anteriormente descritos, se conoce que la infusión continua de GLP-1 normaliza los valores de glucosa en ayuno, y alcanza concentraciones de glucosa postprandiales muy cercanas a los valores normales y la restitución de la primera fase de secreción de insulina en sujetos con diagnóstico de DM2⁷⁵. Los efectos logrados por la administración en infusión continua de GLP-1 se mantienen por 6 semanas⁷⁶. En la tabla 1 se resumen las características de secreción y el efecto de las incretinas en pacientes con DM2 y se comparan con sujetos con alteraciones de la tolerancia a la glucosa.

Características	Pacientes con DM2	Sujetos con alteraciones de tolerancia a la glucosa
<i>Efecto incretina</i>	Reducido o ausente	Casi normal
Secreción de:		
<i>GLP-1</i>	5% disminuido	Ligeramente disminuido
<i>GIP</i>	Normal	Normal
Efecto insulínico:		
<i>GLP-1</i>	Casi normal	Normal
<i>GIP</i>	Muy reducido o ausente	No establecido

Fuente: Tomado de Romero A, et al. 2007⁶⁴.

Tabla 1. Características del eje enteroinsular en sujetos con DM e individuos con alto riesgo.

1.6.4. Efectos de las incretinas en las acciones pancreáticas.

Las incretinas tienen efecto en la secreción, síntesis de insulina y células β del páncreas, estas hormonas estimulan la secreción de insulina. Las uniones de las incretinas con sus receptores provocan la activación de la adenil ciclasa a través de la proteína G, incrementando el AMP cíclico intracelular, lo cual activa a la proteína kinasa-A (PKA) y al factor tipo II del intercambio del nucleótido de guanina regulado por AMPc. Ambas proteínas producen eventos intracelulares incluyendo el cierre de los canales de potasio sensibles a ATP (k-ATP), la despolarización de la célula β , la elevación del calcio intracelular, la inhibición de los canales de potasio dependientes de voltaje y la exocitosis de los gránulos de insulina⁶⁴.

El efecto del GLP-1 en la liberación de insulina es rigurosamente dependiente de glucosa, cesando su efecto secretor en concentración plasmáticas de glucosa cerca a los 80 mg/dl. Cabe señalar que en estudios in vitro realizados en células β , el GLP-1 y GIP demostraron incrementar la masa celular mediante la estimulación de la proliferación celular e inhibición de la apoptosis. Además, mejora la capacidad sensora y de respuesta a la glucosa liberando insulina y restaurando la sensibilidad a la glucosa en células β previamente resistentes, probablemente a través del incremento de la expresión de los transportadores de glucosa y hexocinasas, componentes elementales en el mecanismo sensor de la glucosa de la célula β ^{64,77}.

1.6.4.1. Efectos de la señalización del receptor de GLP-1.

Es posible la remodelación en el tamaño y la función de las células β a lo largo de la vida, esto es fundamental en el mantenimiento de la tolerancia normal a la glucosa⁷⁸. La masa de las células de los islotes se mantiene principalmente a través de cambios en número y tamaño de las células β , interacción de procesos de división y crecimiento de células β establecidas y en las tasas de apoptosis y pérdida de las mismas⁷⁹.

Desde hace dos décadas la evidencia indica que la activación del receptor de GLP-1 fortalece la replicación de las células β y disminuye su apoptosis, originando un incremento en la masa de células β . Por lo tanto, los estudios indican que el GLP-1 incrementa la neogénesis de estas células a partir de células precursoras en el páncreas, este mecanismo adaptativo es poco claro hasta la fecha⁵⁹.

La activación del receptor del péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1r) en la célula β inicia la señalización generando AMPc y la activación de fosfatidilinositol cinasa-3 (PI-3K). Posterior a la respuesta de la proteína fijadora de elementos a AMPc continúa la señalización de otros intermediarios regulando otros efectos crónicos, entre ellos sustrato 2 del receptor de insulina y la transcripción de PDX-1 (Factor Pancreático Duodenal Homeobox-1)⁸⁰.

1.6.4.2. Efectos de la señalización del receptor de GIP.

El GIP mejora la secreción de insulina estimulada por glucosa cuando se une a un receptor específico acoplado a proteína G asociado con el GLP-1r⁸¹. Por la naturaleza de las hormonas incretinas el mecanismo molecular de activación de ambos es similar en las células β , incluye también la producción de AMPc y la activación de proteincinasa, incremento del calcio intracelular, cierre de los canales de K y exocitosis de insulina⁸². Ergo el GIP al igual que GLP-1 tiene un efecto proliferativo y antiapoptótico sobre las células β . Los efectos citoprotectores del GIP son parcialmente mediados por una supresión de la caspasa-3, reconocido como mediador de apoptosis⁸³.

2. Prediabetes

2.1. Definición

Se define como un estado de riesgo de padecer DM2, en donde el nivel de glucosa en sangre es mayor de lo normal, pero no lo suficientemente alto para clasificarla como DM2⁸⁴⁻⁸⁸. Según la American Diabetes Association (ADA), las personas con prediabetes tienen glucosa en ayuno alterada (GAA) presentando un nivel de glucosa en plasma en ayuno (GPA) de 100 -125 mg/dl y/o la intolerancia a la glucosa (ITG), con una concentración de glucosa en plasma post-carga de 2 hrs entre 140-199 mg/dl, medido durante una prueba de tolerancia oral a la glucosa de 75 gr (CTOG)^{62,88}.

La glucosa de ayuno alterada y la intolerancia a la glucosa, identifican poblaciones diferentes. La glucosa de ayuno refleja la tasa de secreción hepática de glucosa y en grado variable la secreción de insulina por el páncreas, debido a que uno de sus efectos principales es inhibir la producción hepática de glucosa. En cambio, la intolerancia a la glucosa, evalúa la tasa de captación tisular de glucosa (en músculo) y la capacidad del páncreas para compensar este defecto.

En los pacientes con prediabetes se han descrito la presencia de los fenómenos fisiopatológicos similares a los que ocurren en DM2 pero en menor severidad⁸⁹, presentan: resistencia muscular y hepática a la insulina^{40,90-92}, disfunción de la célula β pancreática^{40,41,44,91,93}, disfunción de las células α pancreáticas con la consecuente hiperglucagonemia absoluta o relativa^{46,48,93}, reducción del efecto incretina^{52,94}, y el tejido adiposo, el cual es un órgano endocrino activo que secreta varias adipocitocinas (leptina, adiponectina, resistina, visfatina) y citocinas (TNF- α , IL-1, IL-6) que también están involucradas en la RI e inflamación presente en sujetos con obesidad y prediabetes^{95,96}. Con base en lo anterior, se puede resumir que los sujetos con glucosa de ayuno alterada tienen predominantemente RI a nivel hepático y disminución de la primera fase de

secreción de insulina, en tanto que los pacientes con intolerancia a la glucosa tienen RI a nivel periférico, específicamente a nivel de músculo, y deterioro en la primera y segunda fase de secreción de insulina^{97,98}.

2.2. Epidemiología

La prevalencia de prediabetes en ambas entidades (GAA e ITG) es étnico dependiente. La ITG, varía desde 6.3 hasta 20.3 %, GAA de 0.9 hasta 9.7 %, intolerancia a la glucosa con glucosa de ayuno alterada desde 13.4 a 26.3 % y GAA con ITG de 31 hasta 56.8 %⁹⁹. En México, datos de la ENSANUT 2012 arrojan una prevalencia de prediabetes de 9.2% y glucosa de ayuno alterada mayor al 28 %¹⁰⁰.

Esta tendencia creciente concuerda con las proyecciones para prevalencia de diabetes diagnosticada realizadas por Meza Rodríguez et al., a partir de datos de las encuestas nacionales referidas; estimaron que, para 2030, dicha prevalencia alcanzaría de 12 a 18%, y para 2050, de 14 a 22%¹⁰¹. Específicamente la prevalencia de prediabetes en Guanajuato fue de 33.21 %, de acuerdo a los datos obtenidos por la Unidad Metabólica del Hospital Regional de Alta Especialidad del Bajío (HRAEB) y el laboratorio de metabolismo de la Universidad de Guanajuato en un estudio de cohorte aún no publicado que incluyó a 1382 sujetos. En cambio, la prevalencia de GAA e ITG difiere en la población general por edad y género, esta incrementa de forma lineal en relación a la edad, pero en sujetos menores de 55 años la ITG es más frecuente en mujeres mientras que la prevalencia de GAA es más del doble en hombres¹⁰².

2.3. Clasificación

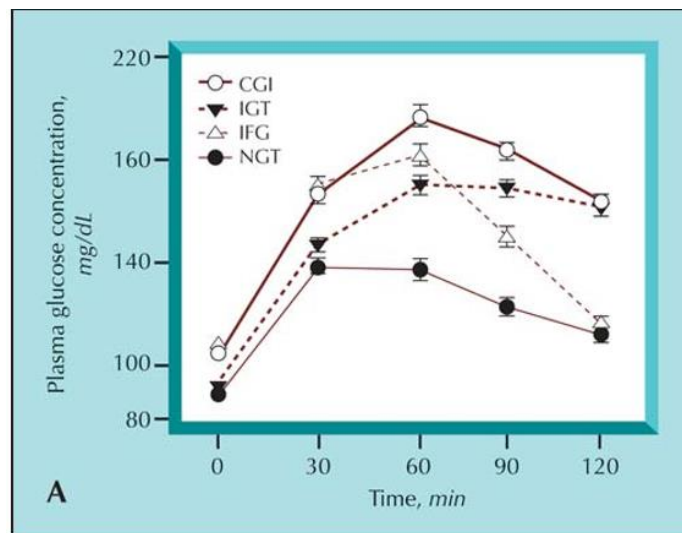
Existen 4 estados de prediabetes, los cuales se presentan de acuerdo a la siguiente secuencia cronológica:

- 1 Resistencia a la insulina de forma aislada sin hiperglucemia de ayuno ni hiperglucemia postprandial.
- 2 Glucosa Alterada en Ayuno (GAA) aislada.
- 3 Intolerancia a la Glucosa (ITG) aislada.
- 4 GAA + ITG.

Para que aparezcan estos estadios es indispensable la presencia de RI en hígado, músculo y tejido adiposo, y además la disfunción de la célula β pancreática, para su diagnóstico es necesario realizar una CTOG con una carga oral de 75 gr de glucosa anhidrida.

Las concentraciones de glucosa plasmática en prediabetes difieren en sujetos con GAA e ITG, es posible apreciar el comportamiento de ambas características en la CTOG. En donde considerando como referencia a los sujetos con tolerancia normal a la glucosa (NGT) y con concentración de glucosa menor a 100 mg/dl después de la carga, ellos se identifican por que el incremento en la concentración de glucosa alcanza su pico máximo entre los 30 y 60 minutos respecto al tiempo en la curva, para posteriormente disminuir y alcanzar valores por debajo de los 140 mg/dl a las 2 horas. Por lo tanto, se debe de considerar que en sujetos con NGT el pico máximo de concentración de glucosa rara vez aumenta por encima de 150 a 160 mg/dl. En cambio, los sujetos con ITG difieren en comparación con los anteriormente descritos, después de la ingestión de glucosa, la concentración de esta en plasma incrementa rápidamente a los 30 minutos, continúa aumentando después de los 60 minutos y permanece elevada por arriba de los 140 mg/dl a los 120 minutos. Es importante destacar que en esta condición el promedio de la concentración de glucosa en plasma a los 120 minutos no difiere de la media de los 60 minutos, como se observa en la figura 2. Con base en este comportamiento, se destacan 2 anomalías en la concentración de glucosa en plasma durante la CTOG en sujetos con ITG: 1) incremento rápido y continuo de la concentración de glucosa en plasma y 2) falta de la disminución en la concentración de glucosa en plasma a

los 120 minutos. En contraste, los sujetos con GAA aislada presentan mayor concentración de glucosa durante la CTOG en referencia a NGT e ITG, es decir, después de la ingestión de glucosa, la concentración de la misma en plasma es mayor a los 30 y 60 minutos versus NGT e ITG. A pesar de que el comportamiento es diferente a ITG aislada, explicado porque disminuye progresivamente al rango de normalidad (<140 mg/dl) a los 120 minutos. De esta forma es posible caracterizar dos anomalías en esta entidad: 1) concentración elevada de glucosa durante la curva e 2) incremento temprano exagerado en la concentración de glucosa en plasma después de la ingesta de glucosa^{102,103}.



Fuente: Tomado de Muhammad A, et al. 2009¹⁰³.

Figura 2. Concentración de glucosa sérica en función del tiempo durante la CTOG para los diferentes tipos de prediabetes.

2.4. Resistencia a la Insulina en Prediabetes.

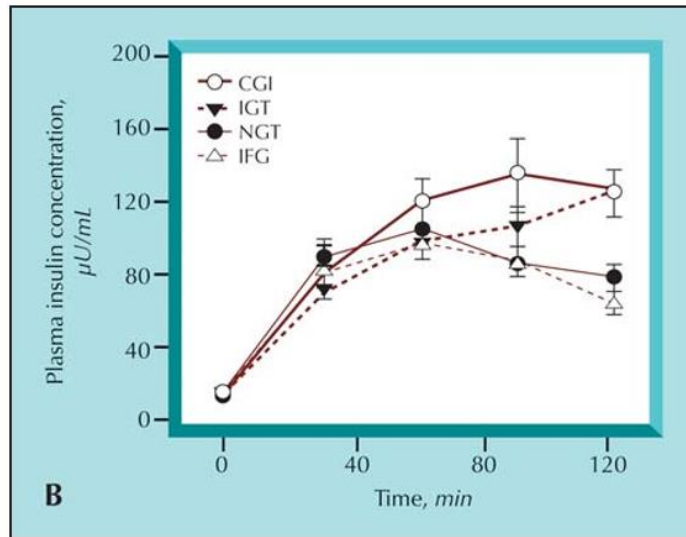
La concentración plasmática de insulina en ayuno es mayor en sujetos con GAA aislada e ITG aislada en comparación a los sujetos NTG, cabe señalar que esta concentración es mayor en GAA, se asocia el acrecentamiento de insulina con

el aumento del estado de RI y se manifiesta en el músculo esquelético, hígado y tejido adiposo.

La RI a nivel hepático se manifiesta por una supresión deficiente en la producción de glucosa hepática (PGH) por la insulina. En sujetos con presencia de GAA aislada en estado prandial, la PGH basal es reducida de forma moderada debido a la presencia de hiperinsulinemia en ayuno, este fenómeno es indicador de resistencia hepática grave a la insulina. En contraste en estado postabsortivo, la RI a nivel hepático se caracteriza por una tasa normal o reducida ligeramente de la PGH basal cuando existe hiperinsulinemia en ayuno. Por lo tanto, la concentración plasmática de insulina en ayuno y la PGH indican la gravedad de la RI a nivel hepático¹⁰².

Es conocido que la insulina es un inhibidor potente de la lipólisis, por lo que los sujetos con ITG se caracterizan por tener un incremento en la concentración de ácidos grasos libres en plasma (FFA)¹⁰⁴, evidenciando un aumento en la tasa de lipólisis en el tejido adiposo, asociada a la hiperinsulinemia en ayuno, indicando la presencia de resistencia a la acción antilipolítica de la insulina en los adipocitos. Es importante señalar que la supresión postprandial de FFA en plasma está afectada en sujetos con ITG a pesar de la hiperinsulinemia marcada¹⁰⁵, y que las concentraciones elevadas de FFA en plasma se asocian a la RI en músculo esquelético y hepatocitos.

Los sujetos con GAA e ITG presentan RI en los adipocitos, sin embargo, aquellos con GAA se caracterizan por presentar RI hepática grave con sensibilidad a la insulina del músculo esquelético cerca de lo normal. En cambio, en presencia de ITG se presenta un aumento marcado en la RI del músculo esquelético con tan solo un incremento leve en la RI hepática. Enfatizando, que el grado de RI es continuo, y la gravedad está relacionada con el nivel de intolerancia a la glucosa, lo anterior se aprecia en la figura 3.



Fuente: Tomado de Muhammad A, et al. 2009¹⁰³.

Figura 3. Concentración de insulina sérica en función del tiempo durante la CTOG para los diferentes tipos de prediabetes.

2.5 Secreción de Insulina en Prediabetes.

La secreción de insulina estimulada por la glucosa en prediabetes (GAA e ITG) está afectada. Esta afección se encuentra asociada a una insuficiencia progresiva de las células β y es considerada el principal factor responsable del desarrollo y progresión de DM2¹⁰⁶. Fisiológicamente, la principal vía de ingesta de glucosa es a través del tracto gastrointestinal, en el cual se estimula la secreción de las hormonas incretinas, GLP-1 (péptido similar al glucagón tipo 1) y GIP (péptido insulínico dependiente de glucosa) las cuales actúan en las células β para estimular la secreción de insulina. La evidencia señala que en GAA e ITG, existe un deterioro de la función de las células β ¹⁰⁷. Sin embargo, el patrón de deterioro en la función de las células β en GAA e ITG difiere entre sí. Específicamente la ITG presenta alteraciones graves en la fase temprana (0-30 min de la CTOG) y en la tardía (60-120 min de la CTOG) de la secreción de insulina. En contraste, en GAA existe alteración en la primera fase de insulina.

Cabe señalar que el mecanismo por medio del cual se produce la disfunción de las células β aún no es conocido, pero la evidencia acumulada indica la existencia de una asociación en la disminución progresiva de la sensibilidad de las células β en función del tiempo a medida que aumenta la concentración sérica de glucosa. Con relación a lo anterior, es necesario puntualizar la función de las incretinas, estas actúan sobre las células β para potencializar la secreción de insulina estimulada por la glucosa^{107,108}. En sujetos con prediabetes y DM2 las incretinas están disminuidas y a su vez están involucradas en la pérdida de la sensibilidad a la glucosa en las células β y al deterioro de la secreción de insulina a medida que aumenta la glucosa en plasma durante la CTOG¹⁰⁹. El detrimento en la secreción de insulina posterior a la administración intravenosa (IV) de glucosa alude que el defecto en la sensibilidad a la glucosa de las células β es en parte resultado de una anomalía intrínseca, sin embargo, no se debe en su totalidad a la disminución en los niveles plasmáticos de GLP-1 en sujetos con ITG¹⁰⁹.

La medida estándar de la función de las células β es el índice de secreción de insulina / la resistencia a la insulina, se calcula como $\Delta I / \Delta G \div IR$, donde ΔI representa la respuesta incremental de insulina a un acrecentamiento en la glucosa plasmática (ΔG), e IR hace referencia a la severidad de la RI. Cuando la función de las células β ($\Delta I / \Delta G \div IR$) está relacionada con las concentraciones de glucosa plasmática o glucosa plasmática en ayuno^{110,111}, la disminución de la función de las células β se hace evidente a concentraciones de glucosa plasmáticas consideradas dentro del rango de normalidad y donde se reduce progresivamente a medida que aumenta la concentración de glucosa en plasma. Con base en lo anterior es menester considerar que la función de las células β disminuye aproximadamente el 50 % en sujetos con GAA (95 – 100 mg/dl) o ITG (130 – 139 mg/dl) en el límite superior del rango de normalidad, mientras que los sujetos en el tercil superior de la concentración de glucosa en plasma durante los 120 minutos de la CTOG tienen una disminución del 80 % en la función de las células β ¹¹¹. Las implicaciones clínicas que arroja el estudio de estas observaciones son relevantes para los individuos con diagnóstico reciente de DM2, los cuales han perdido más del 80 % de la función de

las células β , ya que sí se interviene agresivamente con fármacos como: tiazolidiones y análogos de GLP-1 es posible conservar la función de las células β , tal como lo establece Muhammad y DeFronzo¹⁰³.

Las anomalías metabólicas que presentan sujetos con GAA e ITG, explican la funcionalidad de las células β , lo cual se representa objetivamente en la CTOG posterior a la ingestión de glucosa. Considerando entonces que la primera fase de secreción de insulina exhibe un defecto en los sujetos con GAA. Esta primera fase, desempeña un rol fundamental para inhibir la producción de glucosa endógena durante la ingesta de alimentos o bien en la CTOG, reduce la capacidad de la insulina para suprimir la producción de glucosa hepática, y este evento contribuye al incremento de la concentración de glucosa en plasma durante los primeros 60 minutos de la CTOG. Los sujetos con ITG manifiestan secreción deficiente de insulina en la segunda fase (fase tardía) y resistencia muscular a la insulina de intensidad moderada a severa, estos eventos dan como resultado una eliminación menos eficiente de la glucosa durante la CTOG, es decir, la concentración de glucosa en plasma incrementa después de los 60 minutos y permanece elevada a los 120 minutos. No obstante, debido a la sensibilidad a la insulina (SI) normal o casi normal en músculo esquelético con una respuesta secretora de insulina intacta en la fase tardía, los sujetos con GAA aislada pueden eliminar la carga de glucosa de manera eficiente y así restablecer la concentración de glucosa plasmática inicial a los 120 minutos¹⁰³ (Figura 2).

2.6 Riesgo de DM2 y Enfermedad Cardiovascular en Prediabetes.

Los sujetos con prediabetes presentan RI de moderada a grave en los músculos, hígado, y función alterada de las células β pancreáticas¹⁰³. Estas anomalías a nivel metabólico incrementan el riesgo de desarrollar DM2 a los sujetos con prediabetes. Cabe mencionar que algunos estudios epidemiológicos prospectivos han demostrado que los sujetos con GAA aislada e ITG aislada tienen

un riesgo anual de 4 % a 6 % de progresión a DM2 en comparación con una incidencia anual menor al 0.5 % en los sujetos con normoglucesmia. En cambio, los sujetos con GAA e ITG combinada tienen un riesgo mayor en comparación a las entidades aisladas el cual asciende aproximadamente al 10 % anual para la conversión a DM2, esto hace referencia a que el riesgo futuro de desarrollar DM2 es inferido por la GAA y aditivo al de ITG¹¹².

Además del riesgo de desarrollar DM2 a futuro, los sujetos que presentan prediabetes también tienen un riesgo mayor de enfermedad cardiovascular¹¹³. Muhammad et al, en su artículo refirió un incremento del 50 % aproximadamente en el riesgo a desarrollar enfermedad cardiovascular, este es mayor en sujetos con ITG en comparación de los sujetos con GAA. Las anomalías metabólicas asociadas con la RI posiblemente contribuyan al aumento del riesgo de enfermedad cardiovascular. Sin embargo, el mayor riesgo de esta patología persiste después de controlar todos los factores de riesgo cardiovascular. De tal manera, es alta la probabilidad para considerar a la RI como un factor de riesgo importante para la aterosclerosis¹⁰³.

3. Tratamiento de la prediabetes

Existen diferentes estrategias farmacológicas y no farmacológicas utilizadas para prevenir la progresión de la prediabetes a DM2. Las dos estrategias preventivas son: La primera, a nivel población, la cual orienta su objetivo a evitar la presencia de factores de riesgo modificables y la segunda, en población de alto riesgo, como los pacientes con GAA + ITG y diabetes gestacional con la finalidad de mejorar la RI y la disfunción de las células β pancreáticas.

Se han realizado estudios para evaluar la efectividad de las modificaciones en el estilo de vida con el objetivo de prevenir la DM2. Uno de los primeros ensayos clínicos fue Da Qing IGT and Diabetes Study en el que se incluyeron 530 pacientes

con ITG identificada por CTOG. Los sujetos fueron divididos en tres grupos: 1) tratado con una dieta de 25-30 Kcal/kg, con distribución de 55-60 % de hidratos de carbono (HCO), 10-15 % de proteínas y 25-30 % de lípidos, con sesiones de orientación semanales al inicio, después mensuales durante los siguientes 3 meses y posteriormente cada 3 meses; 2) Ejercicio: con la finalidad de gastar 1 o 2 UI por día; 3) Grupo combinado con dieta y ejercicio. Además, se contó con un grupo control. Se realizó el seguimiento durante 6 años, los resultados fueron reducción del riesgo de DM2 en 33 % en el grupo tratado con dieta, 47 % en riesgo en el grupo tratado con ejercicio y reducción del 38 % en el grupo tratado con dieta y ejercicio¹¹⁴.

En Finlandia se realizó un ensayo clínico ciego simple titulado Finnish Diabetes Prevention Study Group basado en modificaciones del estilo de vida, se incluyeron 522 pacientes con ITG y por lo menos un factor de riesgo para diabetes mellitus. Tuvieron dos grupos de intervención: 1) Grupo control con intervención anual, se le brindó información oral y escrita sobre dieta y ejercicio, 2) Grupo de intervención, se le indicó actividad física 30 min/día para una pérdida del 5 % del peso corporal además un plan de alimentación reducido en lípidos (<30 % del Valor Energético Total (VET)) e incremento en la ingesta de fibra. Los seguimientos en este grupo fueron cada 2 meses en el primer año y posteriormente cada 3 meses. El seguimiento tuvo una duración de 3.2 años y los resultados obtenidos fueron reducción del riesgo de DM2 del 58 %, cabe señalar que no todos los pacientes en el grupo de intervención lograron los objetivos terapéuticos¹¹⁵.

El estudio de Prevención de Diabetes (Diabetes Prevention Program, DPP), es uno de los más representativos debido al impacto en las modificaciones del estilo de vida en la prevención de DM2. Es un ensayo clínico aleatorizado con seguimiento de 2.8 años, se incluyeron a 3234 pacientes con IMC > 24 y con GAA y/o ITG, ellos fueron aleatorizados en tres grupos de estudio: 1) grupo tratado con metformina 850 mg/día el primer mes y posteriormente 850 mg dos veces al día, además se les proporcionaron recomendaciones para mejorar el estilo de vida de forma oral y escrita, 2) grupo tratado con placebo y recomendaciones para mejorar estilo de

vida y 3) grupo tratado con: programa intensivo para mejorar estilo de vida el cual consistió en realizar 150 min de actividad física de forma semanal, reducir ingesta de lípidos y energía en la dieta, promoviendo 7 % de pérdida de peso corporal. Este grupo tuvo 16 sesiones personalizadas, las primeras 24 semanal y posteriormente cada mes, es importante mencionar que en este estudio el 50 % de los participantes en el grupo de intervención para modificar el estilo de vida lograron perder 7 % del peso corporal a las 24 semanas del estudio y solo el 38 % lo mantuvo hasta el final, 74 % de los participantes mantuvieron la actividad física requerida a las 24 semanas del estudio y de estos solo el 58 % hasta finalizar, a las 24 semanas el grupo de intervención logró una reducción de la ingesta energética de 450 kcal/día en comparación con 250 Kcal/día en los otros grupos. Los resultados concluyeron que con modificaciones intensivas en el estilo de vida se logró reducir el riesgo de DM2 en un 58 % y con metformina en un 31 %, aun así, la incidencia acumulada de DM en 3 años fue de 14.4 % en el grupo de intervención, 21.7 % en el grupo de metformina y 28.9 % en el grupo de placebo¹¹⁶, a pesar de ello, a largo plazo se ha observado que la mayoría de los pacientes eventualmente desarrollaron DM2, sin importar el tipo de intervención preventiva que estén recibiendo.

Además de la metformina, se han utilizado otros medicamentos antidiabéticos como la acarbosa. En un estudio de cohorte de 1429 pacientes con ITG se mostró una reducción del riesgo de DM2 del 25 %, esto con un número necesario a tratar de 11 para evitar un caso de DM2. Cabe señalar, que más de la cuarta parte de pacientes no completó el seguimiento debido a los efectos secundarios del medicamento¹¹⁷. En el estudio Diabetes REduction Assessment with ramipril and rosiglitazone Medication (DREAM) utilizaron rosiglitazona, incluyeron 5269 pacientes con GAA y/o ITG, fueron aleatorizados a 4 – 8 mg del fármaco o a placebo, se siguieron a los pacientes por 3 años, encontrándose que el grupo tratado con rosiglitazona disminuyó el riesgo de DM2 a 62 %¹¹⁸. El estudio ACT NOW, utilizaron pioglitazona 45 mg al día en sujetos con GAA y/o ITG por 12 meses, los pacientes tratados con el fármaco mostraron una reducción del riesgo de DM2 de 80 % en comparación con placebo¹¹⁹.

Actualmente las intervenciones farmacológicas utilizadas en pacientes con DM2, van dirigidas hacia las alteraciones fisiopatológicas. En el caso del tratamiento en prediabetes, es necesario evitar la progresión de la enfermedad, para esto es preciso identificar que las opciones que puedan impactar mayormente cada una de las alteraciones fisiopatológicas son las que tendrán mayor efecto para evitar la progresión de la enfermedad^{43,44,90,93,120}, dentro de estas intervenciones farmacológicas, las que podrían tener mayor eficacia para el perfil farmacológico son:

- 1) **METFORMINA:** Es el fármaco antidiabético más utilizado en el mundo. Aunque su efecto principal lo ejerce a nivel hepático, también tiene efecto en otros tejidos como músculo, tejido adiposo y endotelial. La mayoría de sus efectos están relacionados con el control de la RI y/o hiperinsulinemia. A nivel hepático, la metformina activa una enzima conocida como AMP kinasa (AMPK), lo que ocasiona una inhibición de enzimas lipogénicas y gluconeogénicas, disminuyendo la lipólisis, aumentando la oxidación de ácidos grasos, reduciendo la producción hepática de glucosa (gluconeogénesis), aumentando su captación hepática y la glucólisis, todo esto es debido a que aumenta la sensibilidad al efecto de la insulina. A nivel de músculo, la metformina también activa la AMPK, mejorando así la señalización de la insulina. Por lo tanto, la captación muscular de glucosa, entre otros efectos descritos, como: mejoría en la inflamación, reducción de la lipogénesis y aumento en la oxidación de ácidos grasos. A nivel de tejido adiposo, la metformina reduce la lipólisis, debido a la activación de la AMPK modula la secreción de adipocitocinas, reduciendo la gluco y lipotoxicidad, lo que lleva a aumentar la señalización de la insulina, por lo tanto, la captación de glucosa por la grasa visceral, reducción en la lipogénesis y aumento en la oxidación de ácidos grasos¹²¹. A través de todos estos mecanismos, la metformina reduce la glucosa plasmática de ayuno y la hiperinsulinemia, como monoterapia logra reducir hasta 1.5% la HbA1c, siendo el único medicamento aprobado para ser utilizado en personas con prediabetes, se

asocia a reducción de peso en porcentaje variable, como monoterapia es muy poco probable que cause hipoglucemia, las dosis de metformina van de 500 a 2550 mg/día, y sus principales efectos adversos son: diarrea, flatulencias y malestar intestinal por lo que se recomienda iniciar con dosis bajas e ir incrementando hasta llegar a la dosis deseada, aunque teóricamente se asocia a la presencia de acidosis láctica, parece que el riesgo era mayor con la Fenformina (antigua Biguanida que fue sacada del mercado justamente por asociarse con acidosis láctica)¹²¹. Está contraindicada en personas con insuficiencia renal, definida esta por una creatinina sérica >1.5 mg/dl o una depuración de creatinina en orina de 24 hrs <30 ml/min, hepatopatía crónica avanzada, infección aguda que condicione predisposición a la acidosis y en personas con alcoholismo importante¹²².

- 2) **INCRETINAS:** Los pacientes con DM2 y con prediabetes presentan disfunción de los islotes pancreáticos (disfunción de las células β con consecuente reducción en la secreción de insulina, disfunción de las células α con mayor producción de glucagón y depósitos de amiloide) siendo este es un evento crucial para la progresión de la enfermedad de prediabetes a DM2, por lo que los medicamentos que puedan mejorar la funcionalidad de los islotes, aumentando la secreción de insulina y reduciendo la de glucagón, podrían tener un impacto importante en la enfermedad¹²³. Los efectos farmacológicos de las incretinas son: aumento en la secreción de insulina, disminución de la secreción de glucagón, retardar el vaciamiento gástrico, reducción del apetito y de forma directa ocasiona reducción de peso. En general hay dos maneras de incrementar el efecto incretina, mediante la aplicación de análogos de incretina, los cuales son inyectables, y mediante la inhibición de la enzima que degrada al GLP-1 endógeno, que es la dipeptidil-peptidasa 4 (DPP-4). Al encontrarse reducido el efecto incretina en pacientes con DM2 y con prediabetes, sabiendo que el efecto de los medicamentos incretinomiméticos mejoran la función del islote pancreático podrían tener algún efecto sobre la acción periférica de la insulina¹²⁴⁻¹²⁷

resulta interesante conocer el impacto que podrían tener en prevención de DM2, sobre todo cuando se combinan con sensibilizadores a la insulina.

Existen pocos estudios que evalúan el efecto de las incretinas en personas con prediabetes. Con análogos de GLP-1, un estudio aleatorizó a 38 pacientes con GAA e ITG a recibir exenatide 10 µg cada 12 hrs por vía subcutánea durante 24 semanas, encontrando que además del efecto reductor de peso, un gran porcentaje de pacientes con prediabetes tratados con exenatide revirtieron a la normalidad (77% vs 56% para el grupo placebo)¹²⁸. En otro ensayo clínico aleatorizado se comparó el efecto de liraglutide, otro análogo de GLP-1, sobre metabolismo de la glucosa, RI y secreción de insulina en 24 pacientes tratados con liraglutide y 27 con placebo, de los cuales 10 y 11, respectivamente, tenían glucosa de ayuno alterada + intolerancia a la glucosa, se logró una reducción del 29% en la resistencia periférica a la insulina y un incremento del 21% en la secreción de insulina¹²⁹. En otro estudio, 22 pacientes con GAA fueron aleatorizados a recibir 100 mg de Sitagliptina, inhibidor de la DPP-4, durante 8 semanas reportando nulo efecto sobre el metabolismo de la glucosa, aunque reportes de algunos casos clínicos mencionan un efecto importante sobre la glucosa en pacientes con prediabetes.

3.1 Tabla de evidencia de la literatura 1.

Se realizó una revisión sistemática, en la cual, de primera instancia, se hicieron combinaciones con las siguientes palabras MESH: (“Incretin based drugs” [MESH] AND “efficacy” [MESH]) búsqueda de la cual, se obtuvieron 127 resultados, además se optó por buscar con las siguientes: (“Incretin based drugs” [MESH] AND “Incretin Analogues” [MESH] AND “Diabetes” [MESH]), se encontraron 441 resultados.

Los estudios que evalúan la efectividad de los fármacos tipo incretina y análogos de incretina sobre HbA1c y glucosa se muestran en el **ANEXO 1**¹³⁰⁻¹⁵³.

4.Linagliptina

El mecanismo de acción de la linagliptina consiste en inhibir la enzima DPP-4, esta enzima proteolítica se encuentra en la membrana celular de las células del cuerpo humano, con la función primaria de inactivar al GLP-1, por lo que al ser inhibida por la linagliptina esto favorece a que los niveles endógeno se eleven hasta 3.2 veces más por arriba de los valores previos (estos se encuentran disminuidos en sujetos con DM2, explicando porque estos pacientes tienen una reducción en el efecto incretina), condicionando los efectos biológicos del GLP-1 como estimulación de la secreción de insulina por las células β pancreáticas e inhibición de la secreción de glucagón por las células α pancreáticas. Este efecto sobre la estimulación en la secreción de insulina es totalmente dependiente de los niveles de glucosa, por lo que no ocasiona hipoglucemia.

La linagliptina tiene una vida media de 12 hrs por lo que puede utilizarse cada 12 o 24 hrs, se elimina por vía biliar en más del 70 % por lo que puede utilizarse en pacientes con nefropatía sin necesidad de ajustar la dosis, ofrece una potencia para lograr una inhibición sostenida de más del 90 % en la DPP-4 durante 24 hrs y es altamente selectiva para inhibir la DPP-4 en comparación a otras enzimas como la Dipeptidil Peptidasa-8 (DPP-8) y Dipeptidil Peptidasa-9 (DPP-9). Linagliptina está indicada en el tratamiento del paciente con DM2 descontrolada, que no cubre las metas de control glucémico, es decir, HbA1c menor a 7 %, glucosa de ayuno menor a 110 mg/dl y glucosa posprandial menor a 140 mg/dl. Se puede utilizar como terapia en combinación con metformina, sulfonilureas, tiazolidinedionas e insulinas, ya sea como terapias dobles o triples.

El perfil de seguridad de la linagliptina y metformina combinada a dosis de 2.5 mg y 850 mg respectivamente cada 12 horas fue evaluado en más de 3500 sujetos con DM2 en comparación con grupos placebo en donde la incidencia global de Eventos Adversos (EA) en los pacientes con placebo fue similar a los tratados con la combinación de linagliptina y metformina 50.6 % y 47.8 % respectivamente. La interrupción del tratamiento fue similar a la presentada por los sujetos tratados con placebo y la combinación 2.6 % y 2.3 %. Los principales eventos adversos presentados fueron: tos, pérdida del apetito, diarrea, náusea, pancreatitis, vómito y prurito; en donde la reacción adversa informada con mayor frecuencia fue diarrea 0.9 % para linagliptina en combinación con metformina.

La linagliptina fue aprobada para el tratamiento de la DM2 en adultos mayores de 18 años, sola o combinada con otros agentes antidiabéticos orales (metformina, sulfonilureas o pioglitazona), por la Food and Drug Administration por sus siglas en inglés (FDA) en mayo del 2011¹⁵⁴ y por Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) en México (Secretaría de Salud, SSA) en enero del 2012 en combinación con Metformina.

4.1 Tabla de evidencia de la literatura 2.

Se realizó una revisión sistemática, en la cual, de primera instancia, se hicieron combinaciones con las siguientes palabras MESH: (“Linagliptin” [MESH] AND “efficacy” [MESH]) búsqueda de la cual, se obtuvieron 181 resultados, además se optó por buscar con las siguientes: (“Linagliptin” [MESH] AND “efficacy” [MESH] AND “seguriy” [MESH]).

Los estudios que evalúan la efectividad de la linagliptina sobre HbA1c y glucosa se muestran en el **ANEXO 2**¹⁵⁵⁻¹⁶⁷.

5. Microbiota Intestinal Humana

Se conoce como microbiota a la comunidad de microorganismos vivos residentes en un nicho ecológico determinado. La microbiota que reside en el colon humano es una de las más densamente pobladas^{167,168}, contienen un estimado de 10^{10-13} bacterias por gramo, lo que representa aproximadamente 1 – 1.5 kg en peso. El genoma colectivo de la MI se llama *microbioma intestinal* y se estima que existen más de 3 millones de genes, es decir, 150 veces más que los genes humanos^{169,170}.

La MI está taxonómicamente clasificada a través de la nomenclatura biológica tradicional como (phylum-clase-orden-familia-género-especie)¹⁷¹. Está compuesta de trillones de microorganismos pertenecientes fundamentalmente a 5 filos: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* y *Verrucomicrobia*, en donde predominan los dos primeros¹⁷². El filo *Firmicutes* (Gram-positivo) y *Bacteroidetes* (Gram-negativo) representan el 90 % (aproximadamente 1000 especies bacterianas)¹⁷³. Los géneros predominantes son *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus* y *Fusobacterium*, así como diversos cocos gram-positivos¹⁷⁴.

Cambios relacionados con el estilo de vida y la composición bacteriana puede romper el delicado equilibrio de la constitución microbiana y dar lugar a un estado de desequilibrio crónico denominado disbiosis, una condición que se ha asociado con enfermedades metabólicas^{99,175}. Recientes estudios en modelos animales y seres humanos han encontrado correlaciones entre alteraciones específicas en la estructura de la comunidad de la MI y la aparición de la DM2 y la obesidad¹⁷⁴. La MI incluye especies nativas que colonizan permanentemente el tracto gastrointestinal (TGI), sin embargo, las cantidades y tipos de bacterias presentes están influenciadas por diversos factores como el potencial hidrógeno (pH), concentraciones de oxígeno y disponibilidad de nutrientes¹⁷⁶.

Un trabajo reciente sugiere que la MI se puede dividir en tres grupos llamados enterotipos^{171,177}, esta caracterización de la MI se realizó a partir de 33 sujetos de diferentes nacionalidades (francés, español, italiano, danés, japonés y estadounidense)¹⁷⁸. Los tres enterotipos se pueden identificar sobre la base de las variaciones en los niveles relativos de *Bacteroides*, *Prevotella* y *Ruminococcus*.

Enterotipo 1: Se enriquece en *Bacteroides* y co-produciendo *Parabacteroides*, ambos derivan energía principalmente de hidratos de carbono (HCO) y proteínas por fermentación.

Enterotipo 2: Se enriquece en *Prevotella* que co-produce *Desulfovibrio* y son conocidos para operar en sinergia y romper mucina de glicoproteínas.

Enterotipo 3: Es el enterotipo más común, se distingue sobre la base del enriquecimiento en los niveles de *Ruminococcus* y el co-produciendo *Akkermansia*, ambos de los cuales contiene especies capaces de degradar las mucinas¹⁷⁶.

Sorprendentemente, estos enterotipos no varían por las características del paciente, como nación, sexo, índice de masa corporal (IMC) o la edad, a pesar de que estos resultados se basan en un número relativamente pequeño de sujetos¹⁶⁹.

5.1 Microbiota intestinal y Metabolismo

La MI juega un papel importante para mantener la función del intestino, manteniendo el recambio epitelial, modulando la respuesta inmune y participando en el metabolismo de algunos medicamentos. Además, las bacterias del intestino juegan un rol determinante para la síntesis de micronutrientes como la vitamina K, vitamina B12, ácido fólico, fermenta sustancias indigeribles, absorbe electrolitos y minerales, y además produce ácidos grasos de cadena corta, que estimulan el crecimiento y desarrollo de los enterocitos y colonocitos¹⁷⁹. En lo referente al metabolismo energético, se planteó la teoría que la composición de la MI en un individuo puede determinar la eficacia en la extracción de la energía de la dieta y por lo tanto la tendencia a depositar el exceso de energía como tejido adiposo¹⁸⁰,

por lo tanto, la dieta con alto contenido en fibra se asocia a menor riesgo de obesidad¹⁸¹. Por otra parte, la MI puede generar alteraciones en el metabolismo del huésped, por ejemplo, la reducción de bacterias productoras de AGCC, encargadas de la fermentación de HCO indigeribles, cuya disminución se asocia al incremento de concentraciones de glucosas séricas característica en la DM2 y otros factores en los que se incluyen la presencia de carcinógenos en la dieta y catabolismo de toxinas¹⁸¹.

5.2 Microbiota intestinal y su relación con la obesidad

Estudios en seres humanos y ratones han demostrado que la obesidad puede asociarse con cambios en la composición de la MI. Los primeros estudios informaron un enriquecimiento en *Firmicutes* y una correspondiente disminución en los niveles de *Bacteroidetes* en la MI de los individuos obesos. Turnbaugh et al., demostraron que ratones genéticamente obesos presentaban un 50 % menos de *Bacteroidetes* y más *Firmicutes* que sus hermanos delgados, ellos comprobaron que la MI de los ratones obesos liberaba más calorías durante la digestión, que la de los ratones delgados¹⁸². Gordon et al., realizó un programa de pérdida de peso en 12 voluntarios con IMC mayor a 30 kg/m², en la investigación se sometieron a una dieta restringida en kilocalorías (kcal) durante 52 semanas, a todos los participantes les solicitaron muestras de heces a los 0, 12, 26 y 52 semanas, y manejaron como controles a 2 voluntarios con IMC de 23 kg/m² y edad de 32 y 36 años. Los resultados que la obesidad humana se asocia con una baja abundancia de *Bacteroidetes* y una gran abundancia de *Firmicutes*¹⁸¹. Sin embargo, Duncan et al., y Jumpertz et al., no encontraron diferencias en las proporciones entre los sujetos delgados y obesos¹⁸³⁻¹⁸⁵.

5.3 Microbioma Intestinal e Inflamación Crónica

El microbioma intestinal regula la inmunidad innata y adaptativa, influye en las respuestas locales y sistémicas. Por tal motivo se cree que podría influir en la inflamación crónica de bajo grado asociada a la obesidad y RI. Los receptores Toll-like (TLR) de reconocimiento celular de las células del sistema inmune innato, constituyen un punto de partida de la inmunidad, estos se activan en respuesta a estímulos microbianos o derivados de la dieta (proteínas o lípidos) e informa a las células del sistema inmune para que respondan a estos. Después de su activación por un ligando, los TLR interaccionan con distintas proteínas que activan la transcripción de diversos factores Mitogen Activated Protein Kinases (MAPKs) y Factor Nuclear Potenciador de las Cadenas Ligeras Kappa de las células Beta Activadas (NF- κ B), síntesis de diferentes citoquinas y mediadores inmunológicos de la inflamación¹⁸⁶. Los LPS de bacterias gram-negativas han mostrado posibles funciones de ligando para el receptor TLR4 y TLR2. El TLR4 es competente para estimular la liberación de citoquinas inflamatorias endógenas como TNF- α , IL-6 y otras citocinas relacionadas a la inducción de RI¹⁸⁶ e inflamación sistémica de bajo grado¹⁸⁷, y además reconoce proteínas séricas glicosiladas llamadas productos finales de glicosilación avanzada (AGE)¹⁸⁸. En el estado hiperglucémico, diferentes proteínas como la hemoglobina, la albúmina o las lipoproteínas de baja densidad (LDL) se glicosilan enzimáticamente en residuos de lisina y arginina, originando los AGE¹⁸⁹.

En los macrófagos, los AGE pueden unirse a TLR4, que se sobreexpresa en la DM2. Por lo tanto, la activación de TLR conduce a una cascada de señalización intracelular mediada por NF- κ B, cuando se transloca al núcleo activa la transcripción de genes que codifican citoquinas y quimiocinas inflamatorias, como TNF- α , IL-1 β y CXCL8 para promover el inicio de la respuesta inflamatoria en respuesta a la hiperglucemia¹⁹⁰.

El proceso inflamatorio en la célula β está mediado por dos vías: 1) la activación de TLR2 y TLR4 por patrones moleculares asociados con lesión (DMAP),

y 2) el ensamblaje del receptor tipo NOD del inflamasoma que contiene el dominio de pirina (NLRP3)¹⁹¹. La insulina es el resultado del proceso, se caracteriza por una liberación continua de IL-6, IL-8, TNF- α , y MCP-1, además de la activación de macrófagos insulares y el reclutamiento de nuevos monocitos y macrófagos periféricos¹⁸⁸.

Durante la inflamación sistémica de bajo grado, el tejido adiposo, hepático y muscular sufre infiltración de macrófagos inflamatorios que producen TNF- α , esta citocina interfiere directamente en los tejidos, reduciendo su capacidad para responder a la insulina. La insulina normalmente se une al receptor ubicado en la superficie de miocitos, hepatocitos y adipocitos¹⁸⁸. Posteriormente, se inicia una cascada de señalización intracelular mediada por el sustrato del receptor de insulina (IRS), que activa la proteína quinasa B (Akt) y finalmente induce la movilización de GLUT2 y GLUT4 para introducir glucosa en la célula. Por el contrario, cuanto mayor es la presencia de TNF- α , la activación de la vía de señalización (IRS-Akt_GLUT-2 y 4) es inhibida por la acción de vías intracelulares que responden al TNF- α , como la quinasa relacionada con la señal extracelular (ERK) / c-Jun NH2-terminal quinasa (JNK), NF- κ B y proteína-tirosina fosfatasa 1B (PTP1B), estos inhiben directamente la fosforilación de IRS, Akt y GLUT-2 y 4^{192,193,194}. Además, se ha observado una circulación prolongada de marcadores inflamatorios y anomalías en la permeabilidad intestinal en la génesis de la inflamación sistémica en la DM2^{6,195,196}. La translocación de bacterias enteras, metabolitos bacterianos y componentes de la pared bacteriana en la circulación contribuye al daño de órganos remotos, producido por interferencia entre el microbioma intestinal y órganos periféricos como el hígado, tejido adiposo, sistema muscular y el páncreas. En conjunto, esta dependencia metabólica del microbioma del huésped se convierte en un factor crucial para los sistemas homeostáticos del metabolismo energético implicados en DM2¹⁹⁷.

5.4 Microbiota Intestinal y su relación con prediabetes y diabetes.

En la actualidad existen pocos estudios referentes a la relación entre la composición de la MI con DM2 y menos con prediabetes, se sugiere con base en la evidencia acumulada que el microbioma intestinal podría jugar un rol importante en la patogénesis, evolución y probablemente en la respuesta a diferentes intervenciones de la DM2¹⁹⁸⁻²⁰⁰. Existe un consenso creciente en relación al incremento en la prevalencia de la DM2 y obesidad en donde se especifica que no puede atribuirse este fenómeno solamente a cambios en el genoma humano, hábitos nutricionales o al sedentarismo²⁰¹. Se ha propuesto recientemente al MI como uno de los factores importantes para el control del metabolismo energético y el control del peso, relacionados a DM2, debido a que los sujetos con GAA e ITG, así como los diagnosticados con DM2 presentan cambios en composición y función metabólica reportada desde hace más de una década en numerosos estudios en esta población²⁰².

Hasta la fecha, se conocen diversos mecanismos por los cuales el microbioma intestinal puede contribuir al desarrollo de la DM2 entre los cuales destacan: 1) la alteración del metabolismo de HCO y vías de señalización asociada, 2) interacción con el sistema inmune, 3) mecanismos de inflamación y 4) permeabilidad intestinal alterada²⁰³. Se ha relacionado en estudios recientes la asociación entre la composición del microbioma intestinal y la DM2, los pacientes con esta condición presentan disbiosis intestinal, además de una reducción en el número de *Bacteroides* y aumento de *Firmicutes*, igual que en obesidad^{182,183}. En etapas tempranas como la prediabetes se han reportado cambios en la composición del MI caracterizado por disminución en la abundancia de *Clostridium* y de bacterias degradadoras de mucinas como *Akkermansia Muciniphila*²⁰⁴.

En suma, a lo anterior, LaFerrere et al., demostró la asociación entre la presencia en ayuno de aminoácidos de cadena ramificada (AACR) en plasma y la incidencia de DM2, en ratas que fueron suplementadas con AACR y que posterior

a la suplementación desarrollaron RI, lo que sugiere un papel potencialmente causal de los aminoácidos o sus metabolitos en trastornos metabólicos²⁰⁵. El MI probablemente puede contribuir independientemente al incremento en los niveles séricos de AACR en sujetos con RI, debido a la participación del MI en la biosíntesis de estos, los cuales están estimulados por especies como *Prevotella copri* y *Bacteroides vulgatus*, sugiriendo que las especies anteriormente mencionadas probablemente pueden influir en el metabolismo del huésped, de tal manera que la disbiosis intestinal afecta potencialmente el metaboloma sérico y contribuye a la RI a través de vías que involucran a los AACR²⁰⁶.

Por otra parte, durante más de dos décadas se ha asociado la composición del MI con el desarrollo de DM2. Zhang et al²⁰⁷., analizó a 121 sujetos chinos, que se dividieron en 3 grupos en función de su estado de intolerancia a la glucosa, el primer grupo con tolerancia normal a la glucosa (NGT; n=44), segundo grupo con prediabetes (Prediabetes; n=64) y tercer grupo con DM2 de recién diagnóstico (DM2; n=13). Los resultados obtenidos mostraron que los pacientes con prediabetes y DM2 se caracterizan por un grado moderado de disbiosis en el MI, una disminución en la abundancia de algunas bacterias productoras de butirato y un aumento de varios patógenos oportunistas, incluyendo la separación microbiana de comunidades y un cambio de la diversidad α entre los diferentes estados de intolerancia a la glucosa. Bacterias productoras de butirato (por ejemplo, *Akkermansia muciniphila* ATCCBAA-835, y *Faecalibacterium prausnitzii* L2-6) tenían una abundancia mayor en el grupo NGT que en el grupo prediabetes. Además, encontraron que *Verrucomicrobiae* puede ser un marcador potencial de la DM2 ya que significativamente fue menor tanto en el prediabetes y grupos DM2¹⁸³.

Además del estudio anterior Wu et al., analizaron la diversidad y la similitud de la MI entre 16 individuos con DM2 y 12 individuos sanos, con el objetivo de caracterizar la MI en pacientes con diabetes, observando que no hubo diferencias significativas en los filos entre el grupo diabético y saludable, aunque unos pocos individuos con diabetes mostraron una disminución notable en perfiles de las especies. En cuanto al índice de similitud, mostró que la composición de la MI en el

grupo de diabetes podría haber cambiado debido al estado de la enfermedad. Los resultados de la secuenciación también revelaron que la composición bacteriana del grupo de diabetes era diferente a la del grupo sano. Los géneros *Bifidobacterium* y *Bacteroides vulgatus* están reducidos en la microbiota del grupo de sujetos con diabetes²⁰¹.

Larsen et al, en su estudio reportaron que los hombres con DM2 presentaron una disminución significativa en los niveles fecales de *Firmicutes* incluyendo *Clostridiales*, en comparación con los sujetos controles, no diabéticos, y que además esta disminución se correlacionó positivamente y significativamente con la concentración de glucosa en plasma, pero no con el índice de masa corporal (IMC)²⁰². En una cohorte de 345 individuos chinos, Qin et al. encontraron que los pacientes con DM2 exhiben una disminución de bacterias productoras de butirato (como *Clostridiales*, *Eubacterium* y *Faecalibacterium*), así como un aumento de patógenos oportunistas (perteneciente al género *Bacteroidetes* y *Clostridium*). Más aún los pacientes con la enfermedad presentaron un aumento de la bacteria degradante de mucina, *Akkermansia muciniphila* y una especie reductora de sulfato del género *Desulfovibrio*²⁰³. Otro estudio en mujeres europeas ha observado una correlación negativa en los niveles de *Clostridiales*, lo cual se logró correlacionar negativamente con los niveles de hemoglobina glicosilada (HbA1c) y la GAA^{182,183,207-209}.

Allin K et al, en su estudio realizado en 134 sujetos daneses con prediabetes en comparación con el mismo número de sujetos sin alteraciones de glucosa, que fungieron como grupo control se encontraron diferencias significativas en la composición del MI, en donde aquellos con incremento en la RI y menor función de las células β presentaron reducción en la abundancia de géneros bacterianos implicados en la homeostasis de la glucosa, entre ellos *Clostridium* y *Akkermansia muciniphila*, así como *Faecalibacterium prausnitzii* bacteria productora de butirato. Sin embargo, se observó incremento en la abundancia de bacterias gram-positivas como *Dorea*, *Ruminococcus*, *Sutterella* y *Streptococcus*, evidenciando que la MI tiene diferente composición en relación a la presencia de alteraciones en la glucosa.

Los cambios en la composición correlacionaron con variables clínicas de estudio en esta investigación, en donde a mayor abundancia de *Ruminococcus* y *Dorea* mayor concentración sérica de glucosa en ayuno, péptido C, insulina en ayuno, HbA1c y HOMA-IR²⁰⁴.

Autor	Población	Resultados
Larsen, et al 2010	Sujetos: Masc • NGT (n=18) • DM2 (n=18) Edad: 31 – 73 años.	<ul style="list-style-type: none"> • Reducción de <i>Firmicutes</i>, incluye <i>Clostridia</i>. • Reducción: <i>Bacteroidetes</i> – <i>Firmicutes</i> • C (+) con concentración de glucosa en plasma. • No correlacionó con IMC.
Wu, et al 2010	Sujetos: Fem y Masc • NGT (n=12) • DM2 (n=16) Edad: 48 - 62 años	<ul style="list-style-type: none"> • Disminución en perfiles de las especies en DM2. • No hay diferencia significativa entre grupos. • Composición bacteriana del grupo de DM2 diferente a la del grupo sano. • El género <i>Bifidobacterium</i> y <i>Bacteroides vulgatus</i> están reducidos en la MI del grupo de DM2. • La MI se modifica por el estado de DM2.
Zhang, et al 2013	Sujetos: Fem y Masc • NGT (n=12) • Pre-DM2 (n=64) • DM2 (n=16) Edad: 46 - 64 años	<ul style="list-style-type: none"> • Pre-DM y DM2: Disbiosis, <bacterias productoras de butirato y > patógenos oportunistas. • NGT vs Pre-DM: • NGT: mayor abundancia de bacterias productoras de butirato. • DM2 vs NGT y Pre-DM: • La abundancia de <i>Bacteroides</i> fue sólo la mitad de los grupos NGT y Pre-DM. • <i>Akkermancia muciniphila</i> como biomarcador de DM2.
Allin, et al 2017	Sujetos: Fem y Masc • NGT (n=134) • Pre-DM (n=134) Edad: 55 - 68 años	<ul style="list-style-type: none"> • NGT vs Pre-DM: • Pre-DM: a nivel de género fue menor la abundancia de <i>Clostridium</i> y de <i>A. Muciniphila</i> e incrementó la de <i>Dorea</i>, <i>Ruminococcus</i>, <i>Sutterella</i> y <i>Streptococcus</i>. Disminución de cepas de <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> (productor de butirato). • C (-) abundancia de <i>Clostridium</i> con concentración sérica de glucosa en ayuno, insulina en ayuno, péptido C y HOMA-IR. • C (+) abundancia de <i>Ruminococcus</i> con concentración sérica de glucosa en ayuno, péptido C, HOMA-IR y HbA1c. • C (+) abundancia de <i>Dorea</i> con concentración sérica de glucosa ayuno y péptido C.

NGT: Sujetos normotolerantes a la glucosa, **Pre-DM2:** Prediabetes, **DM2:** Diabetes Mellitus tipo 2, **C (+):** Correlación positiva, **C (-):** Correlación negativa.

Tabla 2. Afección de la MI en sujetos con Prediabetes y DM2.

5.5 Intervención del microbioma en el metabolismo glucídico.

Hoy en día, son diversos los mecanismos que se proponen para explicar la influencia del MI sobre la RI, entre estos se encuentran con mayor solidez los siguientes:

- Influjos de bacterias productoras de AGCC.
- Incremento en la endotoxemia.
- Influencia de los ácidos biliares secundarios.
- Modificaciones de la secreción de incretinas relacionadas con la RI y la funcionalidad de la célula beta.

5.5.1 Influjos de bacterias productoras de ácidos grasos de cadena corta.

Los AGCC, acetato, propionato y butirato, se producen en el tracto gastrointestinal. La MI produce AGCC a través de la fermentación de la fibra dietética. La producción se lleva a cabo principalmente en el colon distal y proximal, en una relación molar 60:20:20, acetato, propionato y butirato respectivamente²¹⁰.

La cantidad y tipo de fibra ingerida por el huésped tiene efecto en la composición de la MI y, en consecuencia, el tipo y la cantidad de los diferentes AGCC producidos. La genética del huésped y el medio ambiente tienen una influencia trascendental en la diversidad microbiana en el intestino grueso²¹¹. A partir de la fermentación sacarolítica, la MI comensal deriva la mayor parte de HCO

no digeribles y produce productos de fermentación que se asemejan a AGCC y que expresan una cascada de funciones metabólicas relacionadas con la nutrición y salud del huésped²¹². De tal manera que 15 gr de HCO no digeribles producen entre 400 y 600 mmol/día, reducen el pH del colon y equivalen al 10 % de los requerimientos calóricos humanos diarios²¹³.

El pH influye en la competencia creciente de las bacterias en el intestino, un pH de 5.5 favorece el crecimiento de bacterias productoras de butirato como: *Roseburia* y *Faecalibacterium prausnitzii*. En cambio, cuando la fibra no fermentable se encuentra limitada en el intestino grueso distal, el pH luminal aumenta a 6.5, eliminando las bacterias productoras de butirato casi en su totalidad y convirtiendo el medio a condiciones ideales para la sobreproducción de bacterias relacionadas al phylo *Bacteroides*, que producen acetato y propionato²¹⁴.

5.5.1.1 Vías metabólicas bacterianas para la producción de SCFA.

Los *Firmicutes* son microorganismos con mayor eficiencia en la fermentación de HCO insolubles, en cambio las especies de *Bacteroidetes* son más versátiles en el uso de sustratos, utilizan oligosacáridos y polisacáridos solubles que provienen de la rotura de polisacáridos insolubles²¹⁵. Las *Bifidobacterias* específicamente las *Actinobacterias* contienen enzimas que degradan glicanos y glicosaminoglicanos como: celulosa, condroitina, ácido hialurónico y mucinas. Los oligo y polisacáridos no digeribles producen múltiples grupos de metabolitos (por ejemplo, los AGCC) a través de la fermentación, necesarios para equilibrar la transferencia de electrones entre especies²¹⁶.

La MI utiliza la vía Embden – Meyerhof – Parnas para producir piruvato por glucólisis a partir de hexosas y fosfoenolpiruvato pentosa por la ruta pentosa – fosfato. Estas moléculas intermedias son usadas a su vez por otras vías de síntesis bacteriana para producir AGCC. Una porción significativa de piruvato obtenida en estas vías se convierte en acetyl CoA con la formación concomitante de H₂ y CO₂.

La conversión a acetato a partir de sus precursores se produce por acción directa de especies bacterianas como: *Coprococcus eutactus* y *Coprococcus come*, que se obtiene de la hidrólisis del acetil CoA a CO₂ o a través de la vía Wood-Ljungdahl, donde el CO₂ se reduce a CO y convertido con un grupo metilo y la CoA (CoASH) a acetil CoA^{217,218}. En condiciones normales, las *Bifidobacterias* y *Proteobacterias* producen lactato y el lactato se convierte en SCFA por la acción de *Eubacterium hallii*.

Las bacterias del colon utilizan 3 vías diferentes para la formación de propionato: las vías succinato, acrilato y propanodiol.

A partir de la vía del succinato, considerada como la vía dominante dentro de la MI, se produce propionato usando transferencia de electrones, lo que implica la descarboxilación de metilmalonil CoA a propionil CoA. Posteriormente, se usa una cadena de transferencia de electrones anaeróbica para reducir el oxaloacetato a malato y luego a fumarato aceptando electrones de NADH a través de una cadena de transferencia de electrones entre NADH y malato, y NADH y fumarato usando enzimas NADH deshidrogenasa y bacterias intestinales, como: phylo *Bacteroides spp*, *Bacteroidetes*, y *Veillonella spp*. El phylo *Firmicutes* tiene las enzimas necesarias, como la fumarato reductasa con NADH, para reducir el fumarato a succinato. Por lo tanto, una vez que se obtuvo succinato de la intervención bacteriana, se convierte en succinil CoA y finalmente en propionato a través de bacterias, al igual que *Phascolarctobacterium succinatutens*. El propionato también se forma por reducción de piruvato a lactato por *Eubacterium hallii*, *Anaerostipes spp* y *Veillonella spp*, y posteriormente por *Coprococcus catus* y *Megasphaera elsdenii* a través de la vía del acrilato en la que el lactato se reduce a propionato²¹⁷.

La ruta del propanodiol también es utilizada por algunas especies bacterianas como *Roseburia inulinivorans*, *Ruminococcus obeum* y *Salmonella* entérica, para producir fucosa y propionato de ramnosa. La abundancia de *Bacteroidetes* se ha relacionado con la concentración total de propionato fecal en DM2^{217,218}.

Por el contrario, el butirato se produce a través de 2 rutas diferentes: 1) la ruta de la butirato quinasa, que utiliza las enzimas fosfotransacetilasa y butirato quinasa para convertir la butiril-CoA en butirato y coenzima A con la formación concomitante de ATP. Esta vía está limitada por *Coprococcus spp*, incluido *Coprococcus eutactus* o *Coprococcus come*, por lo que es la menos común. 2) las bacterias que se asemejan a *Eubacterium rectale*, *Roseburia spp*, *Eubacterium hallii*, *Anaerostipes spp*, *Coprococcus catus* y *Faecalibacterium prausnitzii* han demostrado utilizar acetato derivado exógenamente y la enzima butiril CoA: acetato CoA transferasa para producir butirato en la vía butiril CoA-transferasa, el butiril CoA se convierte en butirato en un solo paso enzimático de la reacción^{219,220}.

Los mecanismos implicados en la alimentación cruzada entre bacterias consisten en la utilización de los rendimientos finales producidos por el metabolismo de una especie bacteriana y por una bacteria secundaria. Este es el caso de los organismos productores de acetato y butirato, que además conduce a la conversión de acetato exógeno a butirato y acetil-CoA, evidenciando el uso de productos de descomposición ricos en HCO complejos por una bacteria, originando alimentación cruzada del sustrato, donde las bacterias que no pueden procesar HCO complejos pueden proliferar utilizando productos de degradación creados por bacterias sacarolíticas. La alimentación cruzada bacteriana produce desde acetato a butirato, y en menor medida butirato y propionato^{219,220}.

Las funciones de los tres AGCC son:

Butirato: Es metabolizado por los colonocitos, proporciona energía a las células epiteliales del colon, contribuye a disminuir la permeabilidad intestinal e inhibe la producción de TNF proinflamatorio, modulando la actividad del factor de transcripción NF-KB^{219,220}.

Acetato: Sirve de sustrato para la gluconeogénesis, la síntesis de colesterol y de triglicéridos.

Propionato: Se utiliza para la síntesis del novo de glucosa y lípidos, además de servir como fuente de energía para el huésped. Inhibe la expresión génica de las enzimas hepáticas involucradas en la lipogénesis de novo²¹⁶.

En ratones alimentados con dieta alta en grasa, la suplementación dietética de butirato, previene el aumento de peso corporal e incrementa la sensibilidad a la insulina al incrementar el gasto de energía y a su vez disminuir la ingesta de alimentos, de tal manera que la literatura sugiere con base en este beneficio que los AGCC pueden prevenir la obesidad y RI, al provocar un cambio de la lipogénesis a la oxidación de ácidos grasos en el hígado y el tejido adiposo²²¹. El butirato y propianato pueden inducir gluconeogénesis intestinal, actuando a través de un circuito neural intestino – cerebro para mejorar la producción periférica de la glucosa y la sensibilidad a la insulina²²².

Por otra parte, los AGCC tienen una función excelsa sobre la sensibilidad a la insulina en humanos a través de las incretinas, las cuales potencian la secreción de insulina en respuesta a la glicemia, regulándola y son responsables de alrededor del 70% del nivel de insulina postprandial. La principal es la GLP-1, los AGCC se unen a los receptores de ácidos grasos libres acoplados a la proteína G en la mucosa del colon los cuales son G-protein-Coupled receptor tipo 41 (GPR41) y G-protein-coupled receptor tipo 43 (GPR43). Mediante el receptor GPR41 se libera el péptido YY, que reduce la energía extraída de la dieta al aumentar el peristaltismo intestinal, en cambio mediante el receptor GPR43 se libera GLP-1, induce la liberación de insulina dependiente de glucosa e inhibe la secreción de glucagón, incrementa la sensibilidad a la insulina, reduce la gluconeogénesis hepática y disminuye el apetito^{219, 220}.

5.5.2 Incremento en la endotoxemia.

El intestino es la principal fuente de LPS²²³. El incremento de esta endotoxina se asocia con la ingesta de una dieta alta en grasas, aumenta la permeabilidad

intestinal favoreciendo la aparición de endotoxemia metabólica, y, en consecuencia, aumento de peso y RI²²⁴. La endotoxemia ocurre cuando los LPS llegan al sistema circulatorio²²⁵. Estos se absorben por el enterocito y son transportados en plasma unidos a quilomicrones²²⁶. Los LPS actúan como ligandos, que se unen al receptor CD14/TLR2 y TLR4 presentes en los macrófagos provocando un incremento en la producción de moléculas proinflamatorias (IL-1, IL-6 y TNF- α)²²⁷.

Las alteraciones en el MI son capaces de modificar el grado de inflamación del tejido adiposo, como se ha demostrado en estudios preclínicos al infundir LPS en ratones alimentados con una dieta normal. Mediante estos estudios se han establecido asociaciones causales de los LPS en el desarrollo de RI a nivel hepático, intolerancia a la glucosa e incremento en el peso del tejido adiposo²²⁸. Por lo tanto, los LPS pueden inducir una respuesta inmune, activando vías que causan inflamación, lo que a su vez inhibe la señalización de la insulina²²⁹.

La hiperglucemia y la hiperinsulinemia son afecciones comunes en pacientes con DM2, y a su vez pueden ser causa indirecta de endotoxemia²³⁰, ya que reducen la motilidad del yeyuno y el tiempo de tránsito gastrointestinal, favorecen el crecimiento excesivo de bacterias en el intestino delgado y aumentan la permeabilidad intestinal²³¹. Las reducciones en las concentraciones de insulina en plasma promueven la función de las células de Kupffer, que son, en parte, responsables del aclaramiento de LPS. Cuando los LPS interactúan con HDL, la activación de TLR se ve afectada. Las personas con niveles bajos de HDL mostraron un aumento de la respuesta inflamatoria (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8) después de la infusión de LPS en dosis bajas^{230,232}. De esta manera, la exposición crónica y sistémica a niveles ligeramente más altos de LPS puede causar RI²³⁰. Las personas con DM2 tienen 76% más LPS en relación con las concentraciones promedio en individuos sanos²³³.

5.5.3 Influencia de los ácidos biliares secundarios.

Cambios en la cantidad de ácidos biliares circulantes (AB) se ha evidenciado y vinculado con RI. Las alteraciones están relacionadas con estructuras hepáticas, ácidos biliares primarios y reducción del phylo *Firmicutes*, estos microorganismos exclusivamente contienen las enzimas bacterianas involucradas en la biotransformación a ácidos biliares secundarios²³⁴.

Los AB primarios se secretan en el intestino delgado después de su producción en el hígado y la amidación de N-acilo con sustituyentes de glicina o taurina (conjugación gluco-tauro). EL 95% de los ácidos biliares primarios conjugados se reabsorben por medio de la circulación enterohepática y el 5% restante escapa de este mecanismo alcanzando el intestino grueso y se transforma en ácidos biliares secundarios por acción de los *Firmicutes*. Los sujetos con DM2 y prediabetes tienen menor número de ácidos biliares secundarios en comparación con sujetos sanos, relacionándose esta característica con una alteración en el metabolismo de los HCO, ya que estos tienen un rol insulinosensibilizador. Actúan como moléculas mediadoras a través de receptores nucleares, como el receptor Farnesoid X (FXR) y al receptor de ácidos biliares acoplado en la proteína G, el receptor de membrana Gpbar1 (TGR5) expresado en la vesícula, el íleon, colon, tejido adiposo pardo y blanco²³⁵.

En el momento en que los AB secundarios derivados de los microbios intestinales se unen a TGR5, el receptor internaliza y activa una serie de señales dependientes de adenilato ciclasa a partir de la participación del metabolismo de la glucosa y energía de los lípidos en el tejido adiposo marrón y el músculo aumenta la actividad mitocondrial y la fosforilación, esto genera insulinosensibilización en modelos de ratones diabéticos y obesos. Del mismo modo, sobre las células intestinales L mejora el metabolismo glucémico estimulando la producción de GLP-1 y promoviendo la secreción de insulina²¹⁹.

5.5.4 Modificaciones de la secreción de incretinas relacionadas con la resistencia a la insulina y la funcionalidad de la célula beta.

La evidencia demuestra que el incremento de *Bifidobacterium spp* modula la inflamación en ratones obesos por un incremento en la producción de GLP-1, péptido YY y al mismo tiempo reduce la permeabilidad intestinal. De esta manera se asocia el efecto al descenso de la RI e incremento de la funcionalidad de la célula beta²³⁶.

5.6 Efecto de los fármacos antidiabéticos en el Microbioma Intestinal.

La DM2 y la obesidad son problemas de salud pública en la actualidad con características de epidemia, ambas de origen multifactorial. El aumento de la prevalencia de dichas enfermedades, ha requerido nuevos estudios en donde se identifiquen factores causales para así desarrollar tratamientos innovadores que puedan frenar o retardar el crecimiento exponencial de estas patologías, colocando en primer plano el estudio de la prediabetes. Para lo cual, un novedoso agente ha emergido en la última década como posible diana terapéutica, el microbioma intestinal, debido a su papel en la regulación metabólica y la extracción de energía procedente de la dieta. Al día de hoy se ha enfatizado en el estudio de los tratamientos más prometedores para modular la MI a través de la dieta, los probióticos, los prebióticos, trasplante fecal, uso de antibióticos y fármacos antidiabéticos. Dada la importancia de las interacciones fármaco – MI, es elemental generar e incrementar la evidencia científica que demuestre las interacciones de los fármacos antidiabéticos en el MI.

Los medicamentos ingeridos llegan al tracto gastrointestinal y se encuentran en el intestino con la MI, hasta el momento se ha demostrado que las enzimas

codificadas por la MI tienen la capacidad de metabolizar los xenobióticos y afectar la farmacogenética de los medicamentos y su biodisponibilidad.

5.6.1 Efecto de la Metformina sobre el MI.

En recientes estudios se ha demostrado que los efectos terapéuticos de la metformina están mediados por la MI, debido a que el principal reservorio del fármaco es el intestino y por ende sus efectos primarios residen en este sitio. La acción farmacológica de la metformina incluye alteraciones en la recirculación de ácidos biliares y en la MI dando como resultado un incremento en la secreción de GLP-1. Forslund et al., en su estudio de 199 sujetos con DM2 y 544 participantes control sin DM2, estratificados por regímenes de tratamiento, encontró que el tratamiento con metformina tenía un efecto significativo sobre la composición de la MI, identificando los cambios en comparación a los sujetos controles^{237,238}. La MI de los sujetos tratados con metformina tenían mayor producción de butirato y propionato, debido al enriquecimiento de bacterias productoras de ácidos grasos de cadena corta (*Blautia*, *Bacteroides*, *Butyricoccus*, *Bifidobacterium*, *Prevotella*, *Megasphaera*, *Butyrivibrio*)²³⁹ en cambio los sujetos no tratados con metformina tenían un enriquecimiento de genes microbianos implicados en la degradación de glicina y triptófano, y el agotamiento de los genes implicados en treonina y degradación de arginina, resulta importante recalcar que la glicina se ha asociado con la sensibilidad a la insulina²⁴⁰. Sekar et al, en su estudio determinó que la suplementación con glicina puede ser un tratamiento para la deficiencia de glutatión ya que se ha demostrado que mejora la sensibilidad a la insulina en DM2²³⁹. Cabe señalar que, a nivel de género, se ha reconocido un incremento de *Escherichia* y disminución de *Intestinibacter* en sujetos tratados con metformina, *Proteobacteria* y *Firmicutes*, aumentaron después de dos meses de tratamiento y posterior a 4 meses de consumo se presentó acrecentamiento significativo en las concentraciones fecales de lactato y succinato²³⁹. Además, Shin et al, en su estudio mostró diferencias estadísticamente significativas en la abundancia de *Firmicutes* y

Bacteroidetes y la composición de la MI en ratones tratados con metformina y no tratados con el fármaco, únicamente en ratones con dieta alta en grasa²⁴⁰.

La obesidad contribuye a la reducción de la diversidad de la MI y la DM2 induce a disbiosis caracterizada por alteración en las bacterias productoras de butirato como *Akkermansia Muciniphila* que fue propuesta como biomarcador para la intolerancia a la glucosa. Karlsson et al, en su estudio desarrolló un modelo basado en perfiles de metagenoma intestinal para diagnosticar DM2 en humanos y para identificar a personas con alto riesgo a desarrollar la patología en donde encontró una reducción en las bacterias productoras de butirato en específico *Roseburia* y *Faecalibacterium prausnitzii*²⁴¹.

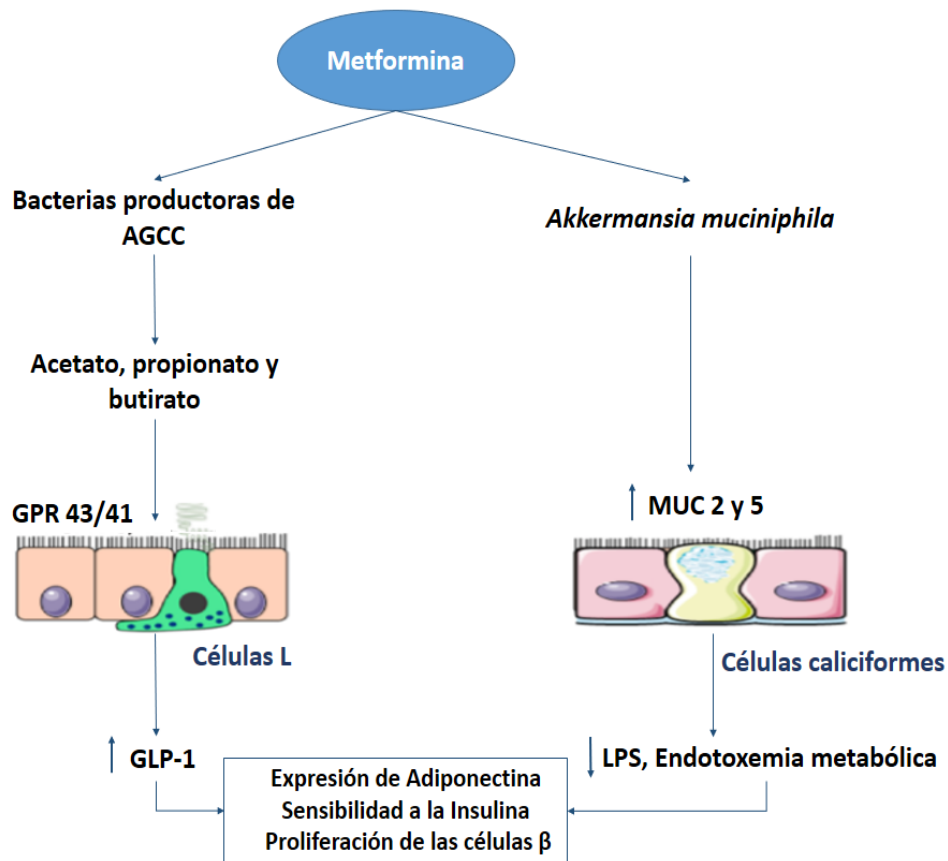
Na-Ri Shin et al, en su estudio en modelo animal con ratones obesos inducidos a DM2 determinó la relación del efecto antidiabético de la metformina con la composición de la MI. Encontraron que el efecto de la metformina puede estar mediado por un subconjunto específico de taxones bacterianos asociado a mayor abundancia de *Anaerotruncus*, *Lactococcus*, *Akkermansia*, *Parabacteroides*, *Odribacter*, *Alistipes*, *Lawsonia*, *Blautia* y *Lactonifacter*, de los cuales *Akkermansia* fue responsable de la mayor abundancia de *Verrucomicrobiae* observada en los ratones inducidos a DM2 en tratamiento con metformina en comparación con los ratones control con $p < 0.05$. De igual forma el número de células calciformes productoras de bacterias degradadoras de mucina fue mayor en el grupo de ratones con DM2 y en tratamiento con metformina vs grupos control 9.5 ± 0.5 vs 6.6 ± 0.3 , $p > 0.001$. La modificación de la composición de la MI se asoció a una mayor tolerancia a la glucosa en ratones en tratamiento con metformina con significancia estadística $p < 0.05$ ²⁴². Los resultados anteriores coinciden con lo encontrado por de la Cuesta – Zuluaga et al., en humanos en donde estudió a sujetos con diagnóstico de DM2 tratados con metformina y con otros fármacos antidiabéticos, los resultados respecto a la composición de la MI fueron estadísticamente significativos en bacterias degradadoras de mucina teniendo más abundancia los tratados con metformina específicamente en *Akkermansia muciniphila* $p = 0.003$ y *Butyrivibrio*

$p=0.08$, sin presentar relevancia en las bacterias productoras de butirato, *Roseburia* $p=0.23$, *Subdoligranulum* $p=0.97$ y *Faecalibacterium* $p=0.47$, asociados al tamaño de muestra en cada grupo insuficiente para obtener relevancia estadísticamente significativa²⁴³.

Recientemente, se estableció la presencia de la degradación de mucinas en ratones con dieta alta en grasa²⁴⁴ y se sugirió que se relaciona con trastornos metabólicos. Lee H et al, en su investigación encontraron que posterior al tratamiento con metformina en ratones hembra, la expresión de los genes MUC 2 y MUC 5 en el intestino delgado incrementó, efecto que resulta ser beneficioso por el tratamiento, debido a que las mucinas gastrointestinales producidas por las células calciformes protegen al epitelio subyacente de los patógenos (Figura 4)²⁴⁵. De la misma forma, otros estudios han demostrado el efecto de la metformina sobre el incremento de la abundancia de *Akkermansia muciniphila* y *Clostridium cocleatum* en modelo animal alimentado con dieta alta en grasa, en donde se ha sugerido que la abundancia de *Akkermansia muciniphila* por metformina puede no necesariamente ser correlacional, debido a que la administración de *Akkermansia muciniphila* sola mejora la tolerancia a la glucosa en roedores. Sumando evidencia a estos hallazgos, un estudio demostró que la pared celular de *Akkermansia muciniphila* contiene un ingrediente activo que imita la acción de la metformina para reducir la hiperglucemia^{246,247}. La *Akkermansia muciniphila* coloniza más eficientemente el colon en comparación con intestino delgado superior, el incremento en abundancia de esta es mayor en función del tiempo, es decir, un régimen de tratamiento más prolongado o crónico es requerido para inducir cambios significativos en la abundancia de *Akkermansia muciniphila*²⁴⁷.

El tratamiento con metformina además de incrementar *Akkermansia muciniphila* en el colon también aumenta la abundancia de *Lactobacillus* en el intestino delgado superior y esto puede contribuir al efecto antidiabético de la metformina²⁴⁸. En conjunto con la modulación de la composición del microbioma, la metformina mejora además la función metabólica del MI, es decir, incrementa la

población de bacterias productoras de AGCC, entre ellas se incluyen *Alobacum*, *Bacteroides*, *Blautia*, *Butyricoccus*, y *Phascolarctobacrium* en el intestino. Con lo reportado por los diferentes estudios en modelo animal y en humanos se hace evidente la capacidad del fármaco para modificar la diversidad bacteriana, aumenta selectivamente la abundancia de bacterias específicas, altera múltiples vías metabólicas en el MI, como aquellas involucradas en el metabolismo de la glucosa^{246,249}.



Fuente: Tomado de Kyriachenko Y, et al. 2019²⁴⁶.

Figura 4. Acción de la Metformina en la MI.

Wu et al, en su estudio incluyó a personas con DM2 sin tratamiento previo, en donde se evidenció que la administración de metformina en diferentes cantidades y tiempo modificó la abundancia de *Escherichia*, *Intestinibacter* y bacterias

productoras de AGCC, específicamente *Bifidobacterium adolescentes*²⁵⁰⁻²⁵². Sin embargo Chen J et al, en personas con reciente diagnóstico de DM2 analizó la composición del MI a los 2 y 4 meses de tratamiento con metformina, los hallazgos demostraron cambios significativos en la abundancia de *Escherichia* e *Intestinibacter* en todos los meses analizados, además originó el crecimiento de *Bifidobacterium adolescentis*²⁵³ y coincide con lo encontrado en el estudio de Wu et al. Asimismo existe evidencia de que la suplementación con *Bifidobacterium adolescentis* en modelo de roedores con síndrome metabólico puede aumentar la sensibilidad a la insulina, de tal manera que la MI adaptada a metformina puede contribuir a la homeostasis de la glucosa²⁵⁰.

Whang et al, en su revisión sistemática hace referencia a las contribuciones del tratamiento con metformina sobre el incremento en la abundancia de *Escherichia*, *Akkermansia muciniphila* y *Subdoligranulum*, así como la disminución de *Intestinibacter bartlettii*²⁵². Usando modelos metabólicos a escala genómica se permitió dilucidar el metabolismo bacteriano y el efecto sobre los nutrientes en el huésped, este estudio sugirió que la *Escherichia* contribuye a la producción de ácidos grasos de cadena corta (acetato y butirato) involucrados en los efectos sobre la homeostasis de la glucosa²²⁹. Se ha demostrado que el tratamiento con metformina en humanos inhibe significativamente dos grupos funcionales de géneros similares a patógenos como: *Alistipes*, *Oscillibacter* y *Bacteroidetes*, esta acción se correlaciona significativamente con la mejora en la homeostasis de glucosa^{254,255}. Al mismo tiempo la metformina deteriora el metabolismo del folato en bacterias como *Escherichia coli*, de tal manera que estos mecanismos pueden ser un medio por el cual la metformina ejerce sus efectos benéficos sobre el MI^{229, 256}.

Evidencia reciente y adicional generada por ensayos clínicos han determinado que la acción predominante de la metformina es en la parte inferior del intestino, determinado al estudiar la liberación retardada de la Biguanida en voluntarios sanos y con DM2, en donde el retraso de la liberación de este fármaco se basa en una disolución dependiente del pH de la capa entérica de la tableta, esto

ocurre a pH de 6.5 en la parte distal del intestino, donde la densidad de las células L es alta, para maximizar los mecanismos de la metformina basados en el intestino. La farmacocinética y estudios de rango de dosis han demostrado que la metformina de liberación prolongada tiene una eficacia comparable con la de liberación inmediata, pero con un incremento del 40% en la potencia, por lo que permite utilizar dosis menores^{255, 256}. Debido a lo anteriormente expuesto es necesario generar ensayos clínicos de fase III para dilucidar por completo la eficacia de la metformina sobre la composición de la MI.

5.6.2 Efecto de los fármacos tipo incretinas sobre la MI.

La evidencia demuestra que además de la biguanida existen otros fármacos como las incretinas que modifican la composición de la MI y se asocia con el incremento en la sensibilidad a la insulina, como los inhibidores de la DPP-4 (DPP-4i). Los sustratos potenciales de la actividad de la DPP-4 son las hormonas intestinales, GLP-1 y GIP, y su actividad influye en trastornos metabólicos como ya ha sido mencionado. Zhong et al., mostró en ratones knockout para DPP-4 un aumento en los niveles de GLP-1 y mayor tolerancia a la glucosa, el mismo efecto se presentó en humanos al administrar DPP-4i, los cuales mantienen las incretinas (GLP-1 y GIP) en su forma activa²⁵⁷.

Yevheniia et al, en su artículo establece que bacterias como *Prevotella* o *Lactobacillus*, pueden expresar homólogos humanos de DPP-4²⁵⁰. Hace referencia a los hallazgos sobre la expresión de DPP-4 en ratones gnotobióticos colonizados con heces de sujetos magros vs ratones libres de gérmenes, siendo mayor en el primer grupo e indicando que la MI produce actividad similar a DPP-4. Con base en los resultados que se han obtenido recientemente en relación a la enzima, se estableció que la DPP-4 codificada por la MI podría ser un mecanismo innovador para alterar el metabolismo del huésped.

Los DPP-4i son la sitagliptina, saxaglitina, vildagliptina y linagliptina que se administran por vía oral. Xinleng Yan et al, en su estudio en modelo animal determinó el efecto de la sitagliptina sobre la composición de la MI y su relación con la intolerancia a la glucosa, los resultados obtenidos son contundentes. Los ratones tratados con sitagliptina por 12 semanas modificaron la composición de la MI, redujeron los *Firmicutes* vs ratones con DM2 (63.19 % vs 83.56 %, $p<0.01$) e incrementaron *Bacteroidetes* (32.46 % vs 16.06 %, $p<0.01$), además redujeron la glucosa sérica en comparación con ratones con DM2 mostrando significancia estadística $p<0.01$. Concluyendo que la sitagliptina restablece la MI a nivel de phylo igual a la condición delgada, sin presentar efecto en el peso corporal²⁵⁸.

Qian Zhang et al, en su estudio determinó el efecto de la vildagliptina en el incremento de bacterias productoras de butirato en ratas inducidas a DM2, con dieta alta en lípidos y estreptozotocina se proporcionó vildagliptina a dos dosis, alta (0.02 gr/kg) y baja (0.01 gr/kg) los cuales mostraron diferencias estadísticamente significativas en comparación con ratas control en el número de Unidades Taxonómicas Operacionales (OTU), diversidad de la MI por índice de Shannon y riqueza de la MI por índice de Chao, todos con $p<0.01$. La vildagliptina modificó el índice *Firmicutes/Bacteroidetes* característico en la MI en ratones con DM2, redujo *Firmicutes* e incrementó *Bacteroidetes*, $p<0.01$. Además, disminuyó la abundancia de *Tenericutes* y *Elusimicrobia* (eficaces en la extracción de energía de la dieta) con significancia estadística $p<0.05$ ²⁵⁹.

El tratamiento con vildagliptina enriqueció la MI con phylos como *Streptococcaceae* $p<0.01$ y *Bacteroides* $p<0.01$, pero disminuyó *Ruminococcaceae* *Cascilibacter* $p<0.05$, *Ruminiclostridium* $p<0.05$, *Anaerotruncus* $p<0.01$, *Eubacterium* $p<0.05$ y *Prevotellaceae* $p<0.05$. Se determinó que las ratas tratadas con vildagliptina redujeron glucosa en ayuno, postprandial, HbA1c, HOMA-IR e IL-6 en comparación con ratones DM2 y normoglucémicos con significancia estadísticamente significativa $p<0.01$ para cada variable, además incrementó GLP-1 en relación a lo determinado en ratones con DM2, $p<0.05$. Se demostró que la

vildagliptina enriqueció bacterias productoras de butirato, *Lactobacillus*, disminuyó *Oscillibacter* y que los cambios son asociados con los distintos biomarcadores metabólicos, promueve producción de péptidos en íleon y reduce indirectamente la expresión hepática de citocinas proinflamatoria, proponiendo así que el tratamiento con vildagliptina puede convertirse en terapia estratégica para enfermedades metabólicas como la DM2²⁵⁹.

Lin Wang et al, compararon la modulación estructural de la MI con dos tratamientos liraglutida (agonista de los receptores de GLP-1) y saxagliptina (inhibidor de la DPP-4) en relación con el peso corporal y la glucosa sérica, los autores encontraron que los ratones tratados con liraglutida enriquecieron los generos *Allobaculum* $p=0.004$, *Turicibacter* $p=1.77e-8$, familia *Erysipelotrichaceae* en específico los géneros *Anaerostipes* $p=5.51e-5$, y *Blautia* $p=0.039$, familia *Lachnospiraceae* género *Lactibacillus* $p=0.013$. Asociándose a una reducción en el peso corporal en los ratones con este tratamiento normoglucémicos + liraglutida vs normoglucémicos control 28 ± 0.37 gr vs 29.19 ± 0.25 gr, $p=0.017$ e hiperglucemia + liraglutida vs hiperglucemia control 26.60 ± 0.33 gr vs 28.32 ± 0.43 gr, $p=0.005$ ²⁶⁰.

En cambio, la composición de la MI en tratamiento con saxagliptina aumentó la abundancia de *Lactobacillus* $p=0.023$, *Allobaculum* $p=0.017$ y *Turicibacter* $p=0.001$ dentro de la clase *Erysipelotrichaceae*. Disminuyó la abundancia de *Bacteroidetes* en específico los géneros *Bacteroides* $p=0.003$ y *Prevotella* $p=0.018$. La abundancia relativa de todos los filotipos relacionados con la obesidad se redujo con liraglutida mientras que solo uno de phylos se afectó con saxagliptina. La concentración de glucosa al azar fue menor en ratones tratados con linagliptina vs controles, $p<0.05$ ²⁶⁰. Cabe señalar que al observar la abundancia relativa de los filotipos asociados con una reducción en el peso corporal, liraglutida, así como saxagliptina demostraron enriquecer *Lactobacillus* y *Turicibacter*, curiosamente *Lactobacillus* posee actividad inhibitoria contra DPP-4, quedando evidente el probable incremento en las incretinas y a su vez su acción sobre la homeostasis de la glucosa²²⁷.

La prediabetes es un trastorno progresivo que es caracterizado por un incremento en la concentración de glucosa sérica a medida que avanza la disfunción pancreática, lo que genera la necesidad de incrementar al tratamiento cambio en el estilo de vida y tratamiento farmacológico (monoterapia de metformina). Existen pocos estudios en prediabetes en donde se ha planteado el uso de terapias combinadas para retardar la progresión a DM2. Dentro de las combinaciones más frecuentes se encuentra la de los IDPP-4 y metformina. En la actualidad, existe poca evidencia sobre los efectos de las diferentes terapias combinadas en el MI. Las terapias dobles han evidenciado la reducción de *Clostridium cocoides* e incremento en *Bifidobacterium* en aquellas con metformina y *Enterobacteriaceae* fue significativamente mayor, en ensayos preclínicos. Lo que hace indudable que la combinación de diferentes terapias hipoglicemiantes tiene efecto sobre el MI. Sin embargo, de acuerdo a la evidencia generada en los estudios anteriores, aún no es claro determinar si los cambios generados en el MI mejoran o retrasan la resistencia al largo plazo, por lo que se plantea identificar el efecto de la terapia doble como linagliptina + metformina sobre la MI y su asociación con índices metabólicos, motivo de estudio en este protocolo.

5.7 Tabla de evidencia.

Se realizó una revisión sistemática, en la cual, de primera instancia, se hicieron combinaciones con las siguientes palabras MESH: (“Linagliptin” [MESH] AND Gut “Microbiota” [MESH]) búsqueda de la cual, no se obtuvieron resultados, por lo que se optó por buscar con las siguientes: (“Incretin drug” [MESH] AND “Gut Microbiota” [MESH] AND “Insulin Resistance” [MESH]), y (“Metformin” [MESH] AND “Gut Microbiota” [MESH] AND “Insulin Resistance” [MESH]).

Los estudios en relación a los fármacos antidiabéticos (metformina e incretinas) y microbiota intestinal se muestran a continuación en la **tabla 3**.

Autor	Tipo de estudio	Características de la población	Fármaco	Variable de desenlace	Análisis metodológico	Resultados	Limitaciones
Xinfe ng Yan et al, 2016 258	Ensayo pre-clínico (Clínico y meta genómica) con intervención de 20 semanas	15 ratas macho SD (Sprague Dawley), libras de patógenos. Sitagliptina (10mg/kg) VO por 12 semanas.	Sitagliptina (Inhibidor de DPP-IV)	Microbioma intestinal.	Pirosecuenciación 454 basada en el análisis de la amplificación de los genes bacterianos 16s rRNA V1 y V3, se utilizó QIIME para analizar los datos de la secuenciación.	<p>Diferencias en Microbioma:</p> <p>Firmicutes: OB vs NL (86.28% vs 66.24%, p<0.01). ST vs DB (63.19% vs 83.56%, p<0.01).</p> <p>Bacteroidetes: OB vs NL (12.16% vs 31.64%, p<0.01). ST vs DB (32.46% vs 16.06%, p<0.01).</p> <p>Tenericutes: OB vs NL (1.15% vs 0.61%, P<0.05) OB vs DB (1.15% vs 0.09%, P<0.01) ST vs DB (0.96% vs 0.09%, P<0.01)</p>	
Lin Wan g et al, 2016 260	Ensayo pre-clínico con intervención de 8 semanas	60 ratones Apo E machos de NC; NL, NS. H; HL, HS.	Liraglutida (Agonistas del receptor GLP-1) vs Saxagliptina (Inhibidores de la DPP-IV)	Microbioma Intestinal.	Se evaluaron los perfiles metabólicos y se realizó pirosecuenciación masiva del gen bacteriano 16S rRNA V1 y V3 de las heces fecales.	<p>Filotipos e hiperglucemia: <i>Proteobacteria</i> genero <i>Helicobacter</i> (p=0.001) clase <i>Betaproteobacteria</i> y genero <i>Oscillibacter</i> (p=0.041). <i>Clostridium</i> aumentó (0.005% vs 0.36%, p=0.004).</p> <p>Composición de la MI con Liraglutida (análisis LEfSe): Enriquecimiento de filotipos <i>Allobaculum</i> (p=0.004) y <i>turicibacter</i> (p=1.77e-8), familia <i>Erysipelotrichaceae</i>, género <i>anaerostipes</i> (p=5.51e-5) y <i>Blautia</i> (p=0.039), familia <i>Lachnospiraceae</i>, género <i>Lactobacillus</i> (p=0.013), familia <i>Lactobacillaceae</i>, género <i>Butyricimonas</i> (p=0.005), familia <i>Porphyromonadaceae</i>, género <i>Desulfovibrio</i> (p=0.008). Disminuyó <i>Clostridiales</i> (<i>Firmicutes</i>) y <i>Bacteroidales</i> (<i>Bacteroides</i>). <i>Candidatus Arthromitus</i> (p=7.17e-6), <i>Roseburia</i> (p=5.63e-6), <i>Marvinbryantia</i> (p=6.38e-5) y la familia <i>Lachnospiraceae</i>, género <i>Incertae Sedis</i> (p=1.43e-6), clase <i>Erysipelotrichia</i>.</p>	Datos no generados en modelos animales libres de gérmenes y muestras fecales no representativas de todo el intestino.

						Composición de la MI con Saxagliptina en hiperglucemia (análisis LEfSe): Incrementó <i>Firmicutes</i> género <i>Lactobacillus</i> ($p=0.023$) clase <i>Lactobacillaceae</i> y género <i>Allobaculum</i> ($p=0.017$) y <i>Turicibacter</i> ($p=0.001$) clase <i>Erysipelotrichaceae</i> . Disminuyó <i>Bacteroides</i> género <i>Bacteroides</i> ($p=0.003$) clase <i>Bacteroidaceae</i> género <i>Prevotella</i> ($p=0.018$) clase <i>Prevotellaceae</i> .	
Qian Zhan g et al, 2016 ²⁵⁹	Estudio para establecer relación o asociación	30 ratas macho Sprague – Dawley (SD), libres de patógenos. Divididas en 5 grupos, cada uno con 6 integrantes: NC, NC + HV, HFD + STZ, HFD + STZ + LV, HFD + STZ + HV	Vildagliptina (Inhibidor de la DPP-IV).	Cambios en el microbioma intestinal.	Se evaluaron los perfiles metabólicos y se realizó pirosecuenciación masiva del gen bacteriano 16S rRNA V1 y V3 de las heces fecales.	Cambios en MI en respuesta a Vildagliptina: OTU: HFD/STZ vs NC: menor diversidad microbiana en inducción a DM, $p<0.01$ HFD/STZ vs HFD/STZ + LV o HV: menos diversidad microbiana con Vildagliptina, $p<0.01$ Índice de Shannon: HFD/STZ vs HFD/STZ + LV o HV: menor diversidad microbiana con Vildagliptina, $p<0.01$ Índice de Chao: NC vs HFD/STZ: en DM la riqueza del MI fue menor, $p<0.01$. HFD/STZ vs HFD/STZ + LV o HV: riqueza similar entre grupos, $p<0.01$. Ratas HFD/STZ tenían $>Firmicutes$ y $<Bacteroidetes$ vs NC, $p<0.01$. Vildagliptina incrementó <i>Bacteroidetes</i> y disminuyó abundancia de <i>Tenericutes</i> y <i>Elusimicrobia</i> , $p<0.05$.	Tamaño de la muestra pequeño, potencia estadística baja para detectar diferencias significativas.
Qian Zhan g et al, 2017 ²⁶²	Ensayo pre-clínico (Clínico y metagenómica) con intervención de 12 semanas.	18 ratas machos Sprague – Dawley (SD), libres de patógenos. Divididas en 3 grupos: HFD + STD: n=6 HFD + STD +LV: n=6	Vildagliptina (Inhibidor de la DPP-IV).	Cambios en la estructura de la MI.	Se evaluaron los perfiles metabólicos y se realizó pirosecuenciación masiva del gen bacteriano 16S rRNA V3 y V4 de las heces fecales.	Cambios en la estructura del MI: Incrementó la riqueza del MI en ratas tratadas con vildagliptina, evaluado por índice de Chao; $p<0.01$. El tratamiento con vildagliptina redujo la abundancia relativa de <i>Tenericutes</i> y <i>Elusimicrobia</i> ; $P <0.05$. Géneros bacterianos y metabolismo de la glucosa: 9 géneros asociados con la disminución de los niveles de glucosa: <i>Ruminococcus</i> , <i>Lachnospiraceae</i> , <i>Prevotellaceae</i> , <i>Ruminiclostridium</i> , <i>Eubacterium</i> , <i>Lachnospira</i> . Los géneros asociados con un aumento en los niveles de glucosa en sangre fueron <i>Lachnospiraceae</i> , <i>Oscillibacter</i> , <i>Ruminococcaceae</i> , <i>Anaerovorax</i> , <i>Kurghia</i> , <i>Bilophila</i> , y <i>Anaerotruncus</i> ;	Tamaño de la muestra pequeño, potencia estadística baja para detectar diferencias significativas.

		HFD + STD + HV: n=6				<p>P <0.01.</p> <p>14 géneros asociados positivamente con los niveles de insulina en ayuno: <i>Parasutterella</i>, <i>Desulfovibrio</i>, <i>Christensenellaceae</i>, <i>Lachnospiraceae</i>, <i>Oscillibacteres</i>.</p> <p><i>Lachnospira</i> se correlacionó negativamente con glucosa en ayuno y HOMA-IR.</p> <p><i>Erysipelotrichaceae</i>, <i>Bacteroides</i> y <i>Lachnospira</i> incrementaron los ácidos grasos de cadena corta.</p>	
Qian Zhan g et al, 2018 ²⁶⁵	Ensayo pre-clínico (Clínico y meta genómica) con intervención de 12 semanas	18 ratas macho Sprague – Dawley (SD), libres de patógenos. Divididos en 3 grupos: 1) estándar, 2) liraglutida 0.2mg/kg/día y 3) 0.4mg/kg/día	Liraglutida (Agonistas del receptor GLP-1).	Cambios en microbio ma intestinal.	Se evaluaron los perfiles metabólicos y se realizó pirosecuenciación masiva del gen bacteriano 16S rRNA V3 y V4 de las heces fecales.	<p>Cambios taxonimicos:</p> <p>Disminuyó la relación F/B y abundancia de <i>tenericutes</i> (p<0.01). 11 bacterias mostraron una diferencia estadística entre el grupo de liraglutida 0.4 y el grupo diabético (P <0.05). <i>ThegeneraFlavonifactor</i> (P <0.05), géneros <i>Lachnoclostridium</i> (P <0.01), especies <i>Ruminococcus_gnavus</i> (P <0.05), especies <i>Flavonifactor_plautii</i> (P <0.05) y una especie <i>Bacteroides_acidifaciens</i> (P <0.05) grupo. Las bacterias reducidas se encontraban principalmente en la familia. <i>Christensenellaceae</i> (P <0.01), géneros <i>Christensenellaceae</i> (P <0.01), los géneros <i>Ruminococcaceae</i> (P <0.001), los géneros <i>Ruminoclostridium</i> (P <0.01), los géneros <i>Prevotella</i> (P <0.01).</p>	Tamaño de la muestra pequeño, potencia estadística baja para detectar diferencias significativas.
Elberle et al, 2018 ²⁶⁴	Estudio exploratorio.	18 sujetos sanos con tratamiento con metformina 850mg cada 12 horas por 7 días. Muestras de heces en el tiempo 0, a las 24 hrs y a los 7 días de tx.	Metformina (Biguanida).	Composición del microbio ma intestinal.	La composición taxonómica del microbioma intestinal se analizó mediante secuenciación masiva paralela del gen 16S rRNA (región V3).	<p>La metformina reduce la diversidad interna de la MI desde la tercera toma, cambio estadísticamente significativo p = 0.02.</p> <p>La abundancia de patógenos <i>Escherichia-Shigella</i> incrementó al tercer día (MO= 0.14%, M24hrs= 0.46%, M7d= 1.04%).</p> <p>La metformina aumentó <i>Akkermancia</i> M0 vs. M7d (p = 0.03) y M24 vs. M7d (p = 0.01).</p> <p>Una semana de tratamiento con metformina se asoció con disminuciones significativas en las familias <i>Peptostreptococcaceae</i> y <i>Clostridiaceae</i> y cuatro géneros dentro de estas familias: <i>Peptostreptococcaceae</i> (familia <i>Peptostreptococcaceae</i>), <i>Clostridiaceae</i> (familia <i>Clostridiaceae</i>), <i>Asaccharospora</i> (familia <i>Peptostreptococcaceae</i>) y <i>Romboutsia</i> (familia <i>Peptostreptococcaceae</i>).</p>	Presencia de eventos adversos gastrointestinales (diarrea) en un 83.3% de la población estudiada.

Wei Ma et al, 2018 ²⁶⁷	Ensayo pre-clínico (Clínico y meta genómica) con intervención de 30 días.	19 ratones sanos C57BL / 6 se separaron en dos grupos: 9 controles y 10 en intervención con metformina (300mg/kg/día).	Metformina (Biguanida).	Composición del microbioma intestinal.	La composición taxonómica del microbioma intestinal se analizó mediante secuenciación masiva paralela del gen 16S rRNA (región V3).	De 46 bacterias estudiadas, se encontró diferencia estadísticamente significativa en: 22 bacterias enriquecidas y 24 bacterias agotadas. A nivel de clase, <i>Verrucomicrobiaceae</i> , <i>Prevotellaceae</i> , <i>Porphyromonadaceae</i> , <i>Rikenellaceae</i> aumentan, mientras que <i>Lachnospiraceae</i> , <i>Rhodobacteraceae</i> disminuyen.	Estudio no terminado, análisis de la mitad de la muestra.
Rosa Rio D et al, 2018 ²⁵⁴	Modelado metabólico a escala genómica	<i>Escherichia</i> sp., <i>A. muciniphila</i> , <i>S. variable</i> y <i>I bartlettii</i> .	Metformina (Biguanida).	Redes metabólicas de las bacterias a escala genómica.	Reconstrucciones AGORA (Assembly of Gut Organisms through Reconstruction and Analysis) GEM	<i>Akkermansia muciniphila</i> mostró alteraciones importantes de vía celular en respuesta a las reacciones esenciales, incluyendo la síntesis de N-glicano, exclusivo para esta bacteria. La biosíntesis de LPS y el metabolismo de los nucleótidos de la glucosa fueron vías metabólicas altamente perturbadas en <i>A. muciniphila</i> y <i>Escherichia</i> sp., Pero no en <i>S. variable</i> . <i>I. bartlettii</i> mostraron alteraciones sustanciales (> 50%) en el metabolismo del propionato, fenilalanina, alanina, pero sin cambios en la degradación del cloroalcano y el cloroalqueno, una vía metabólica exclusiva de la especie.	Reconstrucción metabólica de 4 bacterias.
De la Cuesta – Zuluga et al, 2017 ²⁴³	Estudio Transversal	28 sujetos con diagnóstico de DM2 divididos en 2 grupos: 14 sujetos con tx de Metformina y 14 sujetos	Metformina (Biguanida)	Composición de Microbioma Intestinal.	Se evaluaron los perfiles metabólicos y se realizó pirosecuenciación masiva del gen bacteriano 16S rRNA específicamente	Microbioma Intestinal: DM + Metformina vs DM sin Metformina, 0.055 DM + Metformina vs NG, p= 0.036 DM sin Metformina vs NG, p= 0.943 DM2 + Metformina vs DM2 sin Metformina (composición): <u>Degradadores de mucinas:</u> <i>Akkermansia Muciniphila</i> , p= 0.003. <i>Butyrivibrio</i> , p=0.08.	Falta información sobre dosis y tiempo de consumo del tx farmacológico.

		con otro tratamiento diferente a Metformina.			ente de la variante V4 de las heces fecales.	<u>Productores de Butirato:</u> <i>Roseburia</i> , p=0.23 <i>Subdoligranulum</i> , p=0.97 <i>Faecalibacterium</i> , p=0.47	Tamaño de la muestra pequeño.
Na-Ri Shin et al, 2014 ²⁴²	Estudio para establecer asociación.	24 ratones C57BL/6 de 4 semanas de edad. 1)NCD-CT, 2) NCD-Met, 3) HFD-CT, 4) HFD-Met Metformina 300mg/kg/día, 6 semanas.	Metformina (Biguanida)	<u>Histología</u> : Número de células calciformes por vellosidades intestinales. Cuantificación de <i>Akkermansia muciniphila</i>.	Para el análisis de la composición del MI se evaluaron los perfiles metabólicos y se realizó pirosecuenciación masiva del gen bacteriano 16S rRNA en las variantes V1 – V3 de las heces fecales.	Efecto de la Metformina sobre la composición e I MI: HDF-CT mayor abundancia de <i>Firmicutes</i> p<0.001 y menor abundancia de <i>Bacteroidetes</i> p<0.001 vs ratones NCD-CT. HDF-CT menor abundancia de <i>Verrucomicrobia</i> p<0.001 vs NCD-CT. Incremento del número de células calciformes con Metformina: El número de células calciformes es menor en HFD-CT (6.6±0.3) vs NCD-CT (7.8±0.2). NCD-Met (9.1±0.2) vs HFD-Met (9.5±0.5), p<0.004 El número de células calciformes correlacionan (+) con abundancia de <i>Akkermansia muciniphila</i> , Pearson r=0.4996 y p<0.02.	Tamaño de la muestra pequeño, potencia estadística baja para detectar diferencias significativas.
Heetae Lee et al, 2014 ²⁶¹	Estudio para establecer asociación.	41 ratones machos y hembras (C57BL/6) de 4 semanas de edad. 1) ND, 2) ND-Met, 3) HFD, 4) HDF-ND, 5) HFD-Met	Metformina (biguanida).	Cambios en Microbioma intestinal. Cuantificación de <i>Akkermansia muciniphila</i>	<u>Microbioma intestinal:</u> Se evaluaron los perfiles metabólicos y se realizó pirosecuenciación masiva del gen bacteriano 16S rRNA (V1-V3).	Microbioma intestinal: La diversidad de la MI fue significativamente mayor en grupos HFD – Met y ND-Met p<0.05. Abundancia relativa de la MI después de la metformina; <i>Bacteroidetes</i> en HFD (43.79%± 22.35%) fue significativamente más bajo vs ND (79.40% ± 10.00%), p>0.05. cuando la metformina se administró al grupo HFD <i>Bacteroidetes</i> aumentó (77.45% ± 8.73%) similar al grupo ND y <i>Verrucomicrobia</i> (12.44% ± 5.26%) en el HFD-Met. En el grupo HFD-Met incrementó la abundancia de las familias <i>Bacteroidaceae</i> , <i>Verrucomicrobiaceae</i> , <i>Clostridiales</i> , <i>Akkermansia muciniphila</i> y <i>Clostridium colcleatum</i> .	Periodo corto de tiempo para determinar la asociación

		*HFD-akk.			<u>Akkermansia Muciniphila:</u> Cuantificación por PCR cuantitativa.	<i>Akkermansia Muciniphila:</i> Se enriqueció en el grupo HFD-Met 14.3% ± 2.6% y correlacionó negativamente con los niveles de glucosa sérica. En tratamiento con metformina con dieta HFD redujo significativamente la expresión de TNF-α p=0.001 en hembras y aumento MCP-1 p=0.001 en machos.	
--	--	-----------	--	--	---	--	--

OB: obesidad, **NL:** Normotolerantes, **ST:** Sitagliptina, **NC:** Normogluemia Control, **NL:** Normogluemia + Liraglutida 0.4mg/kg/día, **NS:** Normogluemia + Saxagliptina 10mg/kg/día, **HC:** Hipergluemia Control, **HL:** Hipergluemia + Liraglutida 0.4mg/kg/día, **HS:** Hipergluemia + Saxagliptina 10mg/kg/día, **NC + HV:** NTG + vildagliptina 0.02gr/kg/día, **HFD:** dieta alta en grasa, **HFD + STZ:** dieta alta en grasa + Estreptozotocina 30mg/kg, por 4 semanas, **HFD + STZ + LV:** Ratas DM + vildagliptina Ratas DM + Vildagliptina 0.02gr/kg (12 semanas), **ND:** No inducidos a diabetes, **ND-MET:** No inducidos a diabetes con Metformina, **HDF-ND:** dieta alta en grasa y no inducidos a diabetes, **HFD-Met:** dieta alta en grasa y tratamiento con metformina.

Tabla 3. Tabla de evidencia.

III. Planteamiento del problema

El creciente incremento en la prevalencia de prediabetes y DM2 a nivel mundial, enfatiza una urgente necesidad de desarrollar estrategias de prevención y tratamientos más eficientes que permitan sumar esfuerzos preventivos para evitar el desarrollo de la DM2. Por tanto, en nuestro laboratorio generamos estrategias de prevención en las etapas tempranas de la DM2 con el uso de linagliptina + metformina. Las terapias dobles y las monoterapias han demostrado que los efectos reductores de la glucosa por los fármacos antidiabéticos están mediados por cambios en la composición y función del MI en animales de experimentación. Para este efecto se han establecido algunos mecanismos o vías que incluyen; recirculación de ácidos biliares, incremento en la producción de AGCC y en la secreción de GLP-1, disminución de la permeabilidad de la mucosa intestinal y la endotoxemia metabólica. Sin embargo, de acuerdo a la evidencia generada en los estudios anteriores, aún no están claros los mecanismos precisos por los cuales los cambios generados en el MI contribuyen a la homeostasis de la glucosa a través de los fármacos antidiabéticos, si es diferente el efecto entre estos e incluso si su efecto se mantiene a largo plazo.

En consecuencia, se requiere evaluar en humanos los resultados encontrados en estos estudios y conocer los mecanismos y vías fisiológicas por las cuales la MI participa como variable mediadora incrementando la sensibilidad a la insulina. Entendiendo entonces la interacción bidireccional fármaco antidiabético – MI, y como esta influye en los resultados clínicos se puede allanar el camino para desarrollar estrategias de próxima generación para la etapa temprana de la DM2.

IV. Justificación

La DM2 es una enfermedad de alta prevalencia en el mundo, todos los datos indican que seguirá incrementando a mediano y largo plazo. Esta patología consume un porcentaje elevado del gasto en salud en México debido a las complicaciones crónicas y agudas, incapacidad en edad productiva y morbimortalidad cardiovascular. Resulta fundamental intervenir e invertir en la etapa previa a la DM2, en donde es posible reducir el riesgo de desarrollo de la enfermedad, complicaciones micro y macrovasculares, e incluso mortalidad global.

En la actualidad el diagnóstico de la enfermedad se realiza en etapas avanzadas de la enfermedad, por lo que las mejores estrategias para su tratamiento serán todas aquellas dirigidas a las etapas tempranas de la enfermedad, las cuales pueden ser reversibles. La evidencia acumulada reporta efecto sobre la composición del MI en modelo animal, incrementando el número de bacterias asociadas al fenotipo de normoglucemia, y la diversidad bacteriana, entre estas las bacterias productoras de ácidos grasos de cadena corta, las cuales favorecen el efecto incretina mejorando la sensibilidad a la insulina y secreción de insulina. Por tanto, el propósito fundamental de este estudio fue identificar el efecto del inhibidor de DPP-4 y la metformina en el MI de pacientes con prediabetes, y si la MI modificada por acción de los fármacos favorece el aumento de la secreción de insulina, en tal caso se evidenciaría la relación entre estos componentes y las alteraciones que ocurren en el metabolismo de la glucosa en la prediabetes.

Comprobar en humanos el restablecimiento de la disbiosis por los fármacos antidiabéticos permitirá establecer la información necesaria para contribuir con la identificación de los mecanismos fisiológicos, y estrategias preventivas, a fin de generar estrategias terapéuticas optimizadas para reducir el riesgo de desarrollar DM2.

V. Preguntas de investigación

¿Cuál es el efecto de la Linagliptina + Metformina en comparación con Metformina sola sobre la composición del microbioma intestinal en pacientes con prediabetes sin tratamiento (basal) y comparado con metformina y linagliptina + metformina durante 12 meses?

¿Cuál es la relación de la composición del microbioma intestinal con la resistencia a la insulina y la secreción de insulina en pacientes con prediabetes en tratamiento con Linagliptina + Metformina en comparación con Metformina y pacientes sin tratamiento (basal) durante 12 meses?

VI. Hipótesis

- 1) Existe diferencia del 0.25 (tamaño del efecto por d de Cohen) en la composición del microbioma intestinal en pacientes con prediabetes tratados con linagliptina + metformina en comparación con monoterapia de metformina durante 12 meses. 2) Los cambios en el microbioma intestinal reducirán la resistencia a la insulina e incrementarán la secreción de insulina en pacientes con prediabetes de acuerdo al tratamiento: linagliptina + metformina > monoterapia de metformina > sin tratamiento (condición basal).

Precisando las dos hipótesis planteadas, se expresan a continuación:

Si la composición del microbioma intestinal es 0.25 (tamaño del efecto por d de Cohen) diferente en pacientes con prediabetes tratados con linagliptina + metformina vs la monoterapia de metformina, y esta composición a su vez reduce la resistencia a la insulina e incrementa la secreción de insulina entonces se observará la relación del microbioma-fármacos antidiabéticos y los cambios que ocurren en el metabolismo de la glucosa en estos pacientes. Además, a mayor

diversidad y abundancia de las bacterias en el intestino (phylos y géneros bacterianos) asociadas a homeostasis de glucosa, el índice de resistencia a la insulina disminuirá y el de secreción de insulina aumentarán de acuerdo al tratamiento, en el siguiente gradiente: linagliptina + metformina > monoterapia de metformina > sin tratamiento (condiciones basales).

La reducción del índice de resistencia a la insulina y el incremento en el índice de secreción de insulina se podrán expresar como una función lineal de la diversidad y abundancia de phylos y géneros de bacterias en el intestino asociadas a normogluceemia. Esto sugerirá que se trata de un efecto aditivo simple al tratamiento de linagliptina + metformina.

Lo anterior se puede expresar con las siguientes ecuaciones conceptuales:

$$\begin{aligned} \textit{Composición del microbiomaintestinal} = & \alpha + \beta_1(\textit{tratamiento farmacológico}) + \\ & \beta_2 (\textit{AGG+ITG}) + \\ & \beta_3 ((\textit{tratamiento farmacológico}) (\textit{AGG+ITG})) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \textit{RI y SI} = & \alpha + \beta_1(\textit{tratamiento farmacológico}) + \\ & \beta_2(\textit{Composición del microbioma intestinal}) + \beta_3 (\textit{AGG + ITG}) + \beta_4 ((\textit{tratamiento} \\ & \textit{farmacológico}) (\textit{AGG + ITG})) \end{aligned}$$

Donde α y β son los parámetros de las funciones lineales que explican la composición del MI, RI y la secreción de insulina.

VII. Objetivos del estudio

Objetivo general

Determinar el efecto de la Linagliptina + Metformina en comparación con Metformina sola sobre la composición del microbioma intestinal en pacientes con prediabetes sin tratamiento (basal) y comparado con metformina y linagliptina + metformina durante 12 meses.

Determinar la relación de la composición del microbioma intestinal con la resistencia a la insulina y la secreción de insulina en pacientes con prediabetes en tratamiento con Linagliptina + Metformina en comparación con Metformina y pacientes sin tratamiento (basal) durante 12 meses.

Objetivos específicos

- Determinar y comparar el perfil taxonómico del microbioma intestinal en pacientes con prediabetes sin tratamiento (basal) y comparado con metformina y linagliptina + metformina durante 12 meses.
- Identificar y cuantificar el efecto de la Linagliptina + Metformina en comparación con Metformina sola y pacientes con prediabetes sin tratamiento (basal) sobre la composición del microbioma intestinal durante 12 meses.
- Correlacionar la composición del microbioma intestinal con la resistencia a la insulina y la secreción de insulina en pacientes con prediabetes en tratamiento con Linagliptina + Metformina en comparación con Metformina y pacientes sin tratamiento (basal) durante 12 meses.

VIII. Material y métodos

A. Diseño del estudio

El presente estudio se encuentra clasificado desde una perspectiva Feinsteiniana de arquitectura metodológica como: comparativo, de intervención, longitudinal, y prolectivo.

- Por su objetivo: Comparativo, se analizó la composición del microbioma intestinal en dos grupos de intervención con diferentes tratamientos farmacológicos Linagliptina 2.5 mg + Metformina 850 mg cada 12 horas y Metformina 850 mg cada 12 horas y en comparación con el grupo sin intervención farmacológica (condición basal).
- Por asignación de la maniobra: Experimental por asignación aleatoria de la maniobra.
- Por temporalidad: Longitudinal, se siguieron a los pacientes durante 12 meses, y las variables fueron registradas en 3 ocasiones incluyendo la composición del microbioma intestinal.
- Fuente de recolección de datos: Prolectivo, la información se recolectó directamente de la muestra, de acuerdo a los criterios establecidos y para lograr los fines específicos de la investigación.

Desde una perspectiva de clasificación clásica se define como ensayo clínico aleatorizado de dos grupos en paralelo.

B. Tamaño de la muestra

El tamaño de la muestra se calculó con GPower versión 3.1, se hizo un análisis de ANOVA que consideró medidas repetidas, 2 grupos efectivos, 3 mediciones, y tamaño del efecto de 0.25, con error β del 20%, lo que dio un total de 48 pacientes

a incluir, más el 20%, se incluyeron **167** sujetos necesarios de acuerdo al cálculo. (Figura 5).

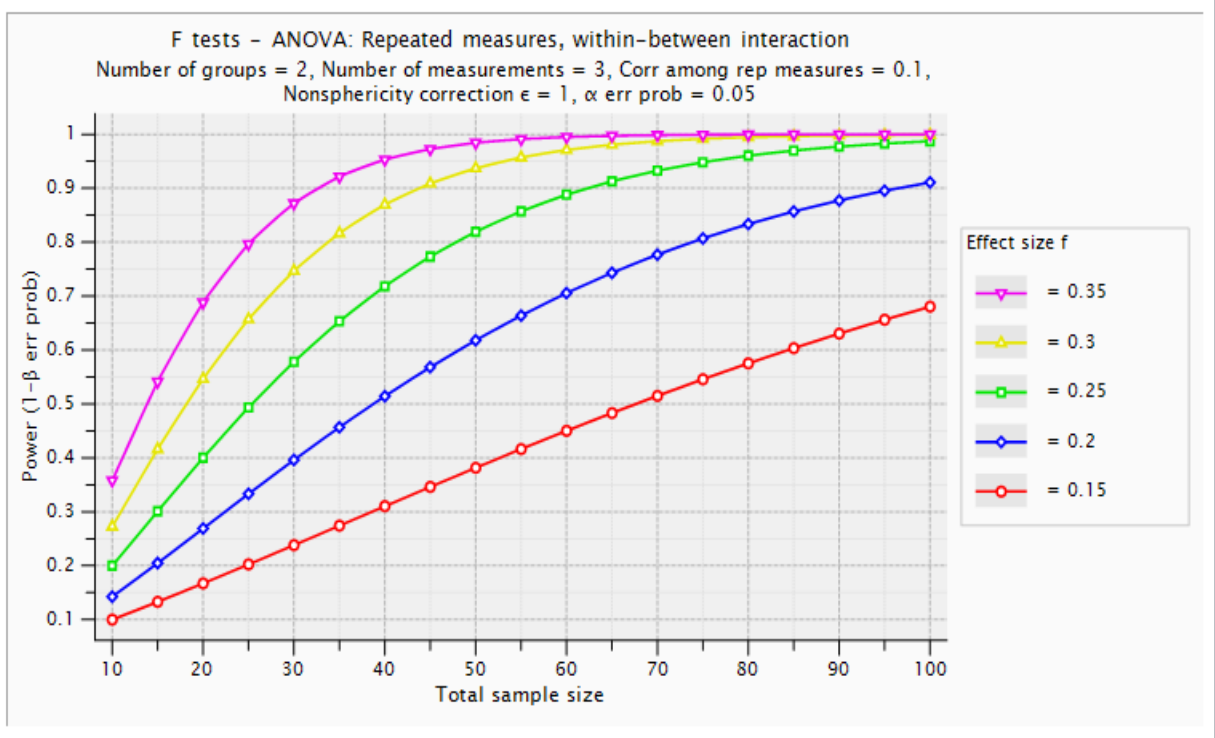


Figura 5. Tamaño de la muestra en función de la potencia estadística para un análisis de ANOVA.

C. Universo de trabajo

- **Universo de estudio:** Pacientes mexicanos con prediabetes (GAA + ITG).
- **Población de estudio:** Pacientes mexicanos con prediabetes del estado de Guanajuato.
- **Lugar de realización:** Hospital Regional de Alta Especialidad del Bajío, División de Ciencias de la Salud de la Universidad de Guanajuato, León, Gto e Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), Ciudad de México, México.

D. Criterios de selección

Los pacientes incluidos en este estudio fueron parte de un estudio de prevención de diabetes "PRELLIM". PRELLIM fue un ensayo clínico aleatorizado doble ciego de grupos en paralelo diseñado para evaluar el efecto de la combinación de linagliptina + metformina + cambio en el estilo de vida en comparación con monoterapia de metformina + cambio en el estilo de vida en el metabolismo de la glucosa, RI, y función de la célula β pancreática (ClinicalTrials.gov número, NCT03004612).

- Criterios de inclusión

- Mujeres y hombres de 18 a 65 años de edad.
- Pacientes con prediabetes, definida ésta por la coexistencia de glucosa alterada (GAA = glucosa de ayuno entre 100 y 125 mg/dl) e intolerancia a la glucosa (ITG = glucosa a las 2 hrs en la CTOG entre 140-199 mg/dl).
- Que aceptaron participar en el estudio y firmaron la carta de consentimiento informado.

- Criterios de exclusión

- Pacientes con DM2 diagnosticada previamente o detectada durante la toma de muestras y realización de la CTOG.
- Personas en tratamiento actual o durante los últimos 3 meses con metformina, pioglitazona, o cualquier otro fármaco antidiabético, incluyendo insulina.
- Creatinina sérica >1.6 mg/dl.
- Hipertrigliceridemia >500 mg/dl.
- Mujeres embarazadas.
- Hipertensión arterial descontrolada (sistólica >180 mmHg o diastólica >105 mmHg).
- Ingesta excesiva de alcohol, aguda o crónica.

- Consumo de antibióticos, inhibidores de la bomba de protones o probióticos de grado farmacéutico durante los últimos dos meses.
- Medicamentos o condiciones médicas que afectan la homeostasis de la glucosa (tiazidas, betabloqueadores, glucocorticoides de uso sistémico, fármacos reductores de peso o anorexigénicos, síndrome de Cushing, Tirotoxicosis).

- **Criterios de eliminación**

- Intolerancia al medicamento utilizado.
- Inasistencia a más del 20 % de las citas del seguimiento.
- Paciente con muestra de heces que no se recupere DNA.
- Que no finalicen el protocolo de estudio y seguimiento por cualquier causa.

E. Operacionalización de variables

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Instrumento	Categorías	Escala de medición	Unidad de medición
Variable Independiente						
Intervención Tratamiento farmacológico	Estrategia terapéutica cuya finalidad es evitar las alteraciones en el metabolismo de la glucosa y la progresión a DM2.	A= Cuando los pacientes recibieron linagliptina 2.5 mg + metformina 850 mg cada 12 horas, antes de los alimentos durante 12 meses. B= Cuando los pacientes recibieron metformina 850 mg cada 12 horas después de los alimentos por 12 meses.	Correlación con microbioma intestinal, mediante secuenciación.	A: Linagliptina 2.5 mg + Metformina 850 mg cada 12 horas por 12 meses. B: Metformina 850 mg cada 12 horas por 12 meses.	Cualitativa Nominal	mg/día
Variable Dependiente						
Resistencia a la insulina	Es un proceso caracterizado por una respuesta disminuida en los tejidos periféricos;	El cálculo está basado en la relación entre los valores de glucosa e insulina basal sobre un valor constante.	Valores séricos de glucosa e insulina en ayuno.	RI se diagnosticó cuando el resultado del índice sea mayor a 1.0.	Cuantitativa continua	

	adiposo, muscular y hepático, a las acciones biológicas de la insulina. Generando un incremento compensatorio de la secreción de insulina por las células β del páncreas para mantener la normalidad de los niveles de glucemia ²⁶⁶ .	HOMA- IR: = [Insulina en ayuno (UI/ml)] x [Glucosa en ayuno (mmol/L)]/22.5	La insulina se midió por medio del RIA para la insulina humana. La glucosa de ayuno se determinó por medio del método de Glucosa oxidasa.			
Sensibilidad a la Insulina	Menor eficiencia biológica de la insulina al actuar sobre sus diversos órganos blanco, existiendo varias causas atribuibles a la misma hormona o al comportamiento de su receptor o receptores específicos ²⁶⁷ .	Índice de Matsuda: la sensibilidad a la insulina durante una sobrecarga oral de glucosa refleja aproximadamente y de forma equitativa la supresión de la producción de glucosa hepática y la captación de glucosa por los tejidos periféricos, mayor fue el incremento de la glucosa, y la sensibilidad global a la insulina, y esta fue inversamente proporcional al producto de los promedios aritméticos de la glucosa y la insulina en la sobrecarga de glucosa ²⁶⁸ . ISI= 10,000 ÷ $\sqrt{[(IPA * GPA) * (xGPC * xIPC)]}$	Curva de tolerancia oral a la glucosa (75gr). La insulina se midió por medio del RIA para la insulina humana. La glucosa de ayuno se determinó por medio del método de Glucosa oxidasa.	Se determinó RI cuando el resultado del índice fue menor a 2.5.	Cuantitativa continua	
Función de las células β del páncreas (HOMA-B)	Modelo matemático utilizado para valorar la funcionalidad de las células B del páncreas.	El cálculo está basado en la relación entre los valores de glucosa e insulina basal, valorando el balance entre la producción hepática de glucosa y la secreción de insulina. HOMA-B= 20 X Insulina en ayuno (μUI/ml) / (glucosa en ayuno(mmol/L)-3.5)	Curva de tolerancia oral a la glucosa (75 gr). La insulina se midió por medio del RIA para la insulina humana. La glucosa de ayuno se determinó por medio del método de Glucosa oxidasa.	Secreción de insulina alterada cuando el valor se clasificó por debajo del percentil 25 en las tablas para HOMA-B de la Universidad de Oxford.	Cuantitativa continua. Cualitativa ordinal	mmol/L

Respuesta aguda a la insulina (AIR)	Determina la capacidad de la célula β del páncreas para secretar insulina suficiente y mantener los niveles de glucosa normales.	Valor que se obtiene con los valores de glucosa e insulina durante la CTOG con la siguiente fórmula: $IDOI = ((1/insulina) / ((\Delta I_{0-30}) / (\Delta G_{0-30})))$	Curva de tolerancia oral a la glucosa (75 gr). La insulina se determinó por medio del RIA para la insulina humana. La glucosa de ayuno se determinó por medio del método de Glucosa oxidasa.		Cuantitativa continua	Pmol/mmol
Índice de disposición durante la curva de tolerancia oral a la glucosa	Determina la capacidad de la célula β del páncreas para secretar insulina suficiente y mantener los niveles de glucosa normales.	Se obtuvo utilizando los valores de glucosa e insulina de la CTOG mediante la aplicación de la siguiente fórmula: $((Matsuda) / ((IncAUCG0-120) / (IncAUCI0-120)))$	Curva de tolerancia oral a la glucosa (75 gr). La insulina se determinó por medio del RIA para la insulina humana. La glucosa de ayuno se determinó por medio del método de Glucosa oxidasa.		Cuantitativa continua	Pmol/mmol
Microbioma Intestinal	Población total de microorganismos con sus genes y metabolitos que colonizan el intestino humano.	Se obtuvo a través de la extracción del DNA bacteriano de heces de los pacientes, amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA de la variante 3 y 4. Además, se aplicaron diferentes análisis bioinformáticos para reconstruir redes metabólicas que permitieron integrar en el fenotipo metabólico y datos generados de la tecnología de alto rendimiento (metagenoma).	Mediante análisis de datos de secuenciación masiva para comunidades microbianas con el paquete especializado QIIME , con el cual se obtuvo la similitud y divergencia entre los grupos e identificaron las comunidades taxonómicas representativas en cada uno. Reconstrucción metabólica y modelado computacional de las redes metabólicas y su análisis funcional del metabolismo	Cuantitativa: Se determinó con el número de microorganismos presentes por muestra y su correlación con variables biológicas. Número de OTUs e índices de diversidad y riqueza. Cualitativa: Se determinó como presencia o ausencia de microorganismos en la muestra.	Cuantitativa continua Cualitativa nominal	

			en la comunidad de microorganismos seleccionados. Se obtuvo la diferencia entre poblaciones estudiadas.			
Variable Antecedente						
Edad	Tiempo vivido desde el nacimiento de una persona.	Se consideraron los años cumplidos en la medición basal del estudio.			Cuantitativa discreta	Años cumplidos
Sexo	Conjunto de características biológicas, físicas, fisiológicas y anatómicas de los seres humanos que los definen como hombre y mujer.	Se clasificó de acuerdo a las características fenotípicas de ambos sexos.			Cualitativa nominal	Hombre Mujer
Peso	Masa corporal total de un individuo.	El sujeto se situó de pie en el centro de la plataforma de la báscula distribuyendo el peso por igual en ambas piernas, sin que el cuerpo esté en contacto con nada que haya alrededor. Con vejiga vacía, en ayuno y con el mínimo de ropa.	TANITA modelo BC – 568 (Inner Body Composition Monitor) marca SECA®.		Cuantitativa continua	Kg
Estatura	Longitud considerada desde la planta del pie hasta el vértice de la cabeza.	El sujeto fue medido de pie y descalzo, completamente derecho con la cabeza posicionada de acuerdo al plano de Frankfurt. Los pies deben estar juntos, las rodillas derechas; los tobillos, las nalgas y la parte trasera de los hombros deben estar en contacto con la superficie vertical del estadiómetro.	Estadímetro (SECA®)		Cuantitativa continua	Metros
Variables a Controlar						
Cumplimiento del plan de alimentación	Estrategia destinada a asegurar una adecuada disponibilidad, consumo y utilización biológica de los alimentos a fin de satisfacer las necesidades alimentarias y	Se proporcionó un plan de alimentación mensual al paciente, para controlar la ingesta de alimentos asociados a la modificación del microbioma intestinal.	Encuesta “sistema de nutrimentos” (SNUT)		Cuantitativa continua.	Kcal, gr y % de macronutrientes y (mg, mcg, gr) micronutrientes ingeridos.

	nutricionales de la población.					
Actividad física	Se considera actividad física cualquier movimiento corporal producido por los músculos esqueléticos que exija gasto de energía.	Se hizo recomendación de actividad física considerando: 150 min semanales de actividad aeróbica leve. O bien a través del registro en METs/min/semana.	Cuestionario internacional IPAQ.	2 categorías: Baja. No registran actividad física o la registra, pero no alcanza las categorías media y alta. Media. * 3 o más días de actividad física vigorosa por lo menos 20 min por día. Alta. * 3 o más días de actividad física vigorosa o que acumulen 1.500 METs-min-semana.	Cualitativa ordinal	METs/min/semana
Ingesta de antibióticos	Son un grupo heterogéneo de sustancias con diferente comportamiento farmacocinético y farmacodinámico, ejercen una acción específica sobre alguna estructura o función del microorganismo, tienen elevada potencia biológica actuando a bajas concentraciones y la toxicidad es selectiva, con una mínima toxicidad para las células de nuestro organismo ²⁶⁹ .	Se preguntó a los sujetos en los meses 0, 6 y 12 de seguimiento al llevar la muestra de heces si consumió fármacos antibióticos en los últimos 3 meses; si la respuesta es sí, se indaga sobre el tipo, dosis, tiempo y frecuencia de consumo, posteriormente se anotó en la base de datos. Con esta información se determinó la pertinencia del uso de la muestra de heces para extracción de ADN, en base al tipo, tiempo de uso y cantidad ingerida.	Se registró la información en el expediente del sujeto y en la base de datos.	Antibióticos de amplioespectro Antibióticos de bajo espectro	Cualitativa nominal Cuantitativa continua	Si o no gr/día durante cuánto tiempo.

Tabla 4. Operacionalización de variables.

Especificación de las variables:

- **Variables dependientes:** Resistencia a la Insulina, secreción de Insulina (función de las células β del páncreas) y Microbioma Intestinal.
- **Variable independiente:** Intervención (tratamiento farmacológico).
- **Variables antecedentes:** edad, sexo, peso, estatura.

- **Variables a controlar:** plan de alimentación, actividad física e ingesta de antibióticos.

Nota: El microbioma intestinal se consideró variable dependiente para responder a la primera pregunta de investigación e independiente para dar solución a la segunda pregunta.

F. Duración del estudio

La duración total del estudio fue de 4 años. Incluyó la etapa clínica (aprobación de protocolos por parte de los Comités de Ética e Investigación del Hospital Regional de Alta Especialidad del Bajío), etapa de reclutamiento de pacientes (reclutamiento y seguimiento de pacientes), extracción de ADN en heces fecales, amplificación del gen 16s rRNA, secuenciación, análisis bioinformático del microbioma, análisis estadístico (variables clínicas y MI) y la redacción de informes finales, presentación de carteles en congresos nacionales e internacionales, así como la publicación de dos artículos en revistas indexadas.

G. Descripción detallada del estudio

Etapa 1: Identificación de sujetos candidatos.

Esta primera etapa se realizó en colaboración con los departamentos de Endocrinología, Diabetes, Obesidad y Nutrición del HRAEB. Durante esta fase inicial se identificaron a los pacientes candidatos con por lo menos dos factores de riesgos para DM2. Aquellos que cumplan con este criterio fueron invitados al screening del estudio, y como primer paso contestaron una encuesta de salud que incluyó la evaluación de factores biológicos (actividad física, alimentación, toxicomanías, factores de riesgo para enfermedades cardiometabólicas, etc),

psicológicos (calidad de vida, depresión, patrones de conducta, etc), y sociales (ambiente familiar, laboral, violencia intrafamiliar, tipo de familia, etc). Para dicha encuesta se utilizaron cuestionarios ya validados y utilizados en el estudio de Cohorte del Personal de la salud que se realizó en la Universidad Autónoma del Estado de México y en el estado de Morelos, por las unidades de Investigación Epidemiológica y en Servicios de Salud del IMSS²⁷⁰.

Etapas 2: Reclutamiento de pacientes.

Posterior a responder la encuesta para identificar a la población con factores de riesgo (2 o más factores, incluyendo la raza), aquellos que cumplieron con los criterios fueron invitados a continuar a la fase de escrutinio; en donde, se realizó una medición de glucosa en ayuno y sólo a los pacientes que tuvieron un nivel de glucosa igual o mayor a 100 mg/dl, se les realizó una Curva de Tolerancia Oral a la Glucosa (CTOG) para determinar la presencia de prediabetes.

La CTOG se realizó con 75 gr de glucosa anhidra, se tomó una muestra basal previa a la ingesta de glucosa y posterior a los 30, 60, 90 y 120 minutos en ayuno de 8 a 12 horas y se obtuvieron valores de glucosa e insulina. Como se indica en los criterios de selección, los pacientes que sean diagnosticados con DM2 durante esta prueba no fueron incluidos en el estudio. En cambio, de acuerdo a los valores de glucosa durante la carga oral a las 2 horas de la carga oral, los sujetos fueron clasificados como:

- 1) Normoglucémicos y Normotolerantes a la glucosa: cuando los valores de glucosa en ayuno fueron menores a 100 mg/dl, y a los 120 minutos durante la CTOG sean <140 mg/dl.
- 2) Pacientes con Glucosa de ayuno alterada (GAA): Cuando los valores de glucosa en ayuno estuvieron entre 100-125 mg/dl y a las 2 hrs de la CTOG sean menores a 140 mg/dl.

- 3) Pacientes con intolerancia a la glucosa (ITG): cuando los valores de glucosa a los 120 minutos durante la CTOG estuvieron entre 140 y 199 mg/dl.
- 4) Pacientes con GAA + ITG: Cuando la glucosa en ayuno estuvo entre 100-125 mg/dl y a las 2 hrs de la CTOG estuvieron entre 140-199 mg/dl.
- 5) Pacientes con DM2: cuando los valores de glucosa en ayuno fueron mayores a 125 mg/dl y a los 120 minutos durante la CTOG sean ≥ 200 mg/dl.

Los pacientes con glucosa de ayuno entre 100 – 125 mg/dl e intolerancia a la glucosa en la CTOG fueron invitados a participar en el protocolo. Aquellos que aceptaron participar continuaron con una evaluación metabólica. Para este fin, a los pacientes se les realizó historia clínica completa, determinación de glucosa e insulina mediante la CTOG para obtener el índice de sensibilidad de insulina por Matsuda, HOMA-IR para RI, índice de función de la célula β del páncreas y determinación de la composición corporal (% grasa visceral, % agua corporal total, densidad mineral ósea, etc) mediante impedancia bioeléctrica. Una vez concluida la etapa de escrutinio y solo si el paciente aceptó participar en el estudio se procedió a firmar la carta de consentimiento informado, ya firmada avanzó el sujeto a la siguiente etapa.

Etapa 3: Aleatorización.

Se efectuaron mediante el uso de una tabla de números aleatorios generados por el programa en línea randomizer.org. Los sujetos fueron aleatorizados para formar dos grupos de intervención, recibieron durante 12 meses uno de los dos tratamientos que se mencionan a continuación:

- 1) Linagliptina 2.5 mg + Metformina 850 mg cada 12 horas.
- 2) Metformina 850 mg cada 12 horas.

Nota: El inicio de la dosis en los dos grupos de estudio fue paulatina (la dosis cada 24 horas) de manera que al mes de tratamiento el paciente pudo estar con las dosis plenas en cada grupo de estudio.

Etapa 4: Intervención y seguimiento.

Una vez revisados los criterios de selección en cada paciente participante y ellos cuenten con todas las mediciones basales, fueron aleatorizados a los dos tratamientos:

1. Linagliptina + metformina: Se inició con dosis de 2.5 mg de linagliptina + 850 mg de metformina cada 24 hrs durante las primeras 2-4 semanas; posteriormente se incrementó la dosis a 5 mg de linagliptina y 1700 mg de metformina, siempre y cuando existió buena tolerancia a los medicamentos. La toma del medicamento se indicó posterior a los alimentos.
2. Metformina: Se inició con dosis de 850 mg de metformina cada 24 hrs durante las primeras 2 - 4 semanas y posteriormente se incrementó a 850 mg cada 12 hrs, siempre y cuando exista buena tolerancia al medicamento.

Se les pidió recolectar cada 6 meses una muestra de heces a los sujetos de estudio, para poder realizar el análisis de las bacterias intestinales previo al tratamiento farmacológico, la muestra debió entregarse en el laboratorio de Investigación en Metabolismo.

Todos los pacientes tuvieron un seguimiento mensual con medición de glucosa en ayuno, evaluación clínica global, evaluación antropométrica, evaluación de eventos adversos y apego al tratamiento (conteo de tabletas). Además, todos los participantes recibieron asesoría nutricional y de actividad física mensualmente como parte basal de ambos tratamientos farmacológicos. Al inicio del tratamiento se aplicó la encuesta “Sistema de Nutrientes” (SNUT) elaborada por el Instituto Nacional de Salud Pública en el 2002 y el Cuestionario Internacional de Actividad Física (IPAQ) y un recordatorio de 24 horas de pasos múltiples.

Etapa 5: Evaluación Intermedia

Se hizo una evaluación intermedia de los pacientes a los 6 meses de tratamiento en los 2 grupos de intervención. En esta evaluación, se les realizó a los pacientes una CTOG con 75 gr de glucosa anhidra, y se tomaron muestras de sangre a los 0, 30, 60, 90 y 120 minutos para determinación de glucosa e insulina, obtención de diferentes índices de RI y secreción de insulina. Además, evaluamos el apego al tratamiento a través del conteo de tabletas, eventos adversos, y valoración clínica global. Asimismo, se pidió una muestra de heces para obtener la composición del microbioma intestinal. Finalmente, se proporcionó asesoría nutricional y de actividad física, además de evaluar apego al tratamiento nutricio con recordatorio de 24 Horas de pasos múltiples, se aplicó la encuesta SNUT y se evaluó la actividad física a través del cuestionario IPAQ.

Etapa 6: Fin de la intervención

A los 12 meses de tratamiento fueron citados los pacientes que conformaban los dos grupos de tratamiento, en ayuno. Llevaron una muestra de heces fecales en el frasco proporcionado por el laboratorio para determinar la composición del microbioma intestinal. Además, se realizó medición de glucosa e insulina en ayuno, medición de composición corporal mediante impedancia bioeléctrica y CTOG para determinación de diferentes índices de RI y secreción de insulina. Se realizó evaluación clínica global, conteo de medicamentos y evaluación de eventos adversos. También, se aplicó la encuesta SNUT, cuestionario IPAQ y recordatorio de 24 hrs de pasos múltiples. Cabe señalar que se realizaron evaluaciones mensuales, estas incluyeron: Valoración clínica global, glucosa en ayuno, antropometría, evaluación de eventos adversos y apego al tratamiento. Además, se proporcionó orientación alimentaria y de actividad física y plan de alimentación.

Los procedimientos anteriormente descritos se esquematizan en la figura 6.

Etapa 1
Identificación de Sujetos Candidatos

Identificación de candidatos con 2 factores de riesgo para DM2.

Etapa 2
Reclutamiento de pacientes

Glucosa en ayuno, si es ≥ 100 mg/dl se hará CTOG y solo si, glucosa en ayuno es >100 y 125 mg/dl e intolerancia en la CTOG, selección y firma de Carta Consentimiento informado.

Etapa 3
Aleatorización

- 1) Linagliptina 2.5mg + Metformina 850mg cada 12 horas.
- 2) Metformina 850mg cada 12 horas.

Etapa 4
Intervención y Seguimiento

Muestra de Heces (microbioma intestinal)
Composición Corporal
Glucosa e Insulina en ayuno
CTOG, ISI y secreción de insulina
SNUT E IPAQ

Etapa 5
Evaluación Intermedia

Composición corporal
Glucosa e Insulina en ayuno
CTOG, ISI y Secreción de insulina
Conteo de medicamento
Evaluación de eventos adversos
SNUT E IPAQ

Etapa 6
Fin de Intervención

Muestra de Heces (microbioma intestinal)
Composición corporal
Glucosa e Insulina en ayuno
CTOG, ISI y Secreción de insulina
Conteo de medicamento
Evaluación de eventos adversos
SNUT e IPAQ

P
E
R
Í
O
D
O

D
E

T
R
A
T
A
M
I
E
N
T
O

Evaluación mensual (por 12 meses cada mes):

A los 6 meses se tomará muestra de heces (Composición del microbioma intestinal).

- Valoración clínica.
- Glucosa en ayuno.
- Evaluación antropométrica.
- Orientación alimentaria y de actividad física.
- Plan de alimentación.
- Evaluación de eventos adversos.
- Apego al tratamiento y conteo de medicamento.
- Recordatorio de 24 horas de pasos múltiples.

Figura 6. Descripción detallada del estudio.

IX. Procedimientos

1. Somatometría

Para tomar peso, talla y circunferencia de cintura la nutrióloga previamente estandarizada tomo las mediciones antropométricas mediante técnicas recomendadas²⁷¹⁻²⁷³ (**ANEXO 3**). Estas se realizaron en el mismo lugar y en las mismas condiciones (sujeto con ropa mínima y se verificó que la vejiga estuviera vacía antes de la medición).

Peso: Se utilizó una TANITA modelo BC – 568 (Inner Body Composition Monitor) marca SECA®.

Talla: Se determinó utilizando un estadímetro convencional de pared marca SECA®, considerando el plano de Frankfort para una correcta medición.

Circunferencia de cintura y cadera: se determinó utilizando la cinta metálica retráctil para uso antropométrico LUFKIN® con capacidad de 200 cm y 7 mm de anchura.

Composición corporal: La determinación de % grasa corporal, grasa visceral, % agua corporal total, densidad mineral ósea, % masa muscular y edad metabólica se realizó mediante impedancia bioeléctrica con la TANITA modelo BC – 568 (Inner Body Composition Monitor) marca SECA®.

2. Parámetros bioquímicos

A partir del plasma sanguíneo se determinaron las concentraciones de glucosa e insulina basales, 30, 60, 90 y 120 minutos. Los análisis fueron realizados en el laboratorio de Investigación en Metabolismo en la Universidad de Guanajuato.

A. Determinación de glucosa

Se determinó usando el método de punto final de glucosa oxidasa (GOD) y peroxidasa (POD). Este método se basa en la reacción indicadora de peróxido de hidrógeno que une a 4-aminoantipirina a un compuesto fenólico. La cual se lleva a cabo de la siguiente manera:

1. La glucosa se oxida por acción de la glucosa oxidasa para dar ácido glucónico y peróxido de hidrógeno.
2. El peróxido de hidrógeno reacciona en presencia de peroxidasa con HBA y con 4-aminoantipiridina (4-AAP) para dar lugar a un tinte de quinonimina rojo.
3. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de glucosa y se puede medir fotométricamente entre 460 y 560 nm²⁷⁴.

B. Determinación de insulina

Se determinó por medio de quimioluminiscencia; esta técnica utiliza como enzima ligada un enzima (peroxidasa) que cataliza la oxidación de un sustrato adecuado (luminol + peróxido de hidrógeno). Este sustrato, al oxidarse, alcanza un estado de excitación electrónica, y al volver posteriormente los electrones a sus órbitas primitivas de menor energía, emiten la diferencia en forma de energía luminosa (luminiscencia). Esta energía luminosa es medida en un iluminómetro. La lectura de luminiscencia es utilizada para el cálculo de los resultados²⁷⁵. En el laboratorio de Investigación en Metabolismo fueron procesadas las muestras.

3. Cálculo de la Resistencia a la Insulina

A. HOMA - IR

HOMA representa un modelo dinámico de las interacciones entre la glucosa y la insulina, hace referencia a un ciclo de retroalimentación entre el hígado y las células β . Las concentraciones de glucosa están reguladas por la producción de glucosa hepática dependiente de insulina, y los niveles de insulina dependen de la respuesta de la célula β , es decir, de la secreción de insulina y esta a su vez refleja una disminución de la respuesta al estímulo de glucosa. Por lo tanto, la RI se manifiesta por la disminución del efecto supresor de la insulina sobre la producción hepática de glucosa.

El modelo de la homeostasis de la resistencia a la insulina (HOMA-IR) es:

$$\text{HOMA- IR} = [\text{Insulina en ayuno (UI/ml)}] \times [\text{Glucosa en ayuno (mmol/L)}] / 22.5$$

El denominador 22.5 es un factor de normalización, es decir, el producto basal de insulina (5U/ml) y glucosa basal (4.5 mmol/l) en un sujeto con normalidad en la sensibilidad a la insulina es igual a 1, de esta manera se hace evidente que el HOMA-IR tiene una correlación lineal razonable con el clamp de glucosa²⁷⁴.

B. Índice de Matsuda

Este método tiene su fundamento en que la sensibilidad a la insulina durante una sobrecarga oral de glucosa reflejaría aproximadamente y de forma equitativa la supresión de la producción de glucosa hepática y la captación de glucosa por los tejidos periféricos, mayor sería el incremento de la glucosa, y la sensibilidad global a la insulina sería inversamente proporcional al producto de las medias de la glucosa y la insulina en la sobrecarga de glucosa. El estándar de oro para determinar la

sensibilidad a la insulina es la pinza (*clamp*) hiperinsulinémica euglicémica. Se utiliza la siguiente fórmula para calcularlo:

$$ISI_{\text{clamp}} = \frac{10.000}{\sqrt{(G_0 \times I_0) \times (\text{concentración media de glucosa en la SOG}) \times (\text{concentración media de insulina en la SOG})}}$$

El valor de 10.000 representa una constante que permite obtener resultados del índice entre 0 y 12, y la raíz cuadrada corrige la distribución no lineal de los valores, que se producen por la multiplicación de glucosa e insulina basales por los valores medios en la sobrecarga de glucosa G_0 e I_0 son la glucemia en ayunas. Los valores de glucemia se expresan en mg/dl y los de insulina $\mu\text{U/ml}$. La correlación observada entre este índice y el clamp es de 0.73 ($p < 0.0001$) y en los subgrupos constituidos por los sujetos con tolerancia normal a la glucosa es de $r = 0.73$ ($p < 0.0001$), con tolerancia alterada $r = 0.66$ ($p < 0.0001$) y con diabetes $r = 0.54$ ($p < 0.0001$)²⁶⁸.

4. Cálculo de función de las células β del páncreas

A. HOMA-B

HOMA-B = $(20 \times \text{insulina plasmática de ayuno en mU/l}) / (\text{glucosa de ayuno en mmol/l} - 3.5)$, para lo cual se requiere la glucosa e insulina de ayuno²⁷⁴.

B. Cálculo del índice de disposición de insulina durante la CTOG

El índice de disposición de insulina es el resultado de la relación hiperbólica entre la respuesta aguda de insulina y el índice de sensibilidad a la insulina, este produce una constante para un determinado grado de tolerancia a la glucosa y así proporcionar una medida funcional de las células β .

Los modelos de secreción de insulina que permiten la evaluación de las células β se realizan después de la inyección intravenosa de un bolo de glucosa, como el obtenido durante una prueba de tolerancia oral a la glucosa intravenosa (PTGIV). Cabe señalar que la acción de la insulina y la sensibilidad hepática a la insulina también pueden ser evaluadas por este modelo.

La respuesta aguda de la insulina (AIR) es el índice de secreción de insulina más popular en donde la concentración plasmática de insulina se mide en los primeros 10 minutos y se calcula el área bajo la curva. Por lo tanto, refleja la liberación de la primera fase de secreción de insulina.

El modelo mínimo con PTGIV permite la evaluación de un índice de sensibilidad a la insulina (IS PTGIV). Cuando AIR se multiplica por IS PTGIV su producto se denomina índice de disposición (Kahn et al. 1993) y determina si la secreción de insulina es apropiada para el nivel de acción de la misma²⁷⁴. Por lo tanto, el índice de disposición es el producto de las variables (IS PTGIV * AIR) el cual pone de manifiesto la incapacidad de la célula β para compensar la RI en sujetos de alto riesgo para desarrollar DM2 y que tienen niveles de glucosa alterados en ayuno. Además, se considera un valor bajo en el índice de disposición es un marcador precoz de la compensación inadecuada de las células β , debido a que se ha demostrado que el índice se reduce mucho tiempo antes de la presencia de hiperglucemia²⁷⁴.

C. Índice de Respuesta Aguda a la Insulina (AIR).

Este índice determina la capacidad funcional de las células β del páncreas para secretar insulina suficiente con la finalidad de mantener los niveles de glucosa normales. El valor se obtiene con las concentraciones de glucosa e insulina durante la CTOG de la siguiente manera:

$$\text{IDOI} = ((1/\text{insulina}) ((\Delta I_{0-30}) / (\Delta G_{0-30})))$$

En donde:

(ΔI_{0-30}) = Es la diferencia en el valor de insulina medido a los 0 y 30 minutos de la CTOG.

(ΔG_{0-30}) = Es la diferencia en el valor de glucosa medido a los 0 y 30 minutos de la CTOG.

D. Índice de disposición durante la curva de tolerancia oral a la glucosa (ID).

Este índice determina la capacidad funcional de las células β del páncreas para secretar insulina suficiente con la finalidad de mantener los niveles de glucosa normales. El valor se obtiene con las concentraciones de glucosa e insulina durante la CTOG de la siguiente manera^{275,276}:

$$\text{ID} = ((\text{Matsuda})((\text{IncAUCG}_{0-120}) / (\text{IncAUCI}_{0-120})))$$

En donde:

(IncAUCG_{0-120}) = Representa el incremento del área bajo la curva de glucosa durante los 120 minutos de la CTOG obtenida mediante la regla del trapecioide.

(IncAUCI_{0-120}) = Representa el incremento del área bajo la curva de insulina durante los 120 minutos de la CTOG obtenida mediante la regla de trapecioide.

5. Muestras de heces

A. Almacenamiento

Las muestras de heces fueron recolectadas en casa de los pacientes participantes y entregadas por ellos mismos en el laboratorio de investigación en metabolismo para su almacenamiento, se congelaron a -80°C hasta su procesamiento.

B. Extracción de ADN en muestras de heces

Se realizó la extracción de ADN en las muestras de heces de los pacientes que conforman los dos grupos de intervención farmacológica utilizando el kit DNeasy powersoil (Qiagen®), de la siguiente manera:

1. Todos los pasos se realizaron a temperatura ambiente (15 a 25°C) en tubos de recolección de 2 ml. Si la solución C1 del kit precipito, se calentó a 60°C hasta disolver el precipitado.
2. Se añadió 0.25 gr de muestra al tubo PowerBead. Agitamos suavemente para mezclar.
3. Se agregaron 60 μL de solución C1 y vortexeamos brevemente hasta homogeneizar la muestra. Es posible agregar la solución C1 al tubo PowerBead antes de colocar la muestra.
4. Se agregaron 20 μL s de solución de Proteinasa K y vortexear.
5. Se aseguraron los tubos de PowerBead de forma horizontal usando un soporte para tubos con adaptador Vortex.
6. Vortexear durante 10 minutos a la velocidad máxima para homogeneizar y disolver todas las partículas de la muestra.
7. Se incubaron las muestras a 65°C por 10 minutos, invertimos los tubos para mezclar cada 2 minutos durante la incubación.

8. Se aseguraron los tubos de PowerBead de forma horizontal usando un soporte MO BIO Vortex Adapter para tubos con adaptador Vortex. Vortexeamos a 3000 rpm por 10 minutos.
9. Se incubaron las muestras a 95°C por 10 minutos, e invertimos los tubos para mezclar cada 2 minutos durante la incubación.
10. Se centrifugaron los tubos a 8 000 rpm durante 30 segundos hasta disolver en su totalidad las partículas de la muestra.
11. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo de recolección limpio con capacidad de 2 ml, la cantidad de sobrenadante que se obtuvo osciló entre 400 a 500 µL.
12. Se añadieron 250 µL de la solución C2 y vortexearon durante 5 segundos. Posteriormente se incubaron a una temperatura de 2 a 8°C durante 5 minutos.
13. Se centrifugaron los tubos durante 1 minuto a 12 000 rpm.
14. Se transfirieron hasta 600 µL de sobrenadante, evitando el pellet, a un tubo de recolección limpio de 2 ml.
15. Se añadieron 200 µL de solución C3 y vortexearon brevemente. Posteriormente incubaron a temperatura de 2 a 8°C durante 5 minutos.
16. Se centrifugaron nuevamente los tubos durante 1 minuto a 12 000 rpm.
17. Se transfirieron hasta 750 µL de sobrenadante, evitando el pellet, a un tubo de recolección limpio de 2 ml.
18. Previamente agitada la solución C4, añadimos 1200 µL al sobrenadante. Posteriormente vortexeamos 5 segundos.
19. Se cargaron 675 µL en la columna de centrifugado MB y centrifugaron a 12 000 rpm durante 2 minutos, desechar el líquido.
20. Se repitió 2 veces más el paso 15, hasta que toda la muestra se procesó.
21. Se añadieron 500 µL de solución C5 y centrifugaron a 12 000 rpm durante 2 minutos.
22. Se eliminó el flujo y centrifugó nuevamente a 12 000 rpm por 2 minutos.

23. Se colocó con precaución la columna de centrifugado MB spin en un tubo de recolección limpio de 2 ml. Evitamos salpicar cualquier solución C5 sobre la columna.
24. Se añadieron 100 μ L de solución C6 al centro de la membrana blanca del filtro. Se usó en este paso agua de grado PCR sin DNA estéril.
25. Finalmente centrifugamos a temperatura ambiente a 12 000 rpm durante 1 minuto. Eliminamos la columna de centrifugado MB spin.

Por lo tanto, el procedimiento descrito comprende la homogeneización de las muestras de heces y lisis celular mediante un detergente iónico, la separación de residuos orgánicos e inorgánicos y ADN mediante centrifugación, y finalmente la purificación y recuperación del ADN. La calidad y limpieza del ADN fueron verificadas mediante electroforesis utilizando geles de agarosa al 1 % teñidos con bromuro de etidio. La concentración de ADN en las muestras se determinó mediante el equipo nanodrop (Thermo®), el cual realiza una lectura de ADN; se colocó 1 μ L de agua libre de nucleasas como blanco y posteriormente 1 μ L de la solución de ADN con la finalidad de obtener la concentración en ng/ μ L. Además, Qubit detectó por fluorescencia, la cantidad y calidad de ADN de doble hélice que se extrae; consiste en preparar una solución de 1 μ L de ADN con solución DMSO (199 μ L) la cual provee un fluoróforo que se une a la cadena de doble hélice.

Las muestras de ADN fueron almacenadas a -20°C para su conservación hasta la amplificación de genes 16S rRNA.

C. Amplificación de gen 16S rRNA

Se utilizaron los primers Forward: 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3' y Reverse: 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAA

TCC-3' para amplificar el gen bacteriano 16S rRNA, específicamente la región variable V3-V4, del cual se generó un producto de aproximadamente 550 pb. Para el indexado de muestras se utilizaron los primers: 5'CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT[i7]GTCTCGTGGGCTCGG-3' y 5'AATGATAACGGCGACCAACGAGATCTACAC[i5]TCGTCGGCAGCGTC-3', los productos de PCR fueron purificados utilizando perlas magnéticas Ampure XP. La cuantificación de los productos purificados se realizó por Qubit. Posteriormente se ajustaron las concentraciones de las muestras para su secuenciación.

D. Secuenciación y Análisis Computacional del Microbioma

La secuenciación se llevó a cabo mediante la plataforma MiSeq de Illumina, y a partir de los datos crudos obtenidos de la secuenciación del gen rRNA 16S V4 se realizaron los perfiles de composición taxonómica y abundancias de los componentes del microbioma para cada individuo. Esto se llevó a cabo mediante la plataforma especializada en el análisis de datos de secuenciación masiva para comunidades microbianas QIIME²⁷⁷.

Análisis bioinformático de las secuencias. El análisis de las secuencias se realizó con el software de código abierto QIIME2. Los archivos demultiplexados MiSeq FASTQ se analizaron mediante el flujo de trabajo DADA2²⁷⁸. Se garantizó una alta calidad de lectura mediante el filtrado y el recorte de estas antes del procesamiento, es decir, los primeros 10 pb del extremo 5' de todas las lecturas se recortaron y las lecturas se truncaron en 3' a una longitud máxima de 240 y 200 pb para lecturas directas e inversas respectivamente, ya que se observó una caída en la calidad de la secuencia después de esa longitud. Además, se eliminaron todas las lecturas con más de dos errores esperados en el modelo base de Illumina. Las lecturas filtradas y recortadas se agruparon por ejecución de secuenciación y el modelo de error se ajustó para cada ejecución por separado utilizando los parámetros predeterminados de DADA2²⁷⁹. Las variantes de secuencia se

obtuvieron para cada ejecución por separado utilizando los modelos de error calculados previamente y las secuencias de entrada no duplicadas. Las variantes de secuencia y los recuentos se unieron luego en todas las ejecuciones en una tabla de secuencia completa y *de novo*. La eliminación de quimeras se ejecutó en toda la tabla. La taxonomía para las variantes de secuencia final se llamó usando el clasificador de DADAs usando la base de datos SILVA (versión 132)²⁸⁰. Las especies se identificaron por separado mediante coincidencias de secuencia exacta cuando fue posible (nuevamente utilizando SILVA versión 132). El conjunto de datos final se unió con metadatos clínicos y se guardó en un objeto phyloseq para todos los análisis posteriores²⁸¹.

X. Análisis estadístico

El análisis de los datos en el estudio se realizó con los softwares estadísticos Stata/SE versión 16 para windows (StataCorp LLC College Station, TX), IBM-SPSS versión 25 y RStudio versión 4.1.1. Se realizó estadística de resumen y gráficas de cajas para determinar la distribución y presencia de valores extremos de los datos, así como transformación logarítmica base 10 para normalización de las variables cuantitativas con sesgo, y transformación Van der Wader para los índices de diversidad α y abundancia de cada genero bacteriano. Los datos se presentan con estadística descriptiva, media y desviación estándar o bien mediana y rango intercuartílico, se usan tablas y gráficos para su presentación.

El análisis principal fue el cambio en la composición del microbioma intestinal y sus relaciones con la RI y la secreción de insulina en pacientes con prediabetes. En primera instancia, se determinó el efecto de los fármacos antidiabéticos sobre el aumento de la sensibilidad a la insulina y la función de las células β pancreáticas a dos niveles; 1) los cambios según el mes de seguimiento en cada grupo, y 2) considerando los fármacos antidiabéticos y los meses de seguimiento. En cuanto al

primer nivel, se realizaron pruebas t de Student para contrastar los grupos. El contraste independiente se realizó entre los grupos basales y con tratamiento a los 6 y 12 meses de seguimiento. En su lugar, se realizó un contraste dependiente con sujetos que fueron seguidos desde los meses 6 a 12. Se calcularon los tamaños del efecto por d de Cohen (C-d), y Δ Glass y los intervalos de confianza del 95 % con bootstrap de 100 repeticiones. Estos tamaños del efecto son una medida estandarizada (unidades estándar) con un marco de referencia convencional de 0,2, 0,5 y 0,8 correspondientes a efectos pequeños, medianos y grandes, respectivamente. Por otro lado, para el segundo nivel se realizó el **ANOVA de una vía**, en este análisis se compararon las medias de los parámetros clínicos, considerando los tres grupos de tratamiento y mes de seguimiento. Además, se realizó **ANOVA de dos vías** para examinar el impacto del tratamiento X tiempo y post-hoc de Scheffe para identificar diferencias entre grupos.

A) Análisis del microbioma intestinal.

Análisis taxonómico y ecológico. Se utilizó el objeto Phyloseq para calcular los índices de diversidad α (es decir, los índices Observed, Chao 1, Fisher, Simpson, Inv Simpson y Shannon), y el análisis de la diversidad β con distancias Jaccard y escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) que fueron calculados por la biblioteca R Phyloseq 1.34.0.

Machine Learning (Random Forest). Para identificar el conjunto de genus bacterianos que sirven para clasificar a los diferentes tratamientos farmacológicos (linagliptina/metformina y metformina), aplicamos el algoritmo Random Forest. Este es un algoritmo supervisado que se usa ampliamente en problemas de clasificación y regresión. Todos los cálculos se realizaron en Python (versión 3.10) a través de la biblioteca Scikit-learn del software. Para ello, procedimos de la siguiente manera. Las celdas en las matrices de conteo de datos que comprenden pacientes tratados con metformina y linagliptina/metformina se etiquetaron con 0 y 1, respectivamente. Luego seleccionamos aleatoriamente el 75% de las muestras para definir el

conjunto de datos de entrenamiento, el resto de los datos se utilizó para integrar los datos de prueba. El algoritmo Random Forest se construyó con el conjunto de datos de entrenamiento y su rendimiento se evaluó con el conjunto de datos de prueba. Aplicamos un método de validación cruzada K-fold ($n_split=5$) para garantizar la independencia de los resultados en la forma de dividir los datos de entrenamiento y prueba. Este paso consistió esencialmente en dividir todos los datos en cinco proporciones iguales. Luego entrenamos el modelo seleccionando cuatro proporciones como conjunto de entrenamiento y el resto como conjunto de datos de prueba. Para evaluar el rendimiento del modelo, calculamos la matriz de confusión en los conjuntos de datos de prueba. Repetimos este procedimiento cinco veces, en cada ejecución seleccionamos una proporción diferente como datos de prueba y el resto como conjunto de datos de entrenamiento para que se tuvieran en cuenta todas las combinaciones posibles. Evaluamos en cada corrida el desempeño del modelo y la dependencia de los datos a través del área bajo la curva (AUC) de las curvas ROC. Finalmente, evaluamos la relevancia de los genus bacterianos caracterizados para cada tratamiento en los diferentes meses de seguimiento a través de los valores Shap (explicaciones aditivas de Shapley) para el algoritmo Random Forest.

B) Análisis estadísticos de metagenómica y su relación con los parámetros clínicos.

Después de realizar el análisis de aprendizaje automático e identificar las bacterias que clasifican cada grupo por fármacos antidiabéticos y meses de seguimiento, se realizaron Modelos Lineales Generalizados Mixtos (MLGM) considerando los índices de sensibilidad a la insulina y la función de las células β pancreáticas como variables dependientes. El modelo mixto analiza la sensibilidad a la insulina y la función de las células β , consideramos como factores fijos del grupo de estudio, el mes de seguimiento, el sexo, la edad, el género bacteriano utilizado para clasificar a los sujetos que toman metformina y la linagliptina + metformina, y

parámetros antropométricos (IMC, peso, % porcentaje de grasa y perímetro de cintura). Además, como factor aleatorio, las muestras de heces para los sujetos de estudio con seguimiento. Se calcularon eta-cuadrado e intervalos de confianza del 95% con bootstrap de 100 repeticiones. Asimismo, se evaluó el efecto de las interacciones (bacteria X Tratamiento, Bacteria X Tiempo y Tratamiento X Tiempo). Para establecer la presencia de un efecto bidireccional, los modelos se ejecutaron para la abundancia de géneros bacterianos como variable dependiente, el modelo mixto analiza como factores fijos los grupos de estudio, el sexo, la edad y los índices de sensibilidad a la insulina y función de las células β pancreáticas, o parámetros antropométricos (IMC, peso, porcentaje de grasa corporal y circunferencia de la cintura). Se calcularon eta-cuadrado e intervalos de confianza del 95% con bootstrap de 100 repeticiones. Las bacterias con significancia estadística en ambos modelos (con efecto bidireccional) fueron consideradas para posteriores análisis estadísticos: regresión lineal jerárquica, modelo de ecuaciones estructurales y modelo lineal generalizado mixto. Además, análisis de componentes principales para identificar el conjunto de bacterias con funciones estructurales y funcionales en el metabolismo de la glucosa. Con estos análisis se estableció la relación de la composición de la MI con la RI y la secreción de insulina en los pacientes con prediabetes tratados por 12 meses. Para ejecutar las pruebas se realizó transformación Van der Waerden en cada género bacteriano.

Regresión lineal. Se efectuaron considerando como variables dependientes los índices de sensibilidad a la insulina y la función de las células β . Como primera aproximación se estimaron los modelos de regresión considerando el tratamiento y mes de seguimiento (por sujetos) como efectos principales e interacción. Posteriormente, se estimaron los modelos considerando las visitas, el sexo y la edad. Asimismo, para cada uno de estos se estimaron los residuales y el tamaño de efecto.

Modelo de ecuaciones estructurales (SEM). Se utilizó el SEM para la mediación entre IMC, la abundancia de bacterias y componentes principales, y los

índices de secreción de insulina y sensibilidad a la insulina. Los coeficientes β fueron estimados por un método robusto.

Modelos mixtos. Para dilucidar el efecto de los medicamentos antidiabéticos y el cambio en la condición metabólica sobre los géneros bacterianos, realizamos modelos lineales generalizados mixtos (para una distribución de Tweedie) donde los géneros bacterianos se consideraron como la variable dependiente y los medicamentos antidiabéticos como una variable independiente. Además, ajustamos el modelo por género, edad, IMC y el índice Matsuda o Disp_Index2.

Componentes principales. Se analizó si podían existir conglomerados de bacterias, por lo que se realizó un análisis de factores con rotación varimax de vectores para incluir valores no correlacionados (ortogonales). Se analizó la adecuación de los factores con prueba de Kaiser Meyer Olkin (KMO) y prueba de esfericidad de Bartlett.

XI. Implicaciones éticas

Para la realización de la presente investigación se han considerado las normas éticas, el Reglamento de la ley General de Salud en materia de Investigación para la salud y la declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial de la 52^a Asamblea General, Edimburgo, Escocia, octubre 2000 con nota de clarificación sobre el párrafo 29 añadida por la Asamblea General, Washington 2002 y códigos y normas internacionales vigentes de las buenas prácticas de la investigación clínica. Una vez que el voluntario fue informado sobre el estudio y aceptó participar en el mismo, se pedirá la firma de carta de consentimiento informado.

El presente proyecto se realizó como parte complementaria del estudio “Efecto de la linagliptina sola y en combinación con metformina vs metformina sola sobre la función del islote pancreático, resistencia a la insulina y marcadores de riesgo

cardiovascular en pacientes con prediabetes. Ensayo clínico aleatorizado”, que se encuentra registrado y aprobado por los Comités de Ética e Investigación del HRAEB con número de registro **CI/HRAEB/2017/048** (Se anexa documento de aprobación, **ANEXO 4 y 5**) y en CLINICAL TRIALS con el número de registro **NCT03004612**.

XII. Recursos, financiamiento y factibilidad.

Este proyecto fue factible debido a que el Laboratorio de Investigación en Metabolismo y la unidad de investigación en metabolismo del Hospital Regional de Alta Especialidad del Bajío contó con la infraestructura necesaria para su realización y a través del trabajo conjunto de diferentes servicios e instituciones como el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), el proyecto no tuvo costo para los pacientes, fue sustentado por los financiamientos obtenidos por los investigadores responsable (Dr. Rodolfo Guardado Mendoza y Dr. Osbaldo Resendis Antonio).

Recursos Humanos:

Un investigador responsable, 1 estudiante de doctorado, 1 médico pasante del servicio social, 1 técnico de laboratorio para procesar muestras, personal encargado de la amplificación y secuenciación.

Recursos materiales:

Instalaciones de la unidad de investigación en metabolismo del Hospital Regional de Alta Especialidad del Bajío, instalaciones del Laboratorio de Investigación en Metabolismo de la División de Ciencias de la Salud de la Universidad de Guanajuato, material de laboratorio necesario para muestras hemáticas y procesamiento de heces fecales, fármacos metformina 850 mg, linagliptina 2.5 mg y metformina 850 mg (TRAYENTA DUO). Papelería para formatos necesarios, equipo de cómputo, impresora.

Desglose financiero:

1. Medicamento Trayenta Duo (linagliptina 2.5 mg + metformina 850 mg) y metformina 850 mg, 34 560 tabletas de la combinación y metformina respectivamente: \$ 156,000.00
2. Medición de glucosa e insulina durante las pruebas: \$ 100,000.00
3. Procesamiento muestra de heces; incluye extracción de ADN hasta su secuenciación: \$ 60,000.00
4. Otros gastos (consumibles): \$ 50,000.00

TOTAL: 366,000.00

Infraestructura científica:

En el Laboratorio de Investigación en Metabolismo de la División de Ciencias de la Salud del Campus León UG, la unidad de investigación en metabolismo del HRAEB y el Instituto Nacional de Medicina Genómica, se cuenta con la infraestructura y la logística para la evaluación metabólica de pacientes, así como para la recolección y almacenamiento de muestras de heces, y con la metodología y equipo necesario para la extracción de DNA bacteriano, secuenciación y análisis bioinformático. De tal manera que las unidades antes mencionadas contribuyeron con la captura y evaluación global de los pacientes de estudio, así como el procesamiento de las muestras de heces, la secuenciación del material genético bacteriano para obtener el microbioma, así como análisis bioinformático y la escritura de los artículos derivados de la presente investigación.

XIII. Implicaciones de Bioseguridad

Cada voluntario fue cuidadosamente monitoreado por el investigador para determinar la presencia de eventos adversos parciales o definitivamente relacionado con el medicamento del estudio. Todos los eventos adversos y los eventos adversos serios fueron registrados en la sección diseñada para este fin en el Expediente de Recolección de Datos (CRF), con todo detalle a partir de la fecha en la que el evento se presentó. La descripción detallada de cada evento incluyó: descripción del evento (diagnóstico, intensidad, severidad, lugar, relación causal), fecha de inicio, duración término del evento, cualquier manejo correctivo de éste, y la causalidad. Cualquier evento adverso inesperado o de una frecuencia no estimada en la información para prescribir autorizada, se reportó al médico.

Definiciones

La definición de eventos adversos se basa en los lineamientos generales de Buenas Prácticas Clínicas Internacionales y en la NOM 220-SSA 1-2002 vigente en la República Mexicana.

Evento adverso

Definido como cualquier ocurrencia médica indeseable que se presente en un paciente al que se le haya administrado el medicamento, la cual NO necesariamente pudiera tener relación causal con el tratamiento, además de lo que a continuación se describe:

- Un evento que ocurra en el curso del uso del medicamento.
- Un evento que ocurra por una sobredosis del medicamento.
- Un evento que ocurra al discontinuar el medicamento.
- Cualquier desviación del efecto terapéutico esperado.

- Cualquier cambio relevante en los exámenes de laboratorio.

Reacción adversa

Cualquier respuesta perjudicial y no deseada al medicamento que ocurra a la dosis estándar probada para profilaxis o tratamiento. Estos son conocidos y publicados en la información para prescribir autorizada por el medicamento.

Reacción adversa inesperada

Cualquier reacción adversa cuya naturaleza o severidad no está descrita en la literatura científica o en la información para prescribir, ni en la documentación presentada para su registro y que no es posible inferir su actividad farmacológica

Un evento adverso, una sospecha de reacción adversa o una reacción adversa reportada por el paciente u observado por el Investigador fue debidamente documentado junto con el grado de **intensidad** de acuerdo los lineamientos de las autoridades sanitarias locales (leve, moderado o severo).

Leve: Signos y síntomas fácilmente tolerados, no necesitan tratamiento, ni prolongan la hospitalización y pueden o no requerir la suspensión del medicamento.

Moderado: Interfiere con las actividades habituales, sin amenazar directamente la vida del paciente. Requiere de tratamiento farmacológico y puede o no requerir la suspensión del medicamento.

Severo: Interfiere con las actividades habituales, amenaza directamente la vida del paciente. Requiere de tratamiento farmacológico y requiere la suspensión del medicamento.

Con base en el desenlace, los eventos adversos, las sospechas de reacción adversa y las reacciones adversas se clasifican de acuerdo con la **gravedad** de la manifestación clínica en: Graves (serios).

Evento adverso serio

Es cualquier manifestación clínica importante que se presenta con la administración de cualquier dosis del medicamento, y que:

- Causa la muerte
- Pone en peligro la vida en el momento mismo en que se presenta (este término se refiere a un evento en el cual el paciente estuvo en riesgo de muerte, no se refiere a un evento que hipotéticamente pudiera haber causado la muerte si hubiera sido más severo).
- Requiere hospitalización del paciente o si está hospitalizado, prolongación de la misma.
- Es causa de invalidez o de incapacidad persistente significativa.
- Es causa de alteraciones o malformaciones en el recién nacido.
- Requiere de intervención médica o quirúrgica para prevenir daño permanente de la función del cuerpo o daño permanente a la estructura del cuerpo.

Se consideran como NO GRAVES a los eventos adversos, las sospechas de reacción adversa y las reacciones adversas leves y moderadas.

Nota: Cualquier otra condición médica importante debe ejercerse a juicio médico y científico, para decidir si deben reportarse otras situaciones, diferentes a las arriba señaladas.

Clasificación de las sospechas de Reacciones Adversas NOM 220-SSA 1-2002.

Las sospechas de reacciones adversas se clasificaron de acuerdo a la calidad de la información y a la valoración de la causalidad bajo las categorías probabilísticas siguientes:

Cierta

Consiste en un evento (manifestación clínica o un resultado anormal de una prueba de laboratorio) que ocurre en un tiempo razonable posterior a la administración del medicamento y no puede explicarse por la evolución natural del padecimiento, una patología concomitante o a la administración de otros medicamentos. La respuesta a la suspensión del medicamento debe ser clínicamente evidente.

Probable

Consiste en un evento (manifestación clínica o un resultado anormal de una prueba de laboratorio) que sigue una secuencia de tiempo razonable desde la última administración del medicamento y que difícilmente puede atribuirse a la evolución natural del padecimiento, patologías concomitantes o a la administración de otros medicamentos. Al suspender la administración del medicamento(s) sospechoso(s) se obtiene una respuesta clínica razonable. No es necesario re administrar el medicamento.

Posible

Consiste en un evento (manifestación clínica o resultado anormal de una prueba de laboratorio) que sigue una secuencia de tiempo razonable desde la última administración del medicamento, el cual también puede atribuirse a la evolución natural del padecimiento, patologías concomitantes o a la administración de otros medicamentos. No se dispone de la información relacionada con la suspensión de la administración del medicamento sospechoso o bien ésta no es clara.

Dudosa

Consiste en un evento (manifestación clínica o una prueba de laboratorio anormal) que sigue una secuencia de tiempo desde la última administración del medicamento que hace la relación de causalidad improbable (pero no imposible), lo que podría explicarse de manera aceptable por ser parte de la evolución natural del padecimiento, o bien debido a la presencia de patologías concomitantes o a la administración de otros medicamentos.

Condicional/Inclasificable

Consiste en un evento (manifestación clínica o un resultado anormal de una prueba de laboratorio) que no puede ser evaluado adecuadamente debido a que se requieren más datos o porque los datos adicionales aún están siendo analizados.

No evaluable/Inclasificable

Consiste en un reporte sugerente de una reacción adversa que no puede ser evaluado debido a que la información recabada es insuficiente o contradictoria. El reporte no puede ser completado o verificado.

Si el evento adverso provoca una salida prematura del estudio, se completó en la página indicada del Expediente de Recolección de Datos (CRF).

Si un **evento adverso serio** ocurrió, el médico encargado del estudio fue informado inmediatamente.

Seguimiento y Reporte de Eventos Adversos.

Durante los seguimientos mensuales se realizó el seguimiento de Eventos Adversos (EA's) para detectar signos o síntomas que denotaron su presencia. El estudio concluyó 15 días después de la última toma de medicamento del último paciente enrolado en el estudio. El investigador encargado del estudio fue responsable del monitoreo y reporte de EAs al Comité de Ética, y al laboratorio

dueño de la molécula, en estricto apego a la NOM 220, sobre Instalación y Operación de farmacovigilancia.

Retiro de pacientes del estudio.

Los pacientes pudieron retirarse del estudio en cualquier momento. También se retiraron por decisión del investigador, si éste consideró que el sujeto no cumple con los procedimientos del estudio o si presentó un evento adverso que pone en riesgo su salud. El cual fue retirado del estudio, pero atendido hasta que el EA se controló en las instalaciones del HRAEB, la institución costeó el total de los gastos que esto generó. En caso de eliminación de algún paciente, este no fue reemplazado.

Manejo de medicamentos.

El medicamento se mantuvo resguardado en un almacén, respetando las condiciones de temperatura y humedad, de acuerdo a las instrucciones de almacenamiento del medicamento. Se tuvo registro de la cantidad de medicamento existente, con codificación, número de lote y fecha de caducidad. El medicamento no pudo ser utilizado para ningún otro fin que no fuese el presente estudio. El medicamento se almacenó de acuerdo a las condiciones establecidas y con acceso restringido. Se realizaron registros de recepción, almacenamiento y control del medicamento.

Carta de Consentimiento de Informado.

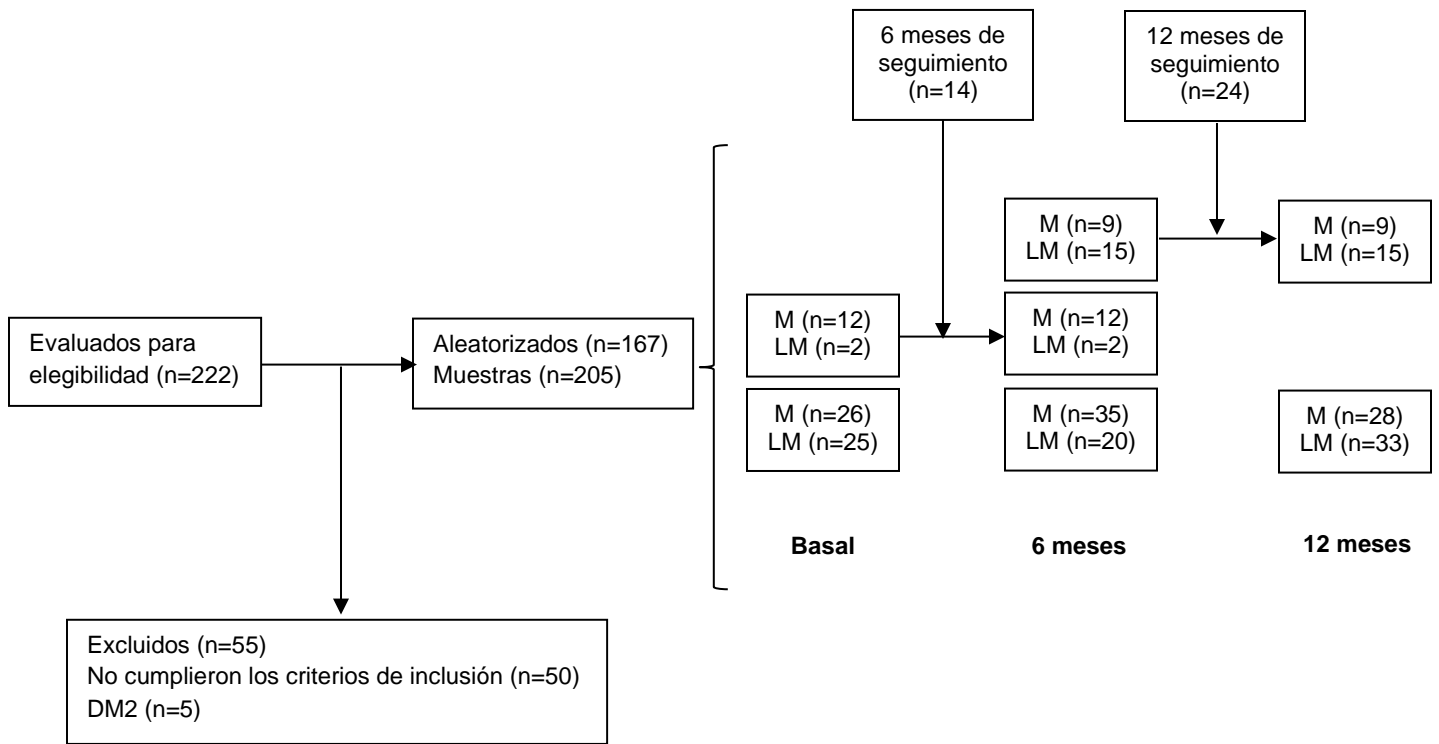
El investigador llevó a cabo el proceso de obtención del consentimiento informado. Posteriormente, entregó una copia original de la carta de consentimiento informado firmada al paciente, y otra copia al investigador para su resguardo en un archivo bajo llave, asegurando así la confidencialidad de los datos de los voluntarios. Ningún procedimiento del estudio se llevó a cabo antes de la firma de

la Carta de consentimiento informado por el paciente, dos testigos y el investigador (ANEXO 6).

XIV. Resultados.

A. Flujo de reclutamiento y seguimiento de sujetos participantes en el estudio.

Los pacientes incluidos en este estudio formaban parte de un estudio de prevención de la diabetes (PRELLIM). PRELLIM fue un ensayo clínico aleatorizado y doble ciego diseñado para evaluar el efecto de la combinación de linagliptina + metformina + estilo de vida (LM) en comparación con solo metformina + estilo de vida (M) sobre el metabolismo de la glucosa, la RI y la función de los islotes pancreáticos (ClinicalTrials. número de gobierno, NCT03004612). Todos los participantes de PRELLIM fueron invitados a participar en la parte del estudio del MI, y un total de 222 sujetos fueron evaluados para elegibilidad de agosto del 2018 a diciembre del 2019, de estos 167 sujetos fueron seleccionados y se formaron 3 grupos (65 en el grupo basal, 77 con seguimiento a los 6 meses, y 63 con seguimiento a los 12 meses). Esto debido a que no todos los sujetos participantes cumplían con los 3 seguimientos en los 12 meses del estudio. Además, la potencia estadística fue menor al 70%, por esta razón no fue posible responder al objetivo planteado en la investigación como medidas repetidas. Estos grupos a su vez se subdividían considerando la intervención farmacológica en los grupos con 6 y 12 meses de seguimiento; 14 sujetos (12 M y 2 LM) en el grupo basal tuvieron seguimiento a los 6 meses y 24 sujetos (9 M y 15 LM) con seguimiento a los 6 meses tuvieron seguimiento a los 12 meses. Los contrastes entre grupos se realizaron como se especifica a continuación: a) Contrastes entre grupos independientes; grupo basal (sin tratamiento) vs grupos con 6 y 12 meses de seguimiento, b) Contrastes entre grupos dependientes; grupo con 6 meses de seguimiento vs 12 meses de seguimiento. El diagrama de flujo y contrastes entre grupos de estudio se muestra en el diagrama 1.



M= Metformina y LM= Linagliptina + metformina.

Diagrama 1. Diagrama de flujo del estudio.

B. Apego al tratamiento y eventos adversos.

Los sujetos tuvieron 90% de apego al tratamiento farmacológico en ambos brazos de tratamiento y los efectos secundarios que se presentaron fueron: diarrea en 6 pacientes del grupo M y en 5 pacientes del grupo LM. Ocurrieron náuseas en 2 pacientes de cada grupo y cefalea en 2 sujetos del grupo M y 1 del grupo LM.

C. Análisis de las variables clínicas.

Los fármacos antidiabéticos incrementan la sensibilidad a la insulina y función de las células β pancreáticas.

1. Características de la población de estudio.

El sexo femenino predominó en los 3 grupos y el porcentaje fue similar en los grupos de estudio; 48 (73.85%) en el grupo basal, 47 (61.04%) con 6 meses de seguimiento y 45 (71.43%) con 12 meses de seguimiento, $p=0.237$. Las características antropométricas de los grupos con tratamiento, son diferentes al grupo basal; IMC de 32.02 (DE 6.79) en el grupo basal, 27.90 (DE 4.55) y 28.32 (DE 4.35) en los grupos con seguimiento a los 6 y 12 meses, respectivamente ($p=0.0001$). El porcentaje de grasa corporal fue menor en los grupos tratados con fármacos; 33.77 (DE 8.39) con 6 meses de seguimiento y 34.69 (DE 7.49) con 12 meses de seguimiento frente al grupo basal 38.30 (DE 8.81) ($p=0.0020$). La grasa visceral se distribuyó de manera similar en los tres grupos.

En cuanto a las características bioquímicas, glucosa en ayunas [108.47 (DE 20.72) mg/dl, 96.05 (DE 9.62) mg/dl y 93.91 (DE 9.50) mg/dl, $p=0.0001$], HbA1c [5.72 (DE 0.79), 5.49 (DE 0.39) y 5.48 (DE 0.33), $p=0.0119$], y HOMA-IR [4.35 (DE 3.94), 2.01 (DE 2.93) y 1.90 (1.43), $p=0.0001$] los grupos con tratamiento de 6 y 12 meses de seguimiento con referencia al grupo basal. La sensibilidad a la insulina, evaluada por el índice de Matsuda, fue mayor en el grupo con 6 meses de seguimiento 3.95 (DE 3.25) y se mantuvo sin cambios en el grupo con 12 meses de seguimiento 3.89 (DE 3.02), ambos respecto al grupo basal [2.45 (DE 2.03), $p=0.0006$]. La sensibilidad a la insulina y la función de las células β pancreáticas fueron similares entre los grupos, excepto que Disp_Index2 calculado por $(\text{Matsuda} * (\text{IncAUCins0-120} / \text{IncAUCgluc0-120}))$ en el grupo con 6 meses de seguimiento redujo significativamente en comparación con el grupo basal ($p=0.0001$) (Tabla 5).

Variables	N	Basal	N	Tratamiento (6 meses)	N	Tratamiento (12 meses)	p-value
Edad (años)	65	44.08±11.37	77	48.21±9.85 ^a	63	47.60±12.11 ^a	0.0347*
Sexo (Femenino %)	65	48(73.85)	77	47(61.04)	63	45(71.43)	0.237
PAS (mmHg)	65	123.90±17.93 ^a	76	116.45±15.37 ^b	61	115.80±15.10 ^b	0.0036*
PAD (mmHg)	65	80.90±11.50 ^a	76	77.02±10.10 ^b	61	73.64±10.58 ^c	0.0024*
Características antropométricas							
Peso (kg)	65	82.55±18.57 ^a	77	73.49±14.40 ^b	63	73.95±15.02 ^b	0.0006*
IMC (kg/m ²)	65	32.02±6.79 ^a	77	27.90±4.55 ^b	63	28.32±4.35 ^b	0.0001*
CC (cm)	61	97.64±13.58 ^a	77	89.45±12.80 ^b	59	90.63±10.49 ^b	0.0004*
CCad (cm)	61	110.57±14.78 ^a	77	102.70±10.33 ^b	59	103.27±10.64 ^b	0.0002*
Índice de cintura/cadera	61	0.88±0.08	77	0.87±0.01	59	0.87±0.08	0.5883
Grasa corporal (%)	64	38.30±8.81 ^a	77	33.77±8.39 ^b	62	34.69±7.49 ^b	0.0020*
Grasa visceral (AU)	54	9.97±3.99	62	8.76±3.69	58	9.93±3.70	0.2333
Características bioquímicas							
Glucosa en ayuno (mg/dl)	65	108.47±20.72 ^a	77	96.05±9.62 ^b	63	93.91±9.50 ^b	0.0001*
Glucosa a los 120 min de la OGTT (mg/dl)	65	163.58±46.83 ^a	77	128.60±36.63 ^b	63	132.18±33.86 ^b	0.0001*
HbA1c (%)	56	5.72±0.79 ^a	72	5.49±0.39 ^b	60	5.48±0.33 ^b	0.0119*
AUC glucosa (OGTT)	65	20569.75±4299.47 ^a	75	16872.64±3710.32 ^b	61	17410.17±3023.66 ^b	0.0001*
Índice de Matsuda	51	2.45±2.03 ^a	64	3.95±3.25 ^b	57	3.89±3.02 ^b	0.0006*
HOMA-IR	52	4.35±3.94 ^a	64	2.01±2.93 ^b	57	1.90±1.43 ^b	0.0001*
QUICKI	51	0.32±0.04 ^a	64	0.35±0.04 ^b	57	0.35±0.04 ^b	0.0001*
HOMA-B	51	106.25±98.13	64	93.63±136.27	57	103.96±135.36	0.3251
Insulina basal	51	12.92±10.67 ^a	64	8.45±12.15 ^b	57	8.54±13.05 ^b	0.0390*
Insulina 30 minutos (OGTT)	51	60.24±43.47	64	57.06±41.66	56	63.84±48.81	0.7727
Insulina 60 minutos (OGTT)	51	92.52±60.30	64	74.04±70.01	56	79.80±59.00	0.2989
Insulina 90 minutos (OGTT)	51	91.71±60.44 ^a	64	68.44±58.96 ^c	55	82.15±48.51 ^b	0.0365*
Insulina 120 minutos (OGTT)	51	91.56±66.55 ^a	64	65.90±50.08 ^c	57	75.71±56.45 ^b	0.0120*
AUC insulina (OGTT)	51	9216.52±5431.34 ^a	64	7546.25±4982.75 ^b	57	7738.98±4775.64 ^b	0.0013*
AIR (DIO_30/DGO_30)	51	0.72±0.70	64	0.95±2.81	57	0.84±0.74	0.1388
Oral_DI (AIR*1/insulin)	51	0.06±0.09	64	0.11±0.26	57	0.10±0.12	0.0623
Secreción de insulina (AUCins0-120/AUCgluc0-120)	51	0.445±0.28 ^a	64	0.448±0.28 ^b	57	0.444±0.26 ^b	0.0020*
β-Cell function ₁ (Matsuda*(AUCins0-120/AUCgluc0-120))	51	2.63±1.20	64	5.18±5.08	56	4.49±5.51	0.1356
β-Cell function ₂ (Matsuda*(IncAUCins0-120/IncAUCgluc0-120))	51	1.09±0.43 ^b	64	1.77±0.71 ^a	57	1.73±0.66 ^a	0.0001*
Colesterol total (mg/dl)	62	182.17±35.08	77	182.13±35.93	63	178.71±36.92	0.9864
HDL-c (mg/dl)	61	38.11±11.58 ^b	76	43.97±21.87 ^a	63	43.13±11.82 ^a	0.0215*
LDL-c (mg/dl)	48	108.09±29.61	38	103.58±42.39	20	106.95±37.43	0.9147
VLDL-c (mg/dl)	47	32.52±13.88	32	33.39±23.09	18	30.04±14.73	0.5294
Triglicéridos (mg/dl)	62	163.32±69.82	78	147.20±91.85	63	153.09±120.71	0.4744

Contrastes dependientes con t-test (Basal vs 6 meses y 12 meses de seguimiento). **M=** Metformina y **LM=** Linagliptina + metformina. PAS= presión arterial sistólica, PAD= Presión arterial diastólica, IMC= índice de masa corporal, CC= circunferencia de cintura, CCad= circunferencia de cadera, AUC= área bajo la curva, IncAUC= incremento del área bajo la curva, OGTT= curva de tolerancia oral a la glucosa, AIR= índice de respuesta aguda de insulina, HOMA-IR= homeostasis model assessment for insulin resistance, HOMA-B= homeostasis model assessment beta-cell, Oral_DI= índice de disposición a la insulina, HDL-c= lipoproteínas de alta densidad, LDL-c= lipoproteínas de baja densidad, VLDL-c= lipoproteínas de muy baja densidad. *p<0.05. **p<0.05.

Tabla 5. Características de la población de estudio por mes de seguimiento.

Contraste entre 6 y 12 meses de seguimiento (prueba t de muestras pareadas).

El contraste dependiente entre los grupos de 6 vs 12 meses de seguimiento, muestra una reducción estadísticamente significativa de la presión arterial diastólica (78.06 ± 10.53 vs 73.33 ± 8.84 , $p=0.0223$). El tamaño del efecto fue determinado por Δ de Glass, para la variable grasa visceral se observó un aumento de 1 unidad arbitraria respecto a los 6 meses de intervención (7.87 ± 2.36 vs 8.70 ± 2.77 , Δ de Glass= 0.394), y una reducción de AIR (DI0_30/DG0_30) (1.07 ± 0.85 vs 0.85 ± 0.52 , Δ Glass= 0.459), Oral_DI (AIR*1/insulina) (0.12 ± 0.14 vs 0.10 ± 0.05 , Δ Glass= 0.429). Por tanto, las diferencias en un seguimiento muestran que la mayoría de los parámetros antropométricos y bioquímicos se mantienen en valores a los 6 meses de seguimiento, sin presentar diferencias estadísticamente significativas, como se puede observar en la tabla 6.

Variables	N	Tratamiento (6 meses)	N	Tratamiento (12 meses)	SE (Δ de Glass)	p-value
PAS (mmHg)	24	118.96±15.54	24	114.86±14.67	0.273	0.1664
PAD (mmHg)	24	78.06±10.53	24	73.83±8.84	0.420	0.0223*
Características antropométricas						
Peso (kg)	24	72.27±14.85	24	72.18±18.86	0.253	0.8763
IMC (kg/m ²)	24	27.66±3.04	24	27.69±2.95	0.010	0.9032
CC (cm)	23	89.72±9.80	23	89.45±9.32	0.034	0.7829
CCad (cm)	23	100.71±6.93	23	101.43±6.73	0.102	0.5330
Índice de cintura/cadera	23	0.889±0.11	23	0.881±0.09	0.082	0.5318
Grasa corporal (%)	22	35.56±6.57	22	35.29±5.74	0.062	0.6934
Grasa visceral (AU)	14	7.87±2.36	14	8.70±2.77	0.394	0.0654
Características bioquímicas						
Glucosa en ayuno (mg/dl)	24	92.5±6.05	24	93.13±6.44	0.104	0.5825
Glucosa a los 120 min de la OGTT (mg/dl)	24	122.80±30.58	24	122.73±32.78	0.020	0.9926
HbA1c (%)	22	5.43±0.21	22	5.49±0.21	0.286	0.3113
AUC glucosa (OGTT)	22	16006.71±2872.06	22	16988.69±2413.02	0.320	0.0507
Índice de Matsuda	21	3.88±3.66	21	3.73±2.37	0.194	0.7427
HOMA-IR	21	2.08±4.40	21	1.99±1.16	0.227	0.8113
QUICKI	21	0.344±0.04	21	0.345±0.03	0.025	0.9493
HOMA-B	21	113.37±208.46	21	110.02±66.78	0.165	0.8660
AUC insulina (OGTT)	21	8160.34±4878.59	21	8688.30±4309.54	0.023	0.4757
AIR (D10_30/DG0_30)	21	1.07±0.85	21	0.85±0.52	0.459	0.2091
Oral_DI (AIR*1/insulin)	21	0.12±0.14	21	0.10±0.05	0.429	0.5128
Secreción de insulina (AUCins0-120/AUCgluc0-120)	21	0.52±0.28	21	0.51±0.24	0.107	0.8595
β-Cell function ₁ (Matsuda*(AUCins ₀₋₁₂₀ /AUCgluc ₀₋₁₂₀))	21	6.33±7.20	21	5.23±3.82	0.153	0.2626
β-Cell function ₂ (Matsuda*(IncAUCins ₀₋₁₂₀ /IncAUCgluc ₀₋₁₂₀))	21	2.03±0.81	21	1.92±0.45	0.247	0.5084
Colesterol total (mg/dl)	24	184.93±40.81	24	176.25±33.66	0.233	0.2448
HDL-c (mg/dl)	22	49.45±21.87	22	46.72±12.01	0.058	0.6573
Triglicéridos (mg/dl)	24	144.45±123.59	24	160.58±165.25	0.144	0.2661

Contraste dependiente con t-test. **M**= Metformina y **LM**= Linagliptina + metformina. PAS= presión arterial sistólica, PAD= Presión arterial diastólica, IMC= índice de masa corporal, CC= circunferencia de cintura, CCad= circunferencia de cadera, AUC= área bajo la curva, IncAUC= incremento del área bajo la curva, OGTT= curva de tolerancia oral a la glucosa, AIR= índice de respuesta aguda de insulina, HOMA-IR= homeostasis model assessment for insulin resistance, HOMA-B= homeostasis model assessment beta-cell, Oral_DI= índice de disposición a la insulina, HDL-c= lipoproteínas de alta densidad, LDL-c= lipoproteínas de baja densidad, VLDL-c= lipoproteínas de muy baja densidad. *p<0.05. **p<0.05.

Table 6. Contraste entre grupos con 6 y 12 meses de seguimiento.

ANOVA de dos vías e interacción (Tiempo X Tratamiento).

En el ANOVA de dos vías se examinó el impacto de la interacción tiempo por tratamiento. En términos del IMC se observaron cambios estadísticamente significativos para el efecto principal del tiempo en los grupos ($p=0.00001$) y en la interacción de tiempo X tratamientos farmacológicos ($p=0.0412$). Además, en el índice de respuesta aguda a la insulina (AIR (DIO_30/DG0_30)) se encontró diferencia estadísticamente significativa para la interacción (tiempo X tratamiento) ($p=0.0069$), demostrando el impacto de la interacción en el índice de respuesta aguda a la insulina y el IMC (Tabla 7).

Variable	N	Basal	N	Tratamiento (6 meses)	N	Tratamiento (12 meses)	p-value tiempo (meses)	p-value tratamiento	p-value Tiempo X tratamiento
Características antropométricas									
Peso (kg)							0.0011	0.9178	0.1325
Metformina	38	82.00±19.40	44	71.49±13.22	28	76.91±17.78			
Linagliptina/metformina	27	83.32±17.69	33	76.15±15.56	35	71.67±11.98			
p-value	0.7608		0.1359		0.1639				
IMC (kg/m²)							0.00001	0.9322	0.0412
Metformina	34	31.98±6.80	11	27.11±4.28	28	29.56±4.98			
Linagliptina/metformina	27	32.08±6.91	33	29.01±4.71	35	27.36±3.51			
p-value	0.9509		0.0574		0.0461				
CC (cm)							0.0025	0.6446	0.0729
Metformina	34	97.20±14.73	44	86.84±13.69	28	92.99±11.52			
Linagliptina/metformina	27	98.19±12.26	33	92.95±11.05	31	88.55±9.08			
p-value	0.7745		0.0685		0.1060				
CCad (cm)							0.0002	0.3168	0.0743
Metformina	34	110.86±15.48	44	101.72±9.98	28	106.72±11.58			
Linagliptina/metformina	27	110.21±14.13	33	103.98±10.77	31	100.26±8.73			
p-value	0.8553		0.3272		0.0173				
Índice cintura/cadera							0.5494	0.1367	0.4801
Metformina	34	0.88±0.08	44	0.86±0.11	28	0.87±0.07			
Linagliptina/metformina	27	0.89±0.08	33	0.90±0.09	31	0.88±0.08			

p-value		0.4835		0.1291		0.5698			
Grasa corporal (%)							0.0091	0.0544	0.2513
Metformina	38	37.75±9.55	44	31.81±8.20	27	36.37±6.89			
Linagliptina/metformina	26	39.12±7.78	33	36.57±8.08	35	33.44±7.83			
p-value		0.5670		0.0209		0.1432			
Grasa visceral (AU)							0.1675	0.0591	0.8954
Metformina	28	9.24±3.49	42	8.39±3.73	25	9.68±4.47			
Linagliptina/metformina	26	10.82±4.37	20	9.62±3.60	33	8.96±2.98			
p-value		0.1703		0.1659		0.4695			
Características bioquímicas									
Glucosa de ayuno (mg/dl)							0.00001	0.1490	0.9351
Metformina	38	109.22±26.03	44	95.11±9.95	28	95.75±11.17			
Linagliptina/metformina	27	107.41±9.23	33	92.96±9.02	35	93.29±7.92			
p-value		0.6088		0.3979		0.3292			
Glucosa 120 min (mg/dl)							0.00001	0.5998	0.4514
Metformina	38	164.22±56.09	44	129.93±40.85	28	133.86±32.49			
Linagliptina/metformina	27	162.67±30.03	33	134.01±29.50	35	138.43±35.26			
p-value		0.8759		0.6358		0.5951			
HbA1c (%)							0.0126	0.3644	0.7490
Metformina	30	5.79±0.98	40	5.51±0.47	26	5.52±0.40			
Linagliptina/metformina	26	5.65±0.48	32	5.46±0.26	34	5.47±0.26			

p-value		0.4419		0.5889		0.5403			
AUC glucosa (OGTT)							0.00001	0.5547	0.3010
Metformina	38	20324.51±5248.31	41	17475.56±379	26	17814.81±3393.29			
Linagliptina/metformina	27	20919.97±2505.65	33	17361.77±3543.93	35	17572.29±2764.35			
p-value		0.4971		0.8935		0.7668			
Índice de Matsuda							0.00001	0.2107	0.5692
Metformina	24	2.95±2.02	30	4.96±2.57	24	5.22±3.57			
Linagliptina/metformina	27	2.93±2.08	33	4.74±0.378	33	4.17±2.51			
p-value		0.9829		0.7833		0.2248			
HOMA-IR							0.00001	0.0351	0.5127
Metformina	25	4.82±0.86	30	2.45±3.54	24	2.28±1.53			
Linagliptina/metformina	27	6.30±0.68	33	3.03±2.29	33	2.33±1.37			
p-value		0.1837		0.4442		0.8668			
QUICKI							0.00001	0.5052	0.6225
Metformina	24	0.32±0.04	30	0.35±0.03	24	0.35±0.04			
Linagliptina/metformina	27	0.32±0.03	33	0.34±0.04	33	0.35±0.03			
p-value		0.8616		0.3420		0.6256			
HOMA-B							0.5383	0.0790	0.3885
Metformina	24	142.91±124.84	30	110.97±176.52	24	108.68±66.09			
Linagliptina/metformina	27	122.68±67.32	33	138.12±87.82	33	153.25±167.52			
p-value		0.4839		0.4497		0.1722			

AUC insulina (OGTT)							0.0932	0.0407	0.1747
Metformina	27	11192.41±6508.81	30	7207.16±2998.50	24	7508.04±3814.90			
Linagliptina/metformina	27	9923.63±4297.27	33	10302.5±5905.09	33	10027.52±5166.74			
p-value	0.4223		0.0096						
AIR (DIO_30/DG0_30)							0.1970	0.5492	0.0069
Metformina	24	1.10±0.78	30	0.88±0.53	24	0.95±0.72			
Linagliptina/metformina	27	0.76±0.58	33	1.95±3.79	33	1.05±0.76			
p-value	0.0823		0.1138		0.0386				
Oral-DI (AIR*1/insulin)							0.00001	0.7557	0.0945
Metformina	24	0.10±0.12	30	0.13±0.08	24	0.08±0.17			
Linagliptina/metformina	27	0.06±0.05	33	0.21±0.35	33	0.11±0.06			
p-value	0.0985		0.2087		0.3589				
Secreción de insulina (AUCins0-120/AUCgluc0-120)							0.9448	0.0203	0.0860
Metformina	24	0.56±0.32	30	0.41±0.17	24	0.42±0.21			
Linagliptina/metformina	27	0.48±0.22	33	0.61±0.33	33	0.57±0.28			
p-value	0.3145		0.0028		0.0276				
β-Cell function₁ (Matsuda*(AUCins₀₋₁₂₀/AUCgluc₀₋₁₂₀))							0.0239	0.4901	0.6463
Metformina	24	2.90±1.10	30	5.45±3.67	24	6.20±8.01			
Linagliptina/metformina	24	2.89±1.52	33	7.64±5.93	33	5.27±2.56			
p-value	0.9957		0.0775		0.5853				
β-Cell function₂ (Matsuda*(IncAUCins₀₋₁₂₀/IncAUCgluc₀₋₁₂₀))							0.00001	0.2254	0.3843

Metformina	24	1.28±0.54	30	1.78±0.60	24	1.75±0.85			
Linagliptina/metformina	27	1.10±0.29	33	2.03±0.79	33	1.92±0.49			
p-value		0.1666		0.1516		0.3886			
Colesterol total (mg/dl)							0.9000	0.2047	0.3591
Metformina	35	184.26±36.83	44	187.69±36.57	28	190.79±33.17			
Linagliptina/metformina	27	179.50±33.13	33	171.83±35.62	35	175.71±38.84			
p-value		0.5972		0.0870		0.1018			
HDL-c (mg/dl)							0.0255	0.7554	0.3012
Metformina	34	37.95±13.63	44	40.82±12.52	28	42.54±11.20			
Linagliptina/metformina	27	38.30±8.57	32	45.06±30.64	35	46.51±12.15			
p-value		0.8973		0.1863		0.1824			
Triglicéridos (mg/dl)							0.4477	0.7516	0.2770
Metformina	35	156.17±70.17	44	165.11±67.85	28	193.61±154.40			
Linagliptina/metformina	27	173.08±69.75	33	144.10±114.38	35	163.06±84.91			
p-value		0.3346		0.3000		0.3530			

Contraste dependiente con t-test. **M**= Metformina y **LM**= Linagliptina + metformina. PAS= presión arterial sistólica, PAD= Presión arterial diastólica, IMC= índice de masa corporal, CC= circunferencia de cintura, CCad= circunferencia de cadera, AUC= área bajo la curva, IncAUC= incremento del área bajo la curva, OGTT= curva de tolerancia oral a la glucosa, AIR= índice de respuesta aguda de insulina, HOMA-IR= homeostasis model assessment for insulin resistance, HOMA-B= homeostasis model assessment beta-cell, Oral_DI= índice de disposición a la insulina, HDL-c= lipoproteínas de alta densidad, LDL-c= lipoproteínas de baja densidad, VLDL-c= lipoproteínas de muy baja densidad. *p<0.05. **p<0.05.

Tabla 7. ANOVA de dos vías para los grupos de tratamiento.

ANOVA de una vía para grupos de tratamiento por tipo de fármaco y mes de seguimiento.

Posteriormente contrastamos los grupos por tratamiento farmacológico y mes de seguimiento, para este fin se utilizó un ANOVA de una vía para mostrar diferencias significativas entre los grupos. Los índices de sensibilidad y RI fueron mejores para el grupo de sujetos tratados con M durante 12 meses. Por el contrario, los índices de función de las células β pancreáticas fueron más altos en los sujetos tratados con LM a los seis meses de seguimiento. Además, las características antropométricas evaluadas mostraron cambios en los diferentes meses de intervención. La disminución del IMC en ambos tratamientos fue menor en los grupos M a los seis meses y LM a los 12 meses de seguimiento. El mismo comportamiento ocurrió con el porcentaje de grasa; ambos en comparación con el grupo basal (Tabla 8).

Variables	N	Basal	M		M		LM		LN		p-value
			N	(6 meses)	N	(12 meses)	N	(6 meses)	N	(12 meses)	
Edad (años)	65	44.08±11.37 ^c	44	47.05±10.89 ^{b,c}	28	44.47±12.82 ^c	33	49.79±8.33 ^a	35	50.26±11.26 ^a	0.089
PAS (mmHg)	65	123.90±17.93 ^a	44	114.00±14.20 ^b	28	116.93±14.59 ^b	32	119.91±16.41 ^a	33	114.85±15.69 ^b	0.008
PAD (mmHg)	65	80.90±11.50 ^a	44	75.09±9.03 ^{b,c}	28	75.44±8.48 ^{b,c}	32	79.76±10.94 ^a	33	71.65±12.06 ^c	0.0001
Características antropométricas											
Peso (kg)	65	82.55±18.57 ^a	44	71.49±13.22 ^{b,c}	28	76.91±17.78 ^a	33	76.15±15.56 ^{b,c}	35	71.67±11.98 ^c	0.001
IMC (kg/m ²)	65	32.02±6.79 ^a	44	27.11±4.28 ^c	28	29.56±4.98 ^b	33	29.01±4.71 ^b	35	27.36±3.51 ^{b,c}	0.0001
CC (cm)	61	97.64±13.58 ^a	44	86.84±13.69 ^b	28	92.99±11.52 ^a	33	92.95±11.05 ^a	31	88.55±9.08 ^b	0.001
Grasa corporal (%)	64	38.30±8.81 ^a	44	31.81±8.20 ^c	27	36.37±6.89 ^{a,b}	33	36.57±8.08 ^{a,b}	35	33.44±7.83 ^{b,c}	0.003
Grasa visceral (AU)	54	9.97±3.99	42	8.39±3.73	25	9.68±4.47	20	9.62±3.60	33	8.96±2.98	0.275
Características bioquímicas											
Índice de Matsuda	51	2.45±2.03 ^c	30	4.96±2.57 ^b	24	5.22±3.57 ^{a,b}	33	4.74±0.378 ^b	33	4.17±2.51 ^b	0.0001
HOMA-IR	52	4.35±3.94 ^a	30	2.45±3.54 ^b	24	2.28±1.53 ^b	33	3.03±2.29 ^b	33	2.33±1.37 ^b	0.0001
AIR (<i>DIO_30/DGO_30</i>)	51	0.72±0.70 ^b	30	0.88±0.53 ^b	24	0.95±0.72 ^b	33	1.95±3.79 ^a	33	1.05±0.76 ^b	0.023
Oral_DI (<i>AIR*1/insulin</i>)	51	0.06±0.09 ^c	30	0.13±0.08 ^b	24	0.08±0.17 ^b	33	0.21±0.35 ^{a,b}	33	0.11±0.06 ^b	0.0001
Secreción de insulina	51	0.445±0.28 ^b	30	0.41±0.17 ^b	24	0.42±0.21 ^b	33	0.61±0.33 ^a	33	0.57±0.28 ^a	0.029
β-Cell function ₁	51	2.63±1.20 ^c	30	5.45±3.67 ^b	24	6.20±8.01 ^b	33	7.64±5.93 ^a	33	5.27±2.56 ^b	0.018
β-Cell function ₂	51	1.09±0.43 ^c	30	1.78±0.60 ^b	24	1.75±0.85 ^b	33	2.03±0.79 ^a	33	1.92±0.49 ^b	0.0001

Contrastes independientes con t-test. **M=** Metformina y **LM=** Linagliptina + metformina. PAS= presión arterial sistólica, PAD= Presión arterial diastólica, IMC= índice de masa corporal, CC= circunferencia de cintura, CCad= circunferencia de cadera, AUC= área bajo la curva, IncAUC= incremento del área bajo la curva, OGTT= curva de tolerancia oral a la glucosa, AIR= índice de respuesta aguda de insulina, HOMA-IR= homeostasis model assessment for insulin resistance, HOMA-B= homeostasis model assessment beta-cell, Oral_DI= índice de disposición a la insulina, HDL-c= lipoproteínas de alta densidad, LDL-c= lipoproteínas de baja densidad, VLDL-c= lipoproteínas de muy baja densidad. *p<0.05. **p<0.05.

Table 8. Contrastes entre grupos de tratamiento farmacológico.

Contrastes entre grupos de fármacos antidiabéticos durante el seguimiento.

Al comparar los fármacos antidiabéticos a los 6 meses de seguimiento, el grupo LM mostró mejoras significativas en el AUC de insulina (7207.16 ± 2998.50 vs 10302.5 ± 5905.09 , Δ de Glass= 0.6953, $p=0.0096$) y la secreción de insulina (0.41 ± 0.17 vs 0.61 ± 0.33 , Δ de Glass= 0.8, $p=0.0028$) (Tabla 9).

Variables	N	M (6 meses)	N	LM (6 meses)	SE (Cohen's D)	p- value
Edad (años)	44	47.05±10.89	33	49.79±8.33	0.2851	0.2541
PAS (mmHg)	44	114.00±14.20	32	119.91±16.41	0.3861	0.0981
PAD (mmHg)	44	75.09±9.03	32	79.76±10.94	0.4677	0.0528
Características antropométricas						
Peso (kg)	44	71.49±13.22	33	76.15±15.56	0.3238	0.1359
IMC (kg/m ²)	44	27.11±4.28	33	29.01±4.71	0.4227	0.0574
CC (cm)	44	86.84±13.69	33	92.95±11.05	0.4939	0.0685
CCad (cm)	44	101.72±9.98	33	103.98±10.77	0.2178	0.3272
Índice de cintura/cadera	44	0.86±0.11	33	0.90±0.09	0.4	0.1291
Grasa corporal (%)	44	31.81±8.20	33	36.57±8.08	0.5848	0.0209*
Grasa visceral (AU)	42	8.39±3.73	20	9.62±3.60	0.3356	0.1659
Características bioquímicas						
Glucosa en ayuno (mg/dl)	44	95.11±9.95	33	92.96±9.02	0.2267	0.3979
Glucosa a los 120 min de la OGTT (mg/dl)	44	129.93±40.85	33	134.01±29.50	0.1159	0.6358
HbA1c (%)	40	5.51±0.47	32	5.46±0.26	0.1369	0.5889
AUC glucosa (OGTT)	41	17475.56±3795	33	17361.77±3543.93	0.0310	0.8935
Índice de Matsuda	30	4.96±2.57	33	4.74±0.378	0.1492	0.7833
HOMA-IR	30	2.45±3.54	33	3.03±2.29	0.1989	0.4442
QUICKI	30	0.35±0.03	33	0.34±0.04	0.2857	0.3420
HOMA-B	30	110.97±176.52	33	138.12±87.82	0.2054	0.4497
AUC insulina (OGTT)	30	7207.16±2998.50	33	10302.5±5905.09	0.6953	0.0096*
AIR (DI0_30/DG0_30)	30	0.88±0.53	33	1.95±3.79	0.4954	0.1138
Oral_DI (AIR*1/insulin)	30	0.13±0.08	33	0.21±0.35	0.3721	0.2087
Secreción de insulina (AUCins0-120/AUCgluc0-120)	30	0.41±0.17	33	0.61±0.33	0.8	0.0028*
β -Cell function ₁ (Matsuda*(AUCins ₀₋₁₂₀ /AUCgluc ₀₋₁₂₀))	30	5.45±3.67	33	7.64±5.93	0.4563	0.0775
β -Cell function ₂ (Matsuda*(IncAUCins ₀₋₁₂₀ /IncAUCgluc ₀₋₁₂₀))	30	1.78±0.60	33	2.03±0.79	0.3597	0.1516
Colesterol total (mg/dl)	44	187.69±36.57	33	171.83±35.62	0.4394	0.0870
HDL-c (mg/dl)	44	40.82±12.52	32	45.06±30.64	0.1965	0.1863
Triglicéridos (mg/dl)	44	165.11±67.85	33	144.10±114.38	0.2306	0.3000

Contraste dependiente con t-test. **M**= Metformina y **LM**= Linagliptina + metformina. PAS= presión arterial sistólica, PAD= Presión arterial diastólica, IMC= índice de masa corporal, CC= circunferencia de cintura, CCad= circunferencia de cadera, AUC= área bajo la curva, IncAUC= incremento del área bajo la curva, OGTT= curva de tolerancia oral a la glucosa, AIR= índice de respuesta aguda de insulina, HOMA-IR= homeostasis model assessment for insulin resistance, HOMA-B= homeostasis model assessment beta-cell, Oral_DI= índice de disposición a la insulina, HDL-c= lipoproteínas de alta densidad, LDL-c= lipoproteínas de baja densidad, VLDL-c= lipoproteínas de muy baja densidad. * $p<0.05$. ** $p<0.05$.

Tabla 9. Contraste entre grupos con tratamiento farmacológico a los 6 meses de seguimiento.

Contrastes entre grupos de tratamiento farmacológico a los 12 meses.

Al establecer diferencias entre tratamientos farmacológicos a los 12 meses, se observó que el IMC [C-d 0.518 (0.025-1.037), $p= 0.0461$] y la circunferencia de cadera [C-d 0.6361 (0.119-1.168), $p= 0.0173$] eran menores en los pacientes que fueron tratados con LM. Por el contrario, el AUC de insulina (OGTT) [C-d 0.5610 (0.056-1.131), $p= 0.0386$] y la secreción de insulina (AUCins0-120/AUCgluc0-120) [C-d 0.6122 (0.091-1.169), $p= 0.0276$] fueron mayores para el grupo de tratamiento con LM. El índice de Matsuda fue mayor en el grupo tratado con metformina [C-d 0.3454 (0.224-0.834)] y las concentraciones de colesterol total fueron menores en el grupo de pacientes tratados con LM [C-d 0.4188 (0.069-0.936)] (Tabla 10).

Variables	N	M (12 meses)	N	LM (12 meses)	SE (Cohen's D)	p-value
Edad (años)	28	44.47±12.82	35	50.26±11.26	0.4809	0.1279
PAS (mmHg)	28	116.93±14.59	33	114.85±15.69	0.1374	0.5780
PAD (mmHg)	28	75.44±8.48	33	71.65±12.06	0.3690	0.1925
Características antropométricas						
Peso (kg)	28	76.91±17.78	35	71.67±11.98	0.3522	0.1639
IMC (kg/m ²)	28	29.56±4.98	35	27.36±3.51	0.5183	0.0461*
CC (cm)	28	92.99±11.52	31	88.55±9.08	0.4311	0.1060
CCad (cm)	28	106.72±11.58	31	100.26±8.73	0.6361	0.0173*
Índice de cintura/cadera	28	0.87±0.07	31	0.88±0.08	0.1333	0.5698
Grasa corporal (%)	27	36.37±6.89	35	33.44±7.83	0.3981	0.1432
Grasa visceral (AU)	25	9.68±4.47	33	8.96±2.98	0.1933	0.4695
Características bioquímicas						
Glucosa en ayuno (mg/dl)	28	95.75±11.17	35	93.29±7.92	0.2577	0.3292
Glucosa a los 120 min de la OGTT (mg/dl)	28	133.86±32.49	35	138.43±35.26	0.1349	0.5951
HbA1c (%)	26	5.52±0.40	34	5.47±0.26	0.1515	0.5403
AUC glucosa (OGTT)	26	17814.81±3393.29	35	17572.29±2764.35	0.0788	0.7668
Índice de Matsuda	24	5.22±3.57	33	4.17±2.51	0.3454	0.2248
HOMA-IR	24	2.28±1.53	33	2.33±1.37	0.0345	0.8668
QUICKI	24	0.35±0.04	33	0.35±0.03	0	0.6256
HOMA-B	24	108.68±66.09	33	153.25±167.52	0.3816	0.1722
AUC insulina (OGTT)	24	7508.04±3814.90	33	10027.52±5166.74	0.5610	0.0386*
AIR (DIO_30/DGO_30)	24	0.95±0.72	33	1.05±0.76	0.1351	0.6140
Oral_DI (AIR*1/insulin)	24	0.08±0.17	33	0.11±0.06	0.2609	0.3589
Secreción de insulina (AUCins0-120/AUCgluc0-120)	24	0.42±0.21	33	0.57±0.28	0.6122	0.0276*
β-Cell function ₁ (Matsuda*(AUCins0-120/AUCgluc0-120))	24	6.20±8.01	33	5.27±2.56	0.1759	0.5853
β-Cell function ₂ (Matsuda*(IncAUCins0-120/IncAUCgluc0-120))	24	1.75±0.85	33	1.92±0.49	0.2537	0.3886
Colesterol total (mg/dl)	28	190.79±33.17	35	175.71±38.84	0.4188	0.1018
HDL-c (mg/dl)	28	42.54±11.20	35	46.51±12.15	0.3400	0.1824
Triglicéridos (mg/dl)	28	193.61±154.40	35	163.06±84.91	0.255	0.3530

Contraste dependiente con t-test. **M**= Metformina y **LM**= Linagliptina + metformina. PAS= presión arterial sistólica, PAD= Presión arterial diastólica, IMC= índice de masa corporal, CC= circunferencia de cintura, CCad= circunferencia de cadera, AUC= área bajo la curva, IncAUC= incremento del área bajo la curva, OGTT= curva de tolerancia oral a la glucosa, AIR= índice de respuesta aguda de insulina, HOMA-IR= homeostasis model assessment for insulin resistance, HOMA-B= homeostasis model assessment beta-cell, Oral_DI= índice de disposición a la insulina, HDL-c= lipoproteínas de alta densidad, LDL-c= lipoproteínas de baja densidad, VLDL-c= lipoproteínas de muy baja densidad. *p<0.05. **p<0.05.

Tabla 10. Contraste entre grupos con tratamiento farmacológico a los 12 meses de seguimiento.

Sensibilidad a la insulina.

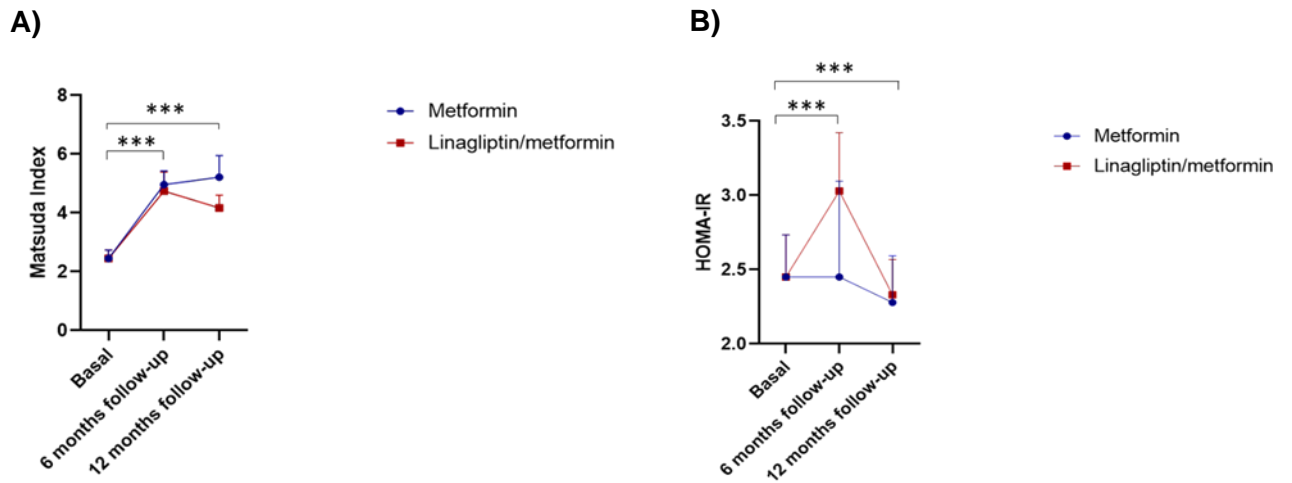


Figura 7. Índice de Matsuda y HOMA-IR basal, seis y 12 meses en los grupos M (A) y LM (B).

En estas graficas se puede observar que el grupo tratado con M tuvo un aumento significativo en el índice de sensibilidad a la insulina y una mayor reducción de la RI (medida a través de HOMA-IR); ambos índices fueron estadísticamente significativos en comparación con el grupo tratado con LM. Sin embargo, el grupo tratado con LM tuvo una mejor función de las células β pancreáticas en el seguimiento de seis meses en comparación con el grupo tratado con M. Este efecto coincide con el mecanismo de acción. Este fármaco aumenta la secreción de insulina y disminuye la secreción de glucagón con un comportamiento dependiente de la glucosa al inhibir la enzima DPP-4; esta enzima está implicada en la inactivación de las hormonas incretinas (Figura 8).

Función de la célula β pancreática.

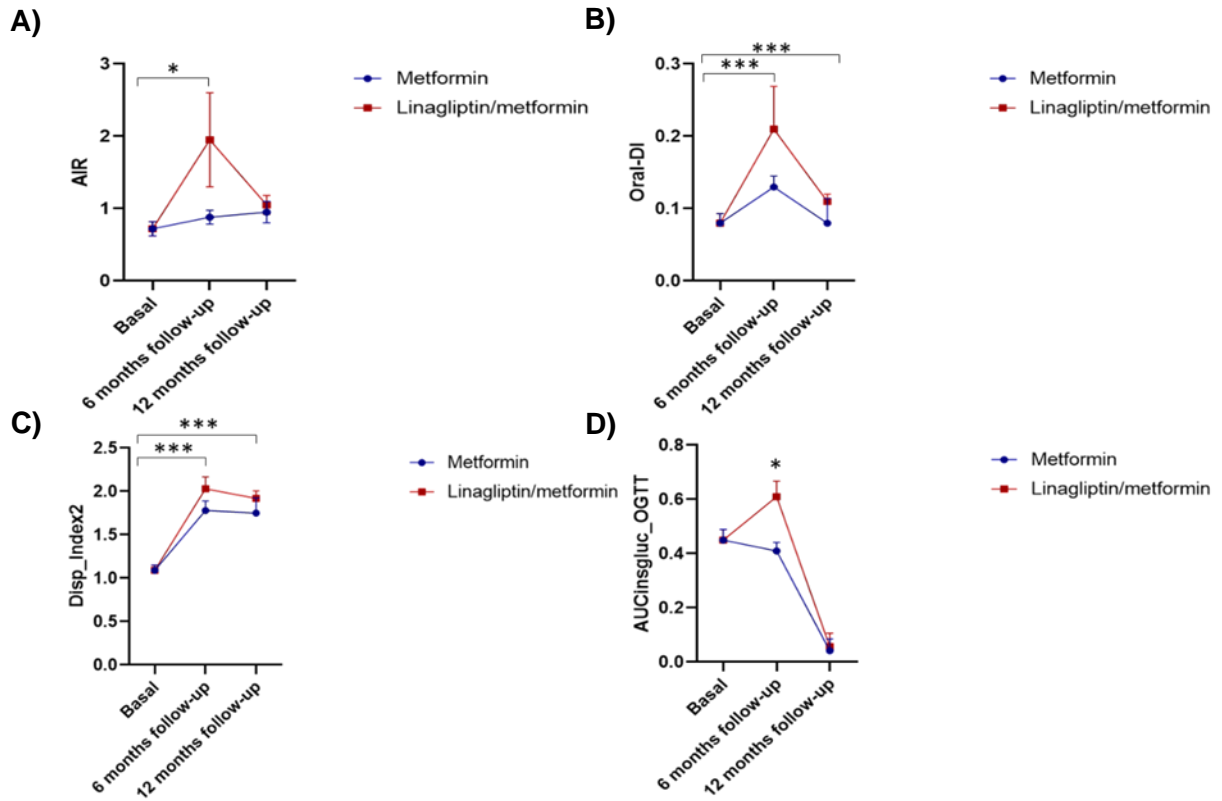


Figura 8. Función de las células β pancreáticas en los grupos basal, seis y 12 meses en los grupos M y LM. A) AIR, B) ORAL-DI, C) Disp_Index2 y D) AUCinsgluc_OGTT.

Niveles de glucosa e insulina durante la CTOG.

Los niveles de glucosa durante la CTOG mejoraron significativamente en el grupo M durante toda la CTOG. Sin embargo, los niveles de insulina durante la CTOG fueron más altos en el grupo LM en comparación con el grupo M (Figura 9).

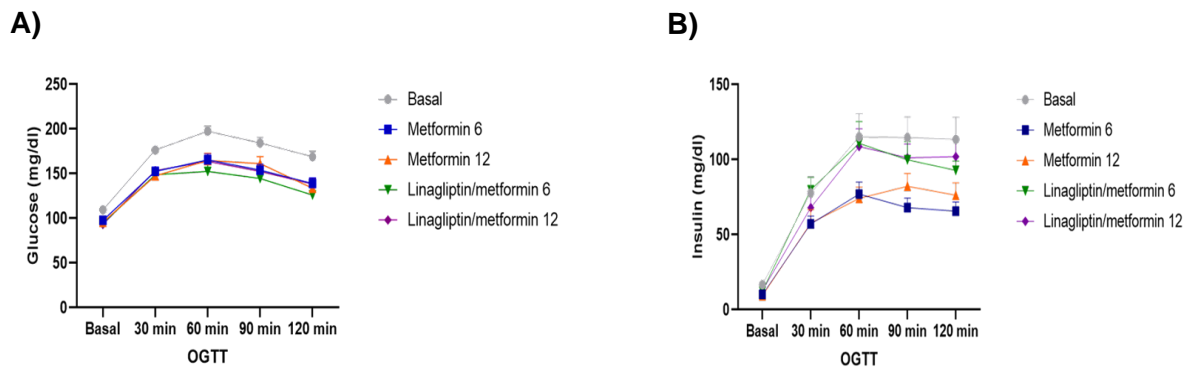


Figura 9. Niveles de glucosa e insulina durante la OGTT en los meses basal, seis y 12 en OGTT de glucosa (A) y OGTT de insulina (B).

D. Análisis de la microbiota intestinal.

La metformina y la linagliptina + metformina cambian la composición de la MI de sujetos con prediabetes.

Para analizar los cambios en la composición de la MI en pacientes con prediabetes tratados con M y LM, realizamos la secuenciación Illumina de las regiones V3 y V4 del gen 16S rRNA utilizando muestras fecales recolectadas en la condición basal, 6 y 12 en ambos tratamientos. En total, obtuvimos 6 216 877 secuencias de alta

calidad y 2887 unidades taxonómicas operativas (OTU) para el tratamiento M y 2316 para LM a partir de 206 muestras.

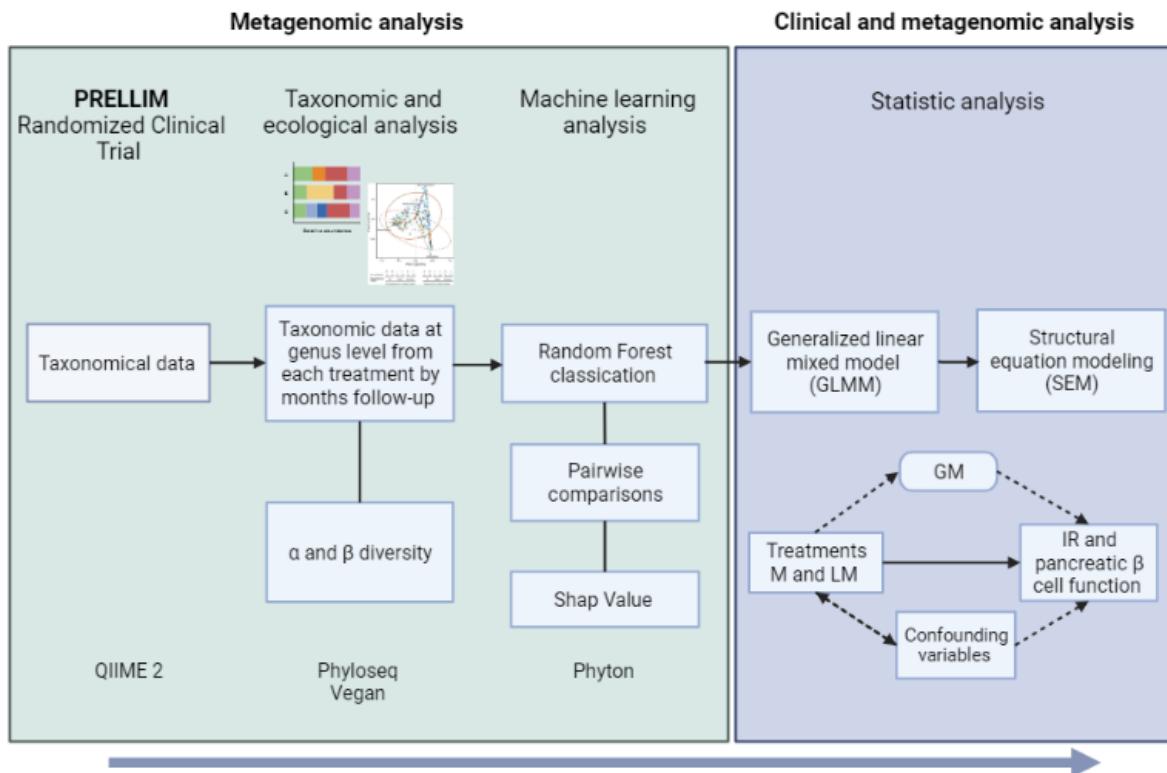


Figura 10. Diagrama esquemático del procedimiento usado para el análisis clínico y metagenómico de los datos. Consta de análisis taxonómico y ecológico, algoritmo de Machine Learning, modelos lineales generalizados mixtos y modelo de ecuaciones estructurales.

Las secuencias obtenidas en la secuenciación se procesaron mediante la plataforma de análisis QIIME2 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology). La clasificación taxonómica para las variantes de secuencia final se realizó utilizando la base de datos SILVA (versión 132). El análisis de la MI se realizó mediante el objeto phyloseq; a través de este objeto se obtuvo la diversidad α y β de los grupos de estudio en los diferentes meses de seguimiento. Posteriormente, con la abundancia de los diferentes géneros bacterianos, se obtuvieron los géneros que clasifican cada tratamiento farmacológico en los diferentes meses de seguimiento

mediante los algoritmos de aprendizaje automático (Random Forest). Una vez identificadas las bacterias que clasificaron a los sujetos con tratamiento M y LM, se realizaron modelos de regresión lineal jerárquica para eliminar el efecto de las variables de confusión (obesidad, edad y género). Además, modelos lineales generalizados mixtos y finalmente análisis de mediación utilizando modelos de ecuaciones estructurales (Figura 10).

Análisis de diversidad α y β .

La diversidad α de la comunidad de la MI disminuyó con los tratamientos para todos los índices. Sin embargo, no mostró cambios estadísticamente significativos, lo que indica que tanto la M como la LM reducen la diversidad y que no hay un impacto superior de la terapia combinada (Figura 11). El análisis de componentes principales (PCA) y el análisis de coordenadas principales (PCoA) basados en la distancia de Jaccard mostraron que tanto la M como la LM no cambiaron significativamente la estructura de la MI de los pacientes con prediabetes (Figura 12).

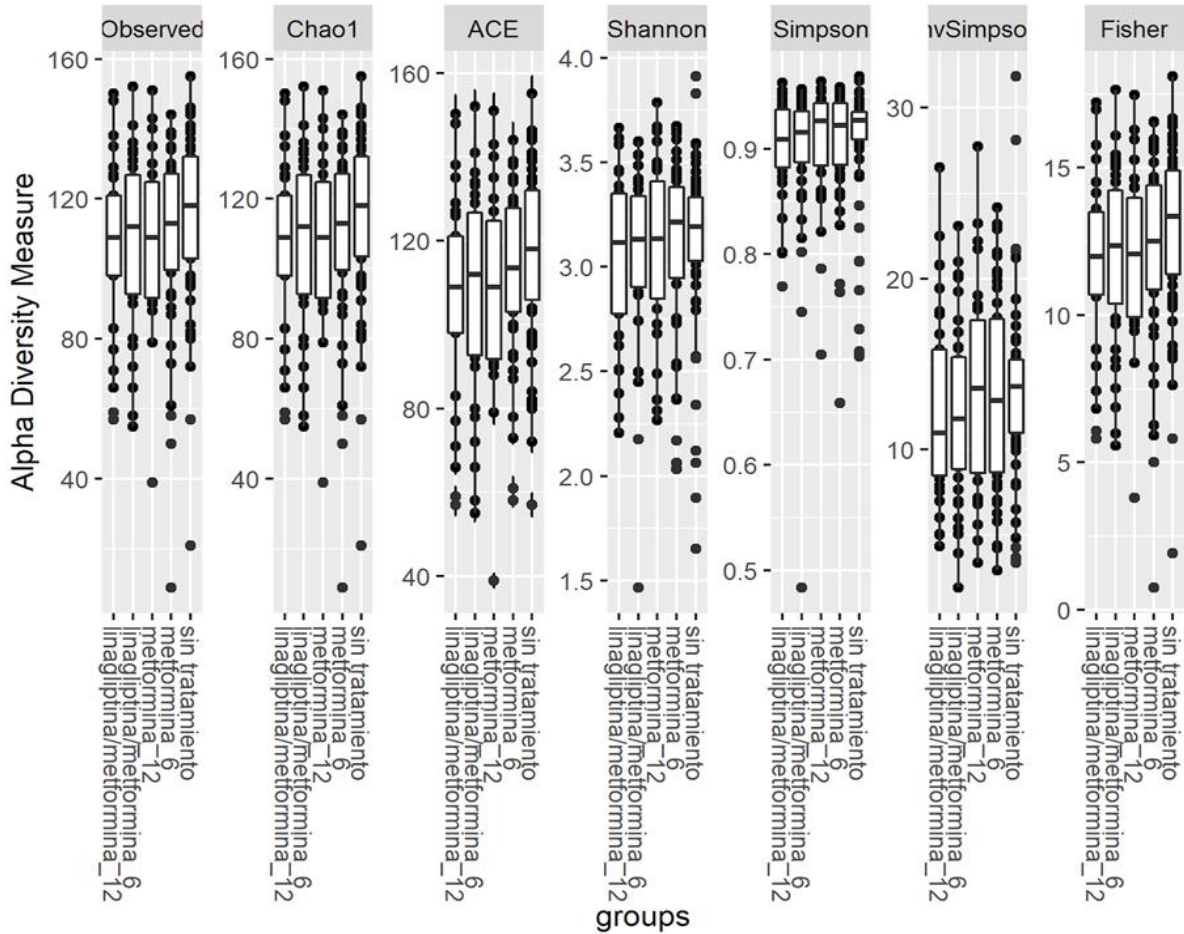


Figura 11. Análisis de la diversidad α . El análisis de diversidad α con chao1, ACE, Shannon, Simpson, InvSimpson y Fisher, mostró que no existen diferencias significativas entre los distintos grupos a nivel de diversidad de bacterias.

El análisis de diversidad β se realizó con distancias de Jaccard y grafico de NMDS. NMDS es una técnica multivariante de interdependencia que trata de representar en un espacio geométrico de pocas dimensiones a las proximidades existentes entre un conjunto de objetos. Estos resultados muestran que a partir de la diversidad microbiana entre los grupos de análisis no podemos definir ningún patrón de agrupación (Figura 12).

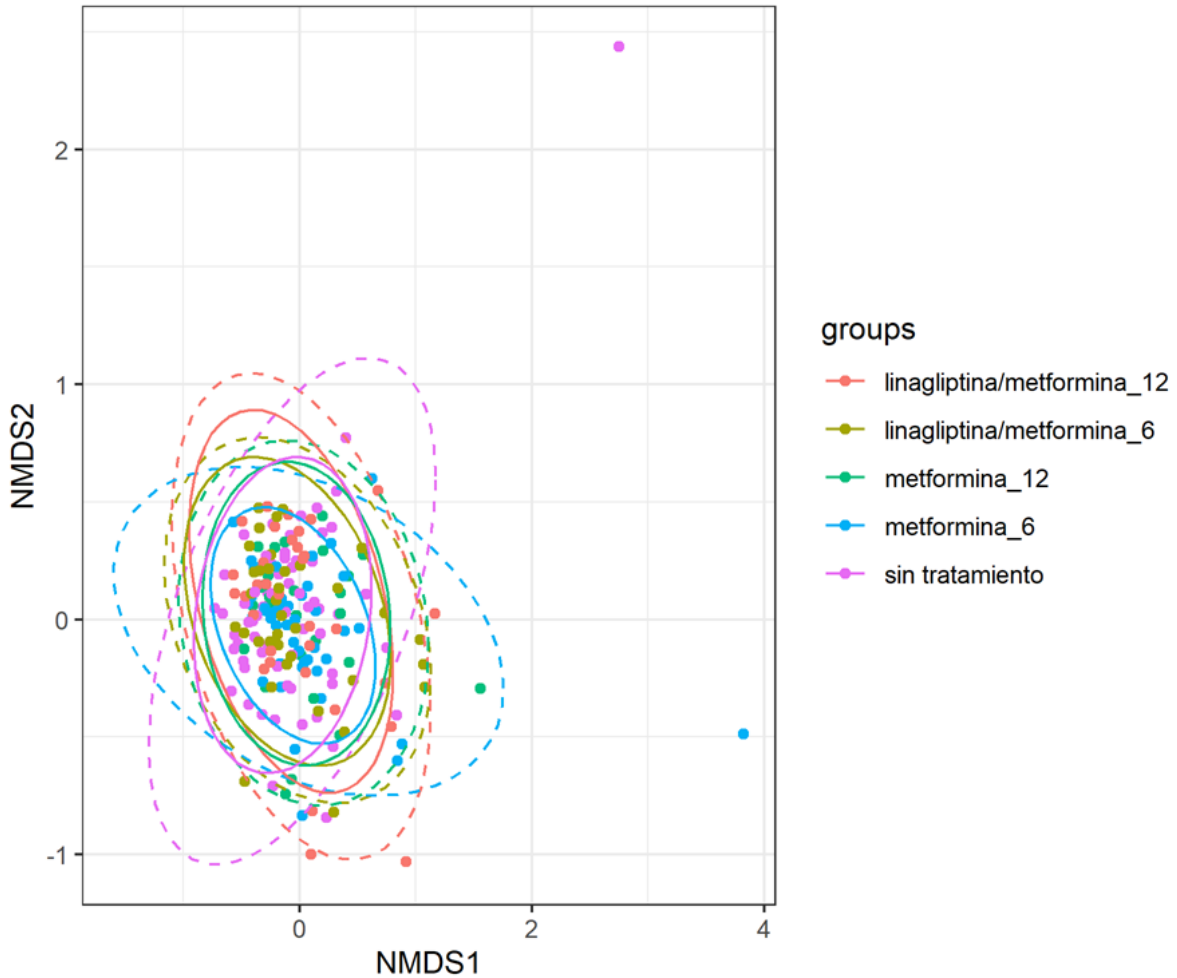


Figura 12. Análisis de diversidad β . El análisis de diversidad β con distancias de Jaccard y gráfico de NMDS muestran que a partir de la diversidad microbiana entre los grupos de análisis no es posible definir ningún patrón de agrupación.

Análisis de Machine Learning.

Los fármacos antidiabéticos modificaron la composición de la MI a los 6 y 12 meses de seguimiento, y esta estructura fue diferente entre fármacos. Nosotros utilizamos el algoritmo de Machine Learning (Random Forest) para realizar una comparación por pares entre los grupos basal vs ambos tratamientos (M y LM) y entre fármacos (M vs LM) considerando en ambas comparaciones los meses de seguimiento (6 y

12). Posteriormente, exploramos la relevancia del proceso de clasificación a través del valor SHAP para cada género; el shap es un valor numérico que varía de valores positivos a negativos y cuantifica la contribución de los géneros a la clasificación.

Inicialmente se comparó el grupo basal con el grupo M a los seis y 12 meses de seguimiento; el promedio de AUC fue de 0,79 y 0,74, respectivamente, lo que demuestra que los modelos seleccionaron adecuadamente los conjuntos de datos de entrenamiento y prueba (Tabla 11). Al comparar los resultados obtenidos del método de validación cruzada, identificamos tres géneros bacterianos relevantes para clasificar sujetos con prediabetes tratados durante seis meses con M. Estos géneros fueron *Fusicatenibacter*, *Blautia*, [*Ruminococcus*] *gauvreauii* group, todos productores de AGCC (Figura 13 A). En cambio, para el grupo M con 12 meses de seguimiento, identificamos 8 géneros bacterianos productores de AGCC relevantes; *Fusicatenibacter*, *Atopobiaceae_uncultured*, *Coprococcus 1*, *Lachnospiraceae ND3007 group*, *Anaerostipes*, *Dorea*, *Lachnospiraceae FCS020 group*, y *Blautia* (Figura 13 B). El efecto de la metformina a los 12 meses de seguimiento sugiere ser acumulativo en función del tiempo ya que reestructura la composición de la MI que favorece el incremento en la abundancia de géneros productores de AGCC. Por otra parte, nosotros observamos que en la comparación con 6 meses de seguimiento con M: los géneros *Subdoligranulum*, *Ruminococcaceae_DTU089*, *Catabacter*, *Ruminiclostridium 5* y *Escherichia-Shigella* clasifican al grupo basal, todos patógenos oportunistas e involucrados en el desarrollo de la diabetes (Figura 13 A). Posteriormente, comparamos el grupo basal con el grupo LM a los seis y 12 meses de seguimiento; el AUC medio fue de 0,6 y 0,66, respectivamente. Identificamos 7 géneros bacterianos relevantes para clasificar sujetos con seis meses de tratamiento con LM. Estos géneros fueron *Barnesiella*, *Coprococcus 1*, *Rhotia*, *Roseburia*, [*Eubacterium*] *hallii* group, *Coprococcus 2*, y *Bifidobacterium*. Además, se mantiene *Escherichia-Shigella* como género que clasifica al grupo basal. A los 12 meses de seguimiento con LM identificamos 2 géneros bacterianos relevantes y que se mantienen desde los 6 meses de seguimiento; [*Eubacterium*] *hallii* group, y *Blautia*. Asimismo, *Fusicatenibacter*, *Lachnospiraceae FCS020 group*, y *Enterorhabdus* son característicos en el grupo con LM, todos los géneros son

productores de AGCC (Figura 13 C y 13 D). Los sujetos con tratamiento farmacológico incrementan la abundancia de géneros productores de AGCC y disminuyen géneros patógenos con respecto al grupo basal.

Por otra parte, nosotros identificamos los géneros bacterianos que clasifican para ambos tratamientos antidiabéticos a los 6 y 12 meses de seguimiento. En la comparación M vs LM el AUC promedio fue de 0,66 y 0,74, respectivamente (Tabla 11). En la comparación entre tratamientos a los 6 meses de seguimiento encontramos que *Rothia*, *[Eubacterium]* *Ruminantium* *group*, *Christensenellaceae_uncultured*, *Ruminiclostridium* 5, *Turicibacter*, *Ruminococcaceae* *UCG-002*, *Barnesiella*, *Clostridium Sensu Stricto* 1, y *Oscillibacter* clasifican para el grupo LM (Figura 13 E). En cambio, a los 12 meses de seguimiento con LM clasifican *Enterobacteriaceae*, *Holdemania*, y *Christensenellaceae_uncultured* (Figura 13 F). Curiosamente, nosotros observamos que el cambio de composición producido por LM a los 6 y 12 meses con respecto a la M es mayor en bacterias patógenas e involucradas en el desarrollo de DM2. Los géneros productores de AGCC favorecen a la clasificación de los sujetos que consumieron metformina sin importar el mes de seguimiento.

Grupo	Precisión	AUC	Precisión media	DE (CV=5)	AUC media	DE (CV=5)
Basal vs M 6 meses	0.66	0.75	0.69	0.02	0.79	0.04
Basal vs LM 6 meses	0.59	0.66	0.65	0.13	0.60	0.12
Basal vs M 12 meses	0.59	0.60	0.68	0.07	0.74	0.07
Basal vs LM 12 meses	0.73	0.74	0.65	0.4	0.66	0.13
M 6 meses vs LM 6 meses	0.73	0.76	0.63	0.15	0.66	0.18
M 12 meses vs LM 12 meses	0.75	0.75	0.65	0.1	0.74	0.11

Tabla 11. Rendimiento de los algoritmos de Machine Learning. Comparamos el rendimiento de las comparaciones por tratamiento farmacológico y mes de seguimiento utilizando los valores de precisión y AUC. Para obtener la desviación estándar en nuestros resultados, utilizamos la técnica de validación cruzada estratificada (K Fold = 10).

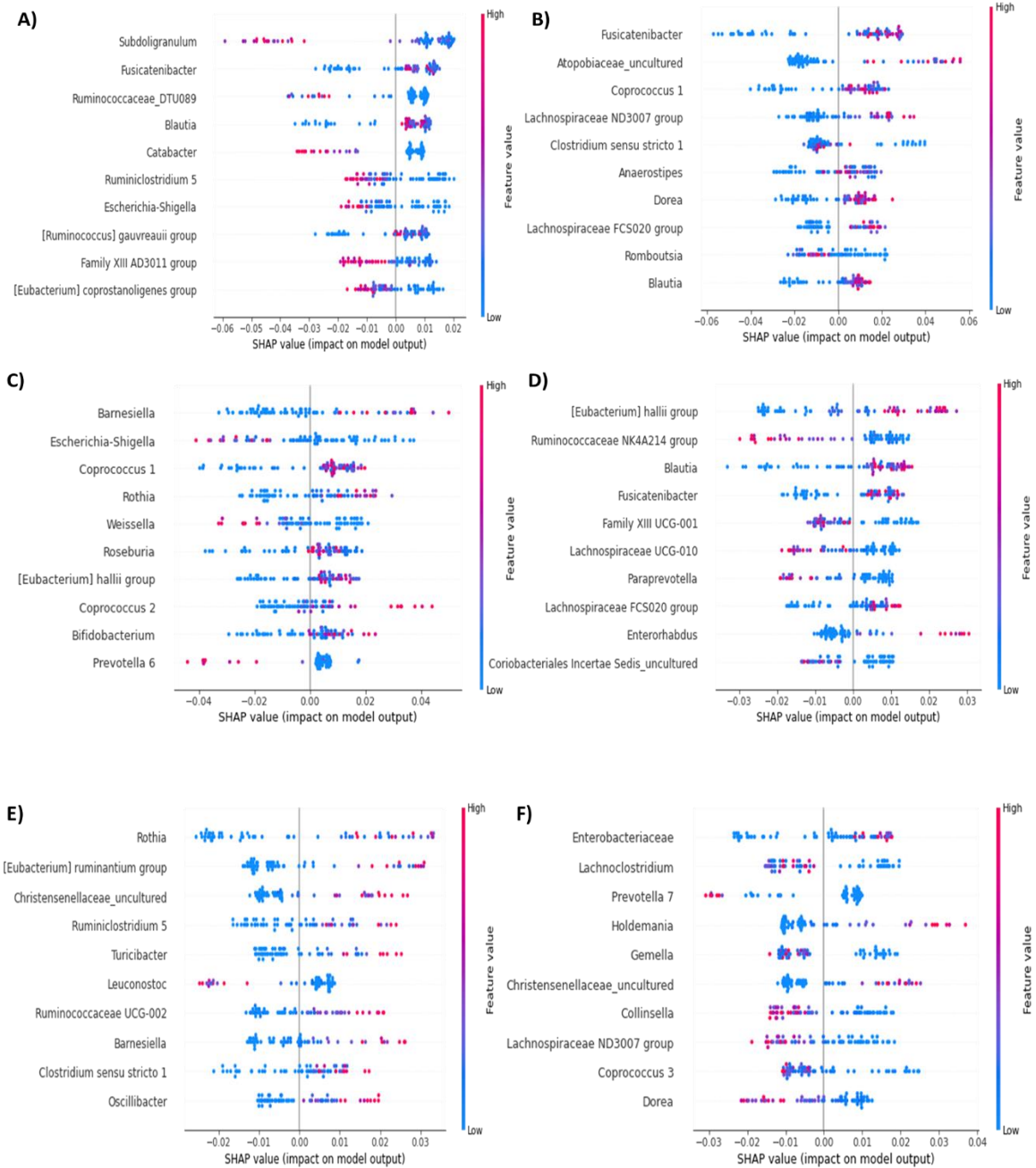


Figura 13. Gráfico SHAP para cada tratamiento farmacológico y mes de seguimiento. En los paneles de la figura representamos los primeros 10 genus bacterianos con mayor contribución a la clasificación de los pacientes sin tratamiento farmacológico (basal) y los tratados con M y LM a los 6 y 12 meses de seguimiento. Hemos ordenado los genus bacterianos de mayor a menor relevancia de arriba a abajo. Los colores azul y rojo representan una abundancia baja y alta de

genus bacterianos, respectivamente. Los valores positivos mayores en el eje SHAP establecen la relevancia de los genus bacterianos para clasificar a los pacientes con tratamiento farmacológico (M o LM) a los 6 o 12 meses de seguimiento, mientras que los valores negativos establecen la relevancia de los genus bacterianos para los pacientes con prediabetes sin tratamiento. A) Basal vs Metformina con 6 meses de seguimiento. B) Basal vs Metformina con 12 meses de seguimiento. C) Basal vs Linagliptina/metformina con 6 meses de seguimiento. D) Basal vs Linagliptina/metformina con 12 meses de seguimiento. E) Metformina vs Linagliptina/metformina con 6 meses de seguimiento. F) Metformina vs Linagliptina/metformina con 12 meses de seguimiento.

Los fármacos antidiabéticos y el cambio en la condición clínica-metabólica explican el incremento en la sensibilidad a la insulina y la función de las células β pancreáticas.

Modelos lineales generalizados mixtos (MLGM).

Una vez identificados los géneros que clasifican para los grupos sin tratamiento (basal), M y LM. Realizamos modelos lineales generalizados mixtos para los índices de sensibilidad y secreción de insulina con los genus seleccionados e identificados por el algoritmo de Machine Learning. Los modelos se ajustaron por mes de seguimiento, tratamiento farmacológico, sexo, edad, IMC, los genus bacterianos que ayudan a clasificar a los sujetos con tratamiento M y LM. Se identificaron 35 genus estadísticamente significativos (Figura 14).

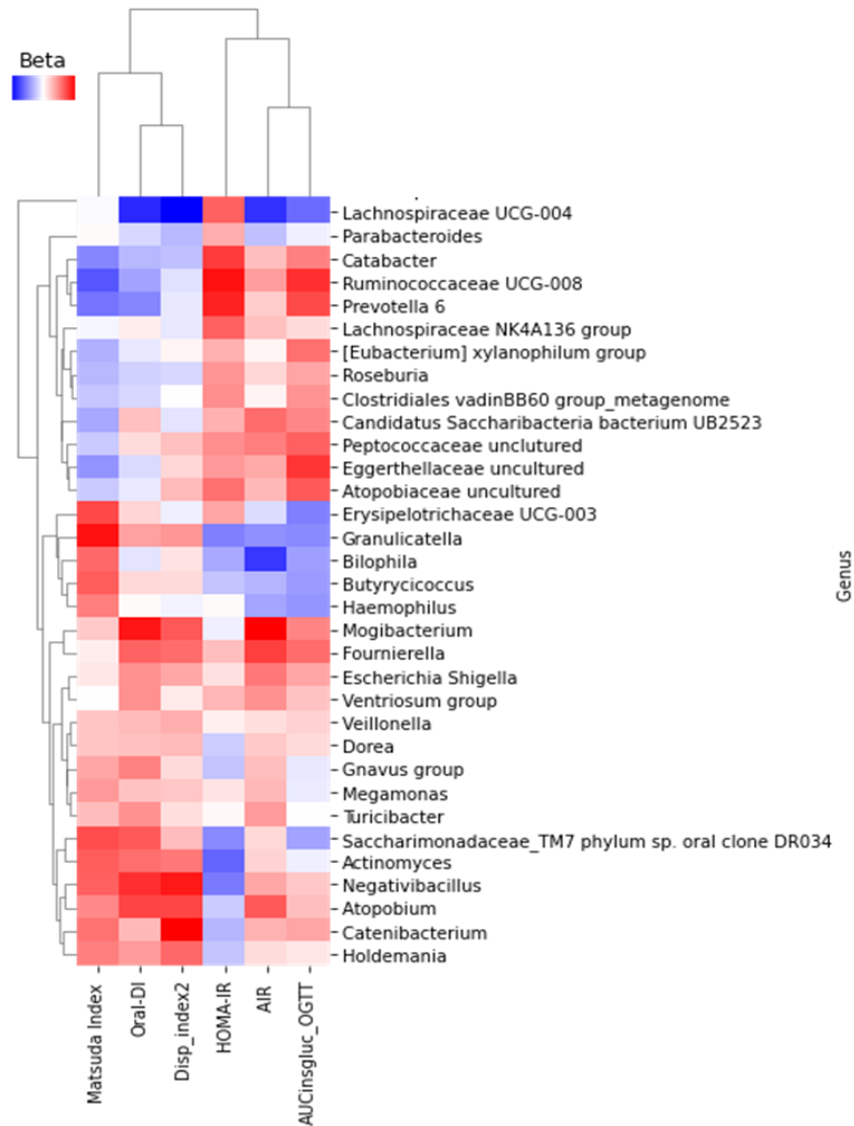


Figura 14. Heatmap resultante del análisis de los modelos lineales generalizados mixtos. La escala de color representa el coeficiente β de los MLGM, cuando es rojo representa una β positiva y negativa cuando es azul. Todas las bacterias representadas en el heatmap son estadísticamente significativas.

En la tabla siguiente se pueden observar con precisión los valores de β , error estándar, significancia estadística, el tamaño del efecto por eta-cuadrada y su intervalo de confianza de las bacterias que contribuyen a explicar los índices de RI y secreción de las células β pancreáticas (Tabla 12).

Fixed effects	β	SE	p-value	95% CI		Eta-Squared	95%CI	
Matsuda Index								
<i>Roseburia</i>	-0.042	0.022	0.050	-0.084	0.001	0.023	0.0001	0.094
<i>Erysipelotrichaceae UCG-003</i>	0.048	0.022	0.031	0.005	0.091	0.021	0.0001	0.089
<i>Butyrivibrio</i>	0.041	0.020	0.044	0.001	0.080	0.027	0.0001	0.099
<i>[Eubacterium] xylanophilum group</i>	-0.045	0.022	0.043	-0.089	-0.001	0.029	0.0001	0.104
<i>Saccharimonadaceae_TM7 phylum sp. oral clone DR034</i>	0.047	0.023	0.041	0.002	0.093	0.028	0.0001	0.103
<i>Eggerthellaceae uncultured</i>	-0.055	0.028	0.049	-0.109	-0.001	0.024	0.0001	0.095
<i>Granulicatella</i>	0.066	0.028	0.019	0.011	0.120	0.034	0.0001	0.113
<i>Ruminococcaceae UCG-008</i>	-0.076	0.037	0.039	-0.148	-0.004	0.027	0.0001	0.099
<i>Prevotella 6</i>	-0.066	0.030	0.030	-0.126	-0.006	0.031	0.0001	0.108
<i>Catabacter</i>	-0.060	0.029	0.040	-0.117	-0.003	0.032	0.0001	0.110
HOMA-IR								
<i>Clostridiales vadinBB60 group metagenome</i>	0.061	0.030	0.040	0.003	0.119	0.006	0.0001	0.057
<i>Lachnospiraceae NK4A136 group</i>	0.052	0.026	0.049	0.0001	0.103	0.026	0.0001	0.099
<i>Saccharimonadaceae_TM7 phylum sp. oral clone DR034</i>	-0.055	0.028	0.048	-0.109	-0.001	0.026	0.0001	0.098
<i>Actinomyces</i>	-0.069	0.025	0.005	-0.118	-0.021	0.052	0.004	0.139
<i>Negativibacillus</i>	-0.061	0.030	0.043	-0.119	-0.002	0.027	0.0001	0.100
<i>Prevotella 6</i>	0.074	0.036	0.040	0.003	0.145	0.028	0.0001	0.103
AIR								
<i>Bilophila</i>	-0.070	0.028	0.013	-0.126	-0.015	0.038	0.0001	0.119
<i>Mogibacterium</i>	0.086	0.030	0.004	0.027	0.145	0.057	0.005	0.148
<i>Lachnospiraceae UCG-004</i>	-0.072	0.035	0.037	-0.140	-0.004	0.031	0.0001	0.108
<i>Fournierella</i>	0.067	0.032	0.038	0.004	0.130	0.030	0.0001	0.107
ORAL-DI								
<i>Escherichia Shigella</i>	0.042	0.016	0.009	0.011	0.074	0.017	0.0001	0.083
<i>Veillonella</i>	0.032	0.016	0.038	0.002	0.063	0.007	0.0001	0.060
<i>Megamonas</i>	0.052	0.025	0.037	0.003	0.100	0.002	0.0001	0.042
<i>Gnavus group</i>	0.050	0.020	0.013	0.011	0.090	0.016	0.0001	0.080
<i>Ventriosum group</i>	0.054	0.018	0.003	0.019	0.089	0.015	0.0001	0.080
<i>Turicibacter</i>	0.035	0.017	0.043	0.001	0.069	0.016	0.0001	0.082
<i>Actinomyces</i>	0.051	0.016	0.002	0.019	0.083	0.034	0.0001	0.112
<i>Mogibacterium</i>	0.045	0.020	0.022	0.006	0.084	0.063	0.007	0.156
<i>Fournierella</i>	0.062	0.020	0.002	0.022	0.102	0.025	0.0001	0.099
<i>Candidatus Saccharibacteria bacterium UB2523</i>	0.056	0.021	0.010	0.013	0.098	0.003	0.0001	0.049
Disp_index2								
<i>Dorea</i>	0.101	0.051	0.049	0.001	0.201	0.005	0.0001	0.053
<i>Parabacteroides</i>	-0.111	0.054	0.040	-0.218	-0.005	0.017	0.0001	0.083
<i>Catenibacterium</i>	0.233	0.073	0.001	0.090	0.376	0.045	0.002	0.129
<i>Actinomyces</i>	0.106	0.053	0.046	0.002	0.211	0.023	0.0001	0.094
<i>Negativibacillus</i>	0.162	0.064	0.011	0.038	0.287	0.052	0.004	0.138

<i>Lachnospiraceae UCG-004</i>	-0.274	0.068	0.001	-0.407	-0.140	0.076	0.013	0.173
<i>Atopobium</i>	0.176	0.622	0.005	0.054	0.298	0.033	0.0001	0.110
<i>Holdemania</i>	0.126	0.064	0.049	0.001	0.251	0.021	0.0001	0.089
	AUCinsgluc_ OGTT							
<i>Haemophilus</i>	-0.040	0.020	0.046	-0.080	-0.001	0.027	0.0001	0.101
<i>Erysipelotrichaceae UCG-003</i>	-0.047	0.020	0.017	-0.086	-0.008	0.040	0.0006	0.1214
<i>Butyricicoccus</i>	-0.038	0.019	0.043	-0.075	-0.001	0.027	0.0001	0.101
<i>[Eubacterium] xylanophilum group</i>	0.041	0.021	0.049	0.001	0.082	0.026	0.0001	0.100
<i>Eggerthellaceae uncultured</i>	0.059	0.026	0.021	0.009	0.109	0.032	0.0001	0.109
<i>Atopobiaceae uncultured</i>	0.048	0.024	0.048	0.001	0.096	0.025	0.0001	0.097
<i>Peptococcaceae unclutured</i>	0.046	0.022	0.041	0.002	0.089	0.028	0.0001	0.103
<i>Lachnospiraceae UCG-004</i>	-0.054	0.026	0.038	-0.105	-0.003	0.029	0.0001	0.103
N	142							

Tabla 12. Modelos lineales generalizados mixtos para los índices de RI y función de las células β pancreáticas y tamaño del efecto e intervalo de confianza para cada bacteria.

Posteriormente, se realizaron modelos lineales generalizados mixtos considerando ahora la abundancia de las bacterias con significancia estadística determinadas en el paso anterior como variables dependientes. Con el objetivo de conocer la existencia de relaciones bidireccionales entre las variables de desenlace y la abundancia de las bacterias (Tabla 13). Los modelos se ajustaron por mes de seguimiento, tratamiento farmacológico, sexo, edad, IMC, los índices de resistencia a la insulina y función de las células β pancreáticas. Se encontraron 17 genus bacterianos con relaciones bidireccionales y con estas se continuo el análisis.

Fixed effects	β	SE	p-value	95% CI		Eta-Squared	95%CI	
<i>Butyricoccus</i>								
<i>Matsuda Index</i>	0.666	0.337	0.048	0.006	1.326	0.027	0.0001	0.099
<i>AUCinsgluc_OGTT</i>	-0.717	0.359	0.046	-1.421	-0.012	0.027	0.0001	0.101
<i>Erysipelotrichaceae UCG-003</i>								
<i>AUCinsgluc_OGTT</i>	-0.824	0.338	0.015	-1.487	-0.162	0.039	0.0006	0.121
<i>[Eubacterium] xylanophilum group</i>								
<i>Matsuda Index</i>	-0.630	0.304	0.038	-1.227	-0.033	0.029	0.0001	0.104
<i>AUCinsgluc_OGTT</i>	0.647	0.325	0.047	0.009	1.285	0.027	0.0001	0.100
<i>Granulicatella</i>								
<i>Matsuda Index</i>	0.544	0.241	0.024	0.072	1.017	0.034	0.0001	0.113
<i>Ruminococcaceae UCG-008</i>								
<i>Matsuda Index</i>	-0.366	0.185	0.042	-0.729	-0.004	0.027	0.0001	0.099
<i>Prevotella 6</i>								
<i>Matsuda Index</i>	-0.480	0.223	0.031	-0.916	-0.044	0.031	0.0001	0.108
<i>HOMA-IR</i>	0.385	0.188	0.041	0.017	0.754	0.028	0.0001	0.103
<i>Catabacter</i>								
<i>Matsuda Index</i>	-0.508	0.232	0.029	-0.964	-0.053	0.032	0.0001	0.110
<i>HOMA-IR</i>	0.390	0.196	0.047	0.005	0.776	0.027	0.0001	0.100
<i>Actinomyces</i>								
<i>HOMA-IR</i>	-0.752	0.270	0.005	-1.279	-0.223	0.052	0.0036	0.139
<i>ORAL-DI</i>	0.551	0.249	0.027	0.063	1.038	0.034	0.0001	0.113
<i>Negativibacillus</i>								
<i>HOMA-IR</i>	-0.450	0.227	0.048	-0.895	-0.005	0.027	0.0001	0.100
<i>ORAL-DI</i>	0.537	0.204	0.008	0.138	0.936	0.047	0.0022	0.134
<i>Dlsp_Index2</i>	0.972	0.349	0.005	0.289	1.655	0.052	0.0036	0.139
<i>Bilophila</i>								
<i>AIR</i>	-0.566	0.240	0.018	-1.036	-0.096	0.038	0.0001	0.119
<i>Mogibacterium</i>								
<i>AIR</i>	0.652	0.222	0.003	0.216	1.088	0.057	0.0052	0.148
<i>ORAL-DI</i>	0.630	0.205	0.002	0.227	1.031	0.063	0.0069	0.156

<i>Lachnospiraceae UCG-004</i>								
<i>AIR</i>	-0.423	0.199	0.034	-0.814	-0.033	0.031	0.0001	0.108
<i>ORAL-DI</i>	-0.497	0.182	0.006	-0.854	-0.139	0.050	0.0030	0.138
<i>Disp_Index2</i>	-1.069	0.311	0.001	-1.679	-0.461	0.077	0.0127	0.173
<i>AUCinsgluc_OGTT</i>	-0.531	0.259	0.040	-1.039	-0.023	0.029	0.0001	0.103
<i>Fournierella</i>								
<i>AIR</i>	0.448	0.214	0.036	0.029	0.867	0.030	0.0001	0.107
<i>Atopobium</i>								
<i>ORAL-DI</i>	0.508	0.209	0.015	0.098	0.918	0.404	0.0006	0.123
<i>Disp_Index2</i>	0.787	0.358	0.028	0.086	1.489	0.033	0.0001	0.110
<i>Catenibacterium</i>								
<i>Disp_Index2</i>	0.785	0.301	0.009	0.194	1.375	0.045	0.0019	0.130
<i>Eggerthellaceae uncultured</i>								
<i>AUCinsgluc_OGTT</i>	0.571	0.262	0.030	0.056	1.085	0.032	0.0001	0.109
<i>Peptococcaceae unclutured</i>								
<i>AUCinsgluc_OGTT</i>	0.618	0.302	0.041	0.027	1.208	0.028	0.0001	0.103
N	142							

Tabla 13. Modelos lineales generalizados mixtos para los genus bacterianos y tamaño del efecto e intervalo de confianza para cada bacteria.

Se evaluó la interacción Bacteria X Tratamiento en los diferentes índices, nosotros encontramos incremento significativo en el índice de Matsuda en el grupo de LM asociado a la interacción *Erysipelotrichaceae UCG-003* ($p=0.008$) X tratamiento. Además, disminuyó HOMA-IR con LM en la interacción con los tratamientos para las bacterias *Erysipelotrichaceae UCG-003* ($p=0.008$) y *Lachnospiraceae NK4A136* ($p=0.002$). AIR incremento significativamente con LM en la interacción de los tratamientos con *Fournierella* ($p=0.040$), y *Dorea* ($p=0.034$) y metformina con *Negativibacillus* ($p=0.004$). ORAL-DI incremento con LM significativamente por la interacción con *Roseburia* ($p=0.025$), *Lachnospiraceae NK4A136* ($p=0.013$), *Fournierella* ($p=0.023$), y *Dorea* ($p=0.029$) y metformina con *Negativibacillus* ($p=0.019$). La función de las células β pancreática (*Disp_Index2*) presento significancia estadística en la interacción con *Erysipelotrichaceae UCG-003* para ambos tratamientos LM ($p=0.025$) y M ($p=0.048$), *Lachnospiraceae UCG-004* ($p=0.032$) y *Turicibacter* ($p=0.003$) con M. Finalmente, en *AUCinsgluc_OGTT* para la interacción con *Peptococcaceae_uncultured* con M ($p=0.036$). Para la interacción Bacteria X Tiempo, nosotros observamos incremento significativo en el índice de

Matsuda a los 6 meses con el tratamiento de LM para los genus bacterianos; *Roseburia* (p=0.031), *Erysipelotrichaceae UCG-003* (p=0.018), *Lachnospiraceae NK4A136* (p=0.035), *Bilophila* (p=0.035). Reducción significativa de la RI evaluada indirectamente por HOMA-IR a los 6 meses con *Erysipelotrichaceae UCG-003* (p=0.004), *Granulicatella* (p=0.020), *Lachnospiraceae NK4A136* (p=0.001), *Bilophila* (p=0.016) y a los 12 meses con *Actinomyces* (p=0.040). Para AIR el incremento fue significativo a los 6 meses con *Negativibacillus* (p=0.001) y *Candidatus B2523* (p=0.007). La interacción Bacteria por tiempo fue significativa a los 6 meses para el índice de ORAL-DI en; *Roseburia* (p=0.023), *Granulicatella* (p=0.048), *Lachnospiraceae NK4A136* (p=0.027), *Negativibacillus* (p=0.016), *Candidatus B2523* (p=0.013), *Catenibacterium* (p=0.022). Para Disp_Index2 a los 6 meses con; *Erysipelotrichaceae UCG-003* (p=0.004), *Lachnospiraceae NK4A136* (p=0.048), *Granulicatella* (p=0.044), y *Turicibacter* (p=0.046) y a los 12 meses (p=0.028), *Bilophila* (p=0.028) y *Lachnospiraceae UCG-004* (p=0.011). Finalmente, para AUCinsgluc_OGTT a los 6 y 12 meses *Fournierella* (p=0.049) y *Peptococcaceae_uncultured* (p=0.029), respectivamente. No hubo efecto de la interacción tratamiento por tiempo.

Regresión lineal para los modelos de bloques jerárquicos.

Los modelos de bloques jerárquicos para la regresión lineal mostraron que los fármacos antidiabéticos y el IMC explicaban en mayor proporción la sensibilidad a la insulina (evaluado por el índice de Matsuda y HOMA-IR) y la función de las células β (AIR, ORAL-DI, Disp_Index2 y AUCins_CTOG). Considerando la correlación observada entre este índice y el clamp euglucémico hiperinsulinémico que es de 0.73 (p<0.0001) consideraremos solo los índices de Matsuda y Disp_Index2 para evaluar las variables de desenlace en este estudio. En **ANEXO 7** se encuentran los análisis de los índices restantes.

Los fármacos antidiabéticos demuestran una sensibilidad a la insulina de alrededor del 10 % (modelo 1 en la tabla 14). La adición de sexo y edad aumentó la explicación

al 14% (modelo 2 en la tabla 14) y el IMC al 25% (modelo 3 en la tabla 14). Sin embargo, al sumar los 17 géneros representativos, la explicación aumenta al 33% (modelo 4 en la tabla 14).

Variable	Model 1	Model 2	Model 3	Model 4
V6 Tmet	0.240***	0.242***	0.147*	0.063
V12 Tmet	0.245***	0.252***	0.204**	0.159*
V6 Tlina+met	0.168**	0.160**	0.106	0.095
V12 Tlina+met	0.169**	0.161**	0.074	0.040
Sexo		0.093	0.104*	0.107*
Edad		0.360	0.276	0.383*
IMC			-1.331***	-1.233***
<i>Erysipelotrichaceae UCG-003</i>				0.032
<i>Catanibacterium</i>				0.079*
<i>Butyricoccus</i>				0.010
<i>Xylanophilum group</i>				-0.038
<i>Bilophila</i>				0.025
<i>Eggerthellaceae_uncultured</i>				-0.051
<i>Actinomyces</i>				0.020
<i>Negativibacilis</i>				0.009
<i>Mogibacterium</i>				-0.007
<i>Peptococcaceae_uncultured</i>				-0.003
<i>Lachnospiraceae UCG-004</i>				0.012
<i>Granulicatella</i>				0.027
<i>Fournierella</i>				0.009
<i>Ruminococcaceae UCG-008</i>				-0.079
<i>Prevotella 6</i>				-0.044
<i>Atopobium</i>				-0.026
<i>Catabacter</i>				-0.083*
Constant	0.391***	-0.272	1.864**	1.582*
N	166	166	166	166
R2	0.102	0.137	0.249	0.327

Tabla 14. Modelo jerárquico para el Índice Matsuda. Todos los modelos se ajustaron por tratamientos antidiabéticos. Se seleccionó el método intro en el que se introducen todas las variables de un bloque en un solo paso. Regresión por pasos:

medicamentos antidiabéticos en el modelo 1; género y edad en el modelo 2; IMC en el modelo 3 y géneros bacterianos en el modelo 4. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ y *** $p < 0.0001$

Considerando los géneros bacterianos con significancia estadística de la regresión lineal jerárquica por bloques anterior realizamos el modelo para el genus *Catabacter*. Los modelos de bloques jerárquicos para la regresión lineal mostraron que la metformina a los 6 y 12 meses de seguimiento y el IMC explicaban el incremento en la sensibilidad a la insulina (evaluada por el índice de Matsuda). Los modelos demuestran que la sensibilidad a la insulina de alrededor del 10 % (modelo 1 en la tabla). La adición de sexo y edad aumentó la explicación al 14% (modelo 2 en la tabla) y el IMC al 25% (modelo 3 en la tabla). Pero, al sumar el genus *Catabacter*, la explicación aumenta al 28% (modelo 4 en la tabla) (Tabla 15).

Variable	Model 1	Model 2	Model 3	Model 4
V6 Tmet	0.240***	0.242***	0.147**	0.107
V12 Tmet	0.245***	0.252***	0.204***	0.172**
V6 Tlina+met	0.168**	0.160**	0.106	0.087
V12 Tlina+met	0.168**	0.161**	0.074	0.070
Sexo		0.093	0.104**	0.105**
Edad		0.360	0.276	0.277
IMC			-1.331***	-1.359***
<i>Catabacter</i>				-0.076**
Constant	0.391***	-0.272	1.854***	1.926***
N	169	169	169	169
R²	0.102	0.137	0.249	0.277

Tabla 15. Modelo jerárquico para el Índice Matsuda. Todos los modelos se ajustaron por tratamientos antidiabéticos. Se seleccionó el método intro en el que se introducen todas las variables de un bloque en un solo paso. Regresión por pasos: medicamentos antidiabéticos en el modelo 1; género y edad en el modelo 2; IMC en el modelo 3 y géneros bacterianos en el modelo 4.

En cuanto a la función de las células β , los fármacos antidiabéticos explican el 22%. La adición de género y edad disminuyó al 21% (modelo 2 en la tabla). Además, la adición del IMC explicó una variabilidad de solo el 23% (modelos 3 en la tabla). Por otro lado, la suma de los géneros bacterianos aumenta la variabilidad en el modelo hasta en un 35% (modelo 4 en la tabla) (Tabla 16).

Variable	Model 1	Model 2	Model 3	Model 4
V6 Tmet	0.252***	0.256***	0.209**	0.241***
V12 Tmet	0.217***	0.219***	0.196***	0.220***
V6 Tlina+met	0.349***	0.352***	0.325**	0.412***
V12 Tlina+met	0.344***	0.347***	0.304***	0.329***
Sexo		0.035	0.041***	0.058
Edad		0.036	-0.005	-0.058
IMC			-0.653*	-0.560
<i>Erysipelotrichaceae</i> UCG-003				0.004
<i>Catanibacterium</i>				0.034
<i>Butyricicoccus</i>				0.006
<i>Xylanophilum</i> group				0.007
<i>Bilophila</i>				-0.007
<i>Eggerthellaceae_uncultured</i>				-0.014
<i>Actinomyces</i>				0.004
<i>Negativibacilis</i>				0.061*
<i>Mogibacterium</i>				0.017
<i>Peptococcaceae_uncultured</i>				0.028
<i>Lachnospiraceae</i> UCG-004				-0.103**
<i>Granulicatella</i>				0.030
<i>Fournierella</i>				0.017
<i>Ruminococcaceae</i> UCG-008				-0.072
<i>Prevotella</i> 6				0.023
<i>Atopobium</i>				0.031
<i>Catabacter</i>				-0.063
Constant	0.299***	0.213	1.261**	1.173*
N	169	169	169	169
R²	0.221	0.213	0.234	0.347

Tabla 16. Modelo jerárquico para Disp_Index2. Se fijó el ajuste por fármacos antidiabéticos en todos los modelos. Se seleccionó el método intro en el que se

introducen todas las variables de un bloque en un solo paso. Regresión por pasos: medicamentos antidiabéticos en el modelo 1; género y edad en el modelo 2; IMC en el modelo 3 y géneros bacterianos en el modelo 4.

Consideramos evaluar la contribución del genus *Lachnospiraceae UCG-004* para explicar la función de la célula β pancreática. La terapia combinada de LM tuvo un mayor efecto en el incremento de la función de estas células. Por otra parte, a mayor IMC la función de las células β disminuyó. Además, el incremento del índice de Disp_Index2 incremento una unidad por cada -0.117 menos de *Lachnospiraceae UCG-004*. La R^2 para los cuatro modelos fueron; los fármacos antidiabéticos explican el 22%. La adición de género y edad disminuyó al 21% (modelo 2 en la tabla 17). Sin embargo, la adición del IMC no modificó el porcentaje de explicación del 23% (modelo 3 de la tabla 17). En cambio, agregar los géneros bacterianos aumenta la variabilidad en el modelo hasta en un 32% (modelo 4 en la tabla 17). Curiosamente, los índices mejor ponderados para las variables son ISI y Disp_Index2.

Variable	Model 1	Model 2	Model 3	Model 4
V6 Tmet	0.252***	0.256***	0.209**	0.250***
V12 Tmet	0.217***	0.219***	0.196***	0.212***
V6 Tlina+met	0.349**	0.352***	0.325***	0.366***
V12 Tlina+met	0.344**	0.347***	0.304***	0.309***
Sexo		0.035	0.041	0.051
Edad		0.036	-0.005	-0.070
IMC			-0.653*	-0.560
<i>Lachnospiraceae UCG-004</i>				-0.117***
Constant	0.299***	0.213	1.261*	1.214*
N	169	169	169	169
R²	0.221	0.213	0.234	0.315

Tabla 17. Modelo jerárquico para Disp_Index2. Se fijó el ajuste por fármacos antidiabéticos en todos los modelos. Se seleccionó el método intro en el que se introducen todas las variables de un bloque en un solo paso. Regresión por pasos:

medicamentos antidiabéticos en el modelo 1; género y edad en el modelo 2; IMC en el modelo 3 y géneros bacterianos en el modelo 4.

Modelado de ecuaciones estructurales (SEM)

***Catabacter* → Índice de Matsuda**

El análisis de mediación se realizó utilizando ecuaciones estructurales. En estas ecuaciones estructurales, observamos que los géneros bacterianos y los componentes principales ejercen una mediación parcial sobre los índices clínicos. El IMC está fuertemente asociado con los índices de sensibilidad a la insulina y la secreción de células β pancreáticas.

En las siguientes ecuaciones estructurales consideramos el índice de sensibilidad a la insulina (variable dependiente) y el género *Catabacter* como variable mediadora. El IMC está fuertemente asociado con el índice de Matsuda [IMC \rightarrow Sensibilidad a la insulina ($b=-0,24$, $p=0,022$) en el grupo basal, ($b=-0,27$, $p=0,170$) para el grupo M y ($b=0,48$, $p=0.001$) en el grupo LM]. Finalmente, el IMC mostró un efecto bajo en el genus *Catabacter* ($b=0.23$ grupo basal, $p=0.917$, $b=-0.14$, $p=0.411$ grupo M, $b=-0.19$, $p=0.960$ grupo LM) y un bajo a nulo en Índice de Matsuda ($b=-0,27$, $p=0,062$ grupo basal, $b=-0,064$, $p=0,095$ grupo M, $b=-0,18$, $p=0,510$ grupo LM) el grupo LM es estadísticamente significativo (Figura 15).

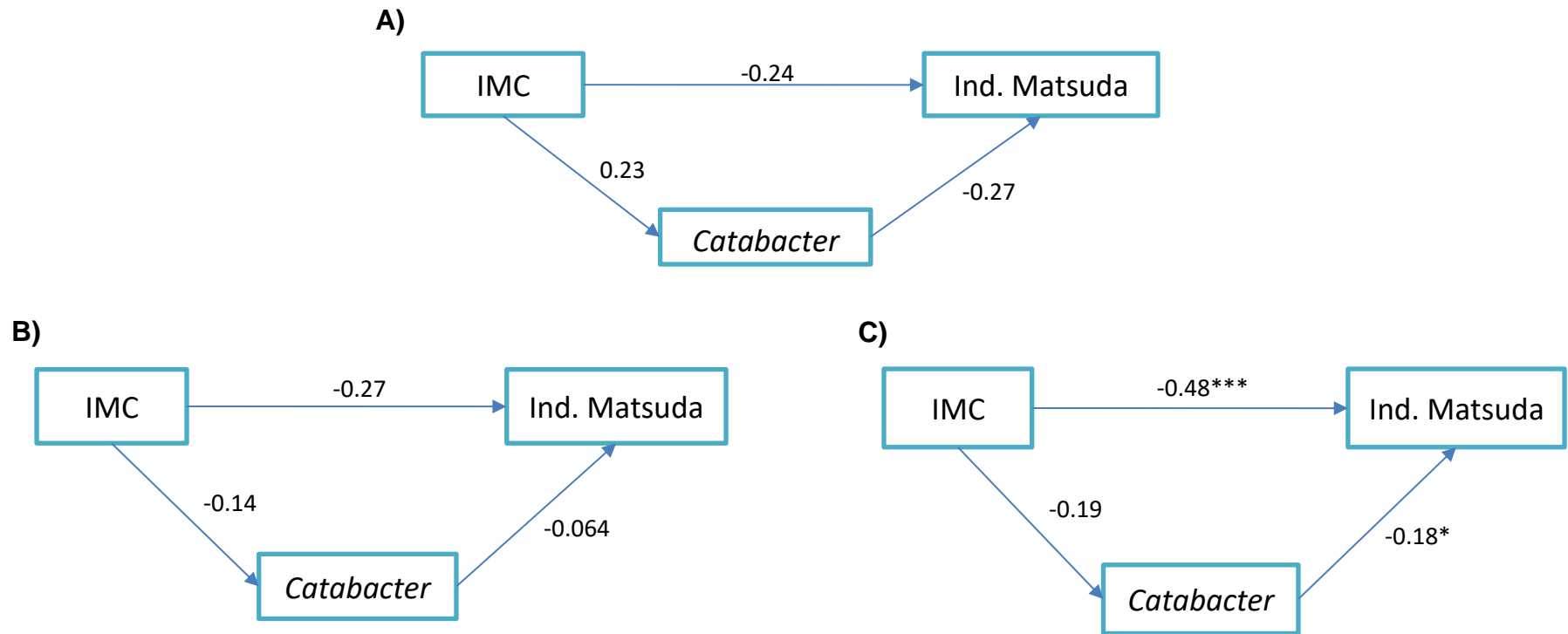
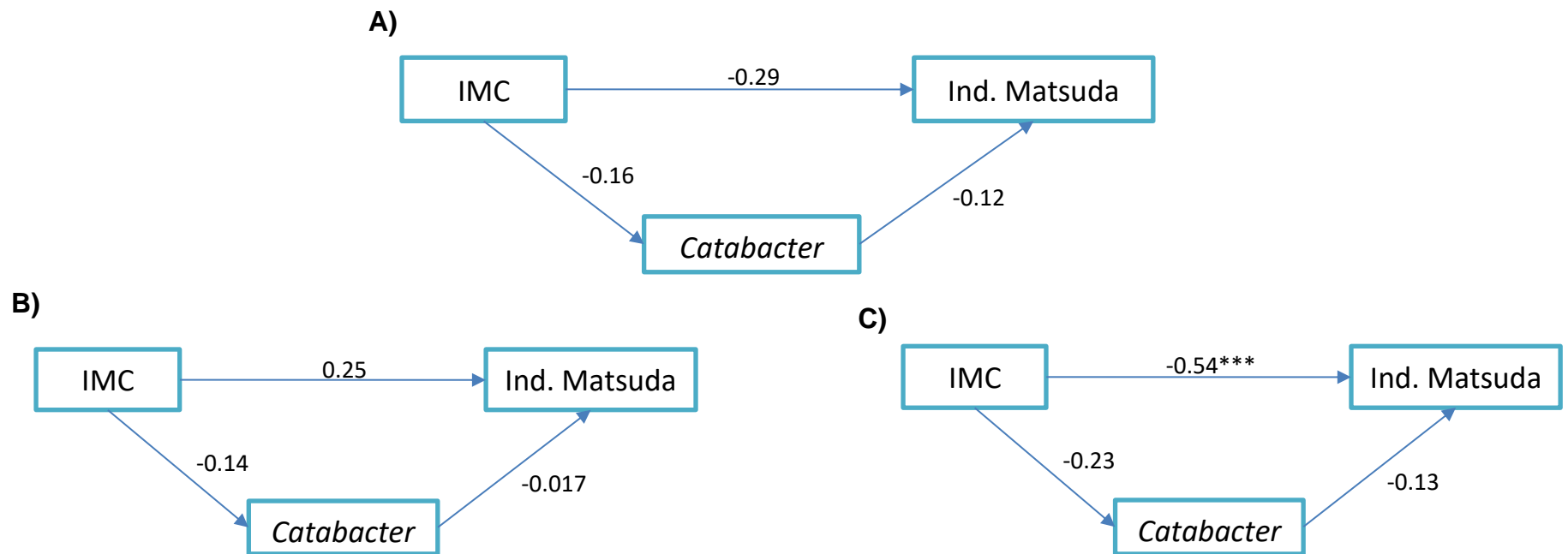


Figura 15. Modelado de ecuaciones estructurales con coeficientes de trayectoria estandarizados para índice de Matsuda por fármacos antidiabéticos. El panel A) muestra el modelo de referencia que muestra una relación entre el IMC y la sensibilidad a la insulina (índice de Matsuda) y la relación entre el IMC y el género *Catabacter*. Además, la relación entre el género *Catabacter* y la sensibilidad a la insulina en sujetos en condiciones basales, es decir, sin tratamiento antidiabético, pero con prediabetes. El panel B) es un modelo para el tratamiento con metformina y el panel C) es el modelo para el tratamiento con linagliptina + metformina. ** $p < 0.05$

En las siguientes ecuaciones estructural dividimos por fármacos antidiabéticos y mes de seguimiento a fin de identificar la contribución de la variable mediadora (*Catabacter*) en el índice de sensibilidad a la insulina para cada intervención. Nosotros observamos que el IMC está fuertemente asociado con el índice de Matsuda específicamente en el tratamiento con M a los 12 meses y LM con 6 meses de seguimiento [IMC -> Sensibilidad a la insulina ($b=-0.54$, $p=0.0001$) y ($b=-0.63$, $p=0.0001$)]. En lo que respecta a la evaluación del gen bacteriano en el índice de Matsuda, para el grupo de LM con seis meses de seguimiento una contribución de moderada a fuerte [*Catabacter* -> Sensibilidad a la insulina ($b=-0.27$, $p=0.040$)] independiente del cambio en el IMC asociada al tratamiento (Figura 16 D). En el resto de los modelos el gen bacteriano esta débilmente asociado al cambio en la sensibilidad a la insulina.



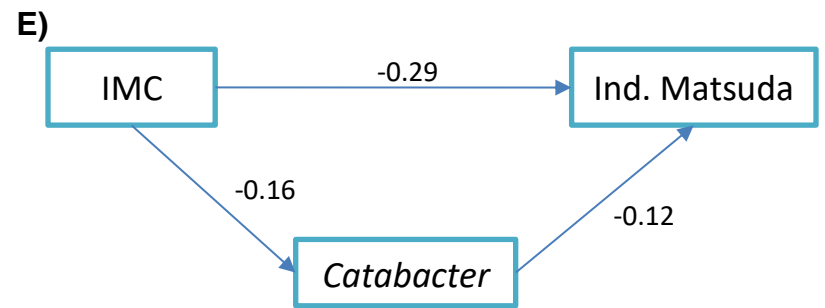
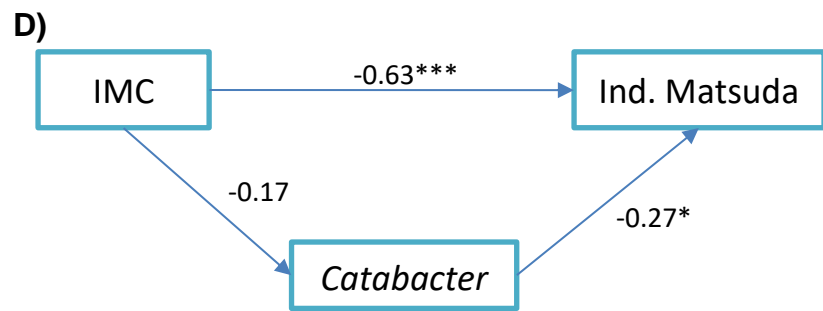


Figura 16. Modelado de ecuaciones estructurales con coeficientes de trayectoria estandarizados para índice de Matsuda y mes de seguimiento. El panel A) muestra el modelo de referencia que muestra una relación entre el IMC y la sensibilidad a la insulina (índice de Matsuda) y la relación entre el IMC y el género *Catabacter*. Además, la relación entre el género *Catabacter* y la sensibilidad a la insulina en sujetos en condiciones basales, es decir, sin tratamiento antidiabético. El panel, B) es un modelo para el tratamiento de 6 meses con metformina y el panel, C) es el modelo para el tratamiento de 12 meses con metformina, D) es el modelo para el tratamiento de 6 meses con LM, E) es el modelo para el tratamiento de 12 meses con LM. ** $p < 0.05$.

***Lachnospiraceae UCG-004* → Disp_Index2**

Por otro lado, evaluamos el Disp_Index2 y el género *Lachnospiraceae UCG-004* como variables mediadoras. El IMC tiene un efecto bajo en Disp_Index2 [IMC -> función de las células β pancreáticas ($b = -0.13$, $p = 0.022$) en el grupo basal, ($b = -0.12$, $p = 0.170$) para el grupo M y ($b = 0.22$, $p = 0.001$) en el grupo LM]. El IMC no mostró efecto en el género *Lachnospiraceae UCG-004* ($b = 0.19$ grupo basal, $p = -0.06$, $b = -0.64$, $p = 0.411$ grupo M, $b = 0.16$, $p = 0.960$ grupo LM). Por el contrario, *Lachnospiraceae UCG-004* está fuertemente asociado con Disp_Index2 ($b = 0.057$, $p = 0.062$ grupo de referencia, $b = -0.44$, $p = 0.095$ grupo M, $b = -0.37$, $p = 0.510$ grupo LM) grupos de tratamiento en los que se administraron fármacos antidiabéticos estadísticamente significativos (Figura 17).

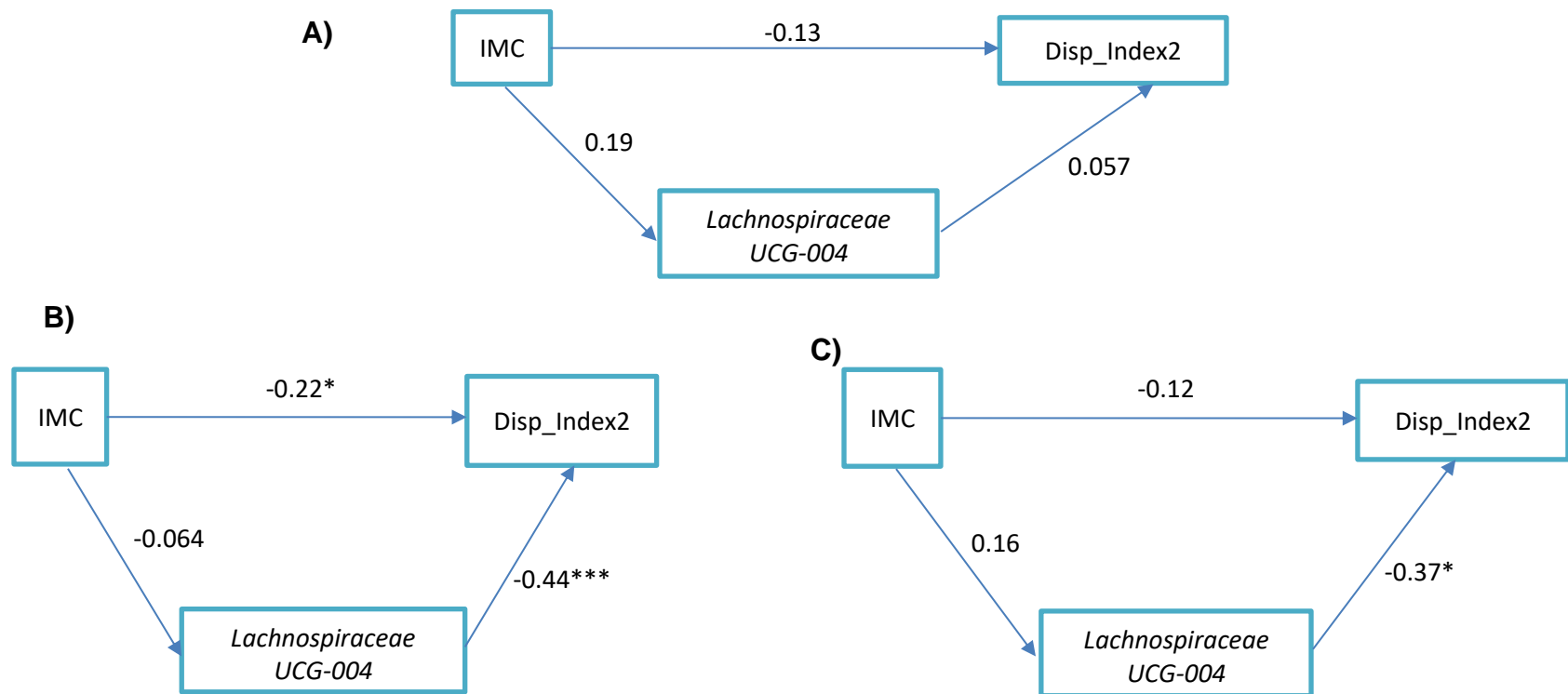
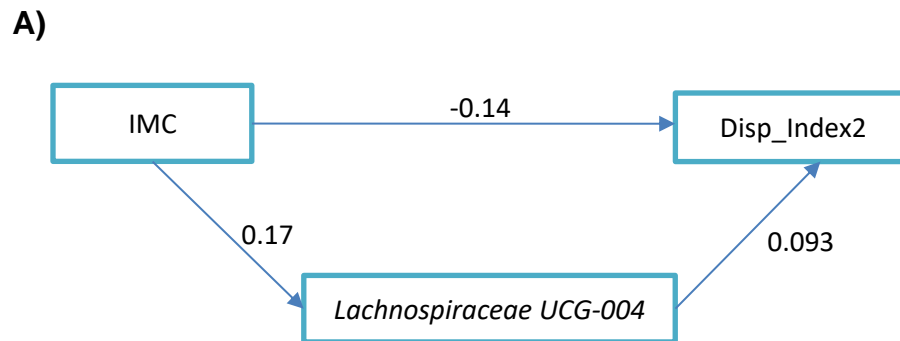


Figura 17. Modelado de ecuaciones estructurales con coeficientes de trayectoria estandarizados para Disp_Index2 por fármacos antidiabéticos. El panel A) muestra el modelo de referencia que muestra una relación entre el IMC y la sensibilidad a la insulina (índice de Matsuda) y la relación entre el IMC y el género *Lachnospiraceae UCG-004*. Además, la relación entre el género *Lachnospiraceae UCG-004* y la sensibilidad a la insulina en sujetos en condiciones basales, es decir, sin

tratamiento antidiabético. El panel B) es un modelo para el tratamiento con metformina y el panel C) es el modelo para el tratamiento con LM. ** $p < 0,05$

A continuación, en las siguientes ecuaciones estructurales evaluamos el genus *Lachnospiraceae UCG-004* como variable mediadora por fármacos antidiabéticos y mes de seguimiento sobre el índice de Disp_Index2. Nosotros observamos que el IMC está débilmente asociado con el índice de función de las células β pancreáticas. Curiosamente el genus *Lachnospiraceae UCG-004* en el tratamiento con M a los 12 meses y LM con 6 y 12 meses de seguimiento [*Lachnospiraceae UCG-004* \rightarrow Sensibilidad a la insulina ($b = -0.57$, $p = 0.0001$), ($b = -0.39$, $p = 0.030$) y ($b = -0.44$, $p = 0.0001$)] está fuertemente asociado al cambio en el Disp_Index2 (Figura 18).



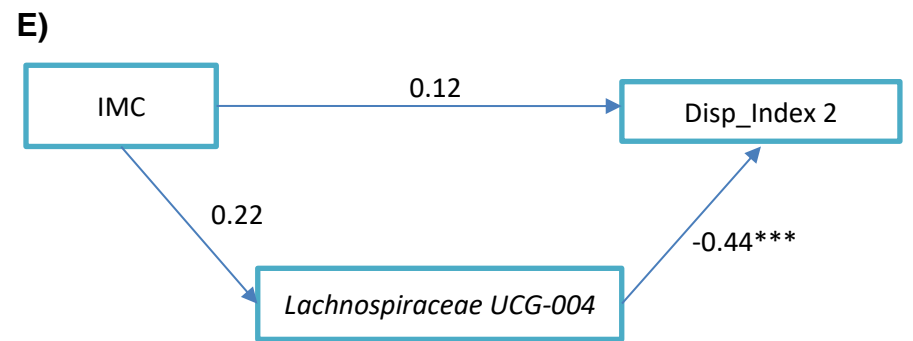
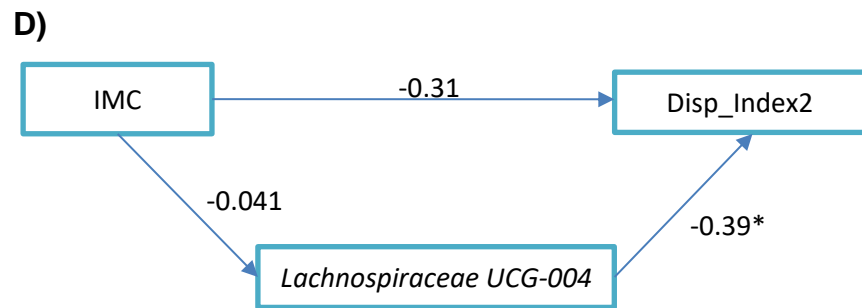
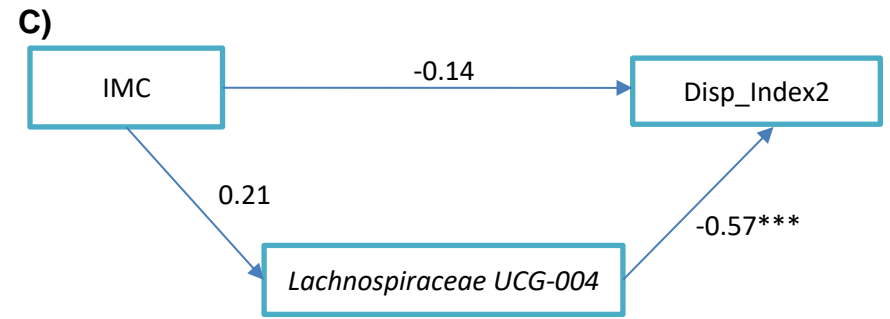
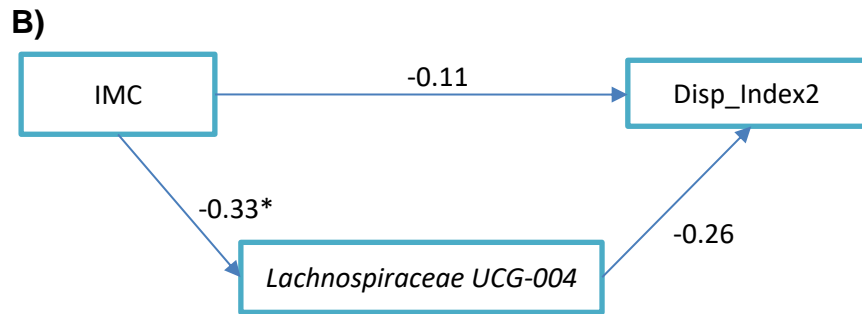


Figura 18. Modelado de ecuaciones estructurales con coeficientes de trayectoria estandarizados para Disp_Index2 por fármacos antidiabéticos y mes de seguimiento. El panel A) muestra el modelo de referencia que muestra una relación entre el IMC y la sensibilidad a la insulina (índice de Matsuda) y la relación entre el IMC y el género *Lachnospiraceae* UCG-004. Además, la relación entre el género *Lachnospiraceae* UCG-004 y la sensibilidad a la insulina en sujetos en condiciones basales, es decir, sin tratamiento antidiabético. El panel, B) es un modelo para el tratamiento de 6 meses con metformina y el panel, C) es el modelo para el tratamiento de 12 meses con metformina, D) es el modelo para el tratamiento de 6 meses con LM, E) es el modelo para el tratamiento de 12 meses con LM. ** $p < 0.05$.

A través del análisis de mediación, observamos que los géneros bacterianos están débilmente asociados con el índice de sensibilidad a la insulina y fuertemente asociados con la función de las células β pancreáticas. Sin embargo, los fármacos antidiabéticos y el IMC están fuertemente asociados con los diferentes índices. Para dilucidar el efecto de los medicamentos antidiabéticos y la nueva condición metabólica en los géneros bacterianos, realizamos modelos lineales generalizados mixtos (para una distribución de Tweedie) donde los géneros bacterianos se consideraron como la variable dependiente y los medicamentos antidiabéticos como una variable independiente. Además, ajustamos el modelo por género, edad, IMC y el índice Matsuda o Disp_Index2. Interesantemente observamos que los fármacos antidiabéticos y el incremento de la sensibilidad a la insulina explican el cambio en la abundancia del género *Catabacter*. Dichos resultados nos orientan a considerar que la condición metabólica es la razón principal del cambio en la estructura bacteriana (Tabla 18).

Fixed effects	β	SE	p-value	95% CI		Eta-Squared	95%CI	
<i>Catabacter</i>								
V6 Tmet	-0.327	0.194	0.093	-0.708	0.054	0.043	0.0001	0.101
V12 Tmet	-0.278	0.177	0.117	-0.625	0.069			
V6 Tlina+met	-0.166	0.187	0.372	-0.532	0.199			
V12 Tlina+met	0.049	0.169	0.770	-0.282	0.380			
Sexo	0.133	0.121	0.269	-0.103	0.369	0.008	0.0001	0.063
Edad	0.038	0.485	0.937	-0.912	0.988	0.00004	0.0001	0.013
IMC	-0.423	0.797	0.596	-1.984	1.139	0.0019	0.0001	0.042
Matsuda Index	-0.503	0.233	0.031	-0.959	-0.047	0.031	0.0001	0.108
N	143							

Tabla 18. Modelos lineales generalizados mixtos para el género *Catabacter* y tamaño del efecto e intervalo de confianza para cada bacteria.

De manera similar, los tratamientos farmacológicos y el aumento de la función de las células β pancreáticas explican el cambio en la abundancia del genus *Lachnospiraceae UCG-004* (Tabla 19).

Fixed effects	β	SE	p-value	95% CI		Eta-Squared	95%CI	
<i>Lachnospiraceae UCG-004</i>								
V6 Tmet	0.467	0.205	0.023	0.065	0.870	0.059	0.0001	0.126
V12 Tmet	0.175	0.183	0.339	-0.184	0.533			
V6 Tlina+met	0.519	0.202	0.010	0.123	0.914			
V12 Tlina+met	0.206	0.187	0.268	-0.160	0.573			
Sexo	0.193	0.125	0.125	-0.053	0.438	0.016	0.0007	0.081
Edad	-0.695	0.503	0.167	-1.679	0.290	0.013	0.0001	0.074
IMC	0.222	0.794	0.780	-1.335	1.779	0.0005	0.0001	0.031
Disp_Index2	-0.990	0.317	0.002	-1.612	-0.368	0.064	0.0076	0.156
N	166							

Tabla 19. Modelos lineales generalizados mixtos para el género *Lachnospiraceae UCG-004* y tamaño del efecto e intervalo de confianza para cada bacteria.

Finalmente, nosotros realizamos análisis de componentes principales con 20 bacterias que presentaron significancia bidireccional para identificar comunidades bacterianas que explican la sensibilidad a la insulina y función de las células beta

pancreáticas, considerando que las comunidades bacterianas tienen una estrecha relación de convivencia que se establece a nivel ecológico entre las bacterias de diferentes genus que se encuentran en contacto directo entre ellas con el objetivo de promover el incremento de AGCC.

Análisis de componentes principales.

En el análisis de factores considerando las 20 bacterias con significancia bidireccional en los modelos lineales generalizados obtuvo una adecuación baja (KMO = 0.692, prueba de esfericidad $p < 0.001$). Las matrices anti-imagen fueron mayores de 0.5, excepto en *Dorea* (0.485), pero por ser muy cercana al valor que a priori escogimos como corte se mantuvo dentro del análisis. La varianza máxima explicada fue de 61.910% con 7 factores, el mayor eigenvalor fue de 3.031 y el menor de 1.026. Las correlaciones reproducidas fueron mayores de 0.5, excepto para la bacteria *Atopobiaceae_uncultured* (0.425), que fue considerada aceptable (Tabla 20).

Bacteria	1	2	3	4	5	6	7
<i>Dorea</i>	0.735						
<i>Roseburia</i>			0.813				
<i>Erysipelotrichaceae UCG-003</i>					0.619		
<i>Parabacteroides</i>			0.730				
<i>Catenibacterium</i>					0.712		
<i>Lachnospiraceae NK4A136</i>			0.694				
<i>Holdemanella</i>		0.688					
<i>Butyricoccus</i>	0.667						
<i>Gnavus_group</i>	0.466						
<i>Xylanophilum_group</i>			0.456				
<i>Turicibacter</i>						0.850	
<i>Eggerthellaceae_uncultured</i>		0.762					
<i>Actinomyces</i>	0.659						
<i>Negativibacillus</i>							0.842
<i>Mogibacterium</i>		0.563					
<i>Atopobiaceae_uncultured</i>		0.603					

<i>Peptococcaceae_uncultured</i>				0.673			
<i>Lachnospiraceae UCG-004</i>	0.451						
<i>Fournierella</i>				0.846			
<i>Clostridiales Vadin BB60</i>							

Tabla 20. Matriz de componentes rotados. Los conglomerados se encuentran ordenados de acuerdo a los loadings de cada componente.

De manera similar, con los 3 componentes principales se realizaron modelos lineales generalizados mixtos para identificar el coeficiente β de los genus bacterianos correspondientes a cada componente principal al cambio en el índice de función de las células β pancreática. Como se puede observar la contribución de los géneros bacterianos es baja. Por lo tanto, es posible concluir que los fármacos antidiabéticos y el cambio en la condición metabólica y antropométrica explican mejor el incremento en la función de las células β pancreáticas (Tabla 21).

Fixed effects	β	SE	p-value	95% CI		Eta-Squared	95%CI	
Disp_Index2 (Varmax1)								
<i>Dorea</i>	0.014	0.220	0.638	-0.017	0.045	0.005	0.0001	0.0548
<i>Butyricoccus</i>	0.003	0.016	0.827	-0.028	0.034	0.0003	0.0001	0.0274
<i>Gnavus group</i>	0.003	0.020	0.880	-0.037	0.043	0.0002	0.0001	0.0221
<i>Actinomyces</i>	0.029	0.016	0.074	-0.003	0.061	0.0291	0.0001	0.0911
<i>Lachnospiraceae UCG-004</i>	-0.074	0.021	0.0001	-0.115	-0.033	0.0804	0.0147	0.1772
Disp_Index (Varmax2)								
<i>Holdemanella</i>	0.019	0.019	0.327	-0.019	0.058	0.0067	0.0001	0.0583
<i>Eggerthellaceae uncultured</i>	0.004	0.022	0.850	-0.038	0.046	0.0003	0.0001	0.0254
<i>Mogibacterium</i>	0.035	0.019	0.076	-0.004	0.073	0.0215	0.0001	0.0905
<i>Atopobiaceae uncultured</i>	0.009	0.020	0.657	-0.031	0.049	0.0014	0.0001	0.0386
Disp_Index2 (Varmax3)								
<i>Roseburia</i>	-0.018	0.017	0.270	-0.051	0.014	0.0084	0.0001	0.0629
<i>Parabacteroides</i>	-0.030	0.016	0.064	-0.063	0.002	0.0235	0.0001	0.0940
<i>Lachnospiraceae NK4A136</i>	-0.016	0.017	0.359	-0.049	0.018	0.0058	0.0001	0.0559
<i>Xylanophilum group</i>	-0.003	0.017	0.873	-0.037	0.031	0.0002	0.0001	0.0229
N	143							

Tabla 21. Modelos lineales generalizados mixtos para los géneros bacterianos de los componentes principales.

XV. Discusión

Hasta donde sabemos, este es el primer ensayo clínico aleatorizado que evalúa la eficacia de la terapia combinada de LM en el tratamiento de sujetos con prediabetes durante un año usando la monoterapia con metformina y el grupo sin tratamiento (en condiciones basales) como control. A los 6 y 12 meses del ensayo clínico, ambos fármacos antidiabéticos mejoraron significativamente los parámetros antropométricos, bioquímicos y clínicos evaluados específicamente, la M tuvo un efecto superior en el aumento de la sensibilidad a la insulina y la LM favoreció la función de las células β pancreáticas. El efecto de la linagliptina es consistente con un metaanálisis de ensayos clínicos controlados aleatorizados en la que los inhibidores de la DPP-4 como monoterapia o terapia adicional mejoraron significativamente la función de las células β , pero no tuvieron un efecto significativo sobre la IR en DM2²⁸². En contraste, de acuerdo con la literatura, la M mostró un impacto ligeramente mayor en el alivio de la hiperglucemia, la sensibilidad a la insulina y el HOMA-IR en pacientes con prediabetes²⁸³. A partir de los resultados obtenidos, nos preguntamos si el MI ejercía un efecto mediador sobre el aumento de la sensibilidad a la insulina y la función de las células β pancreáticas observado en nuestro ensayo clínico. Para responder a esta pregunta, utilizamos el aprendizaje automático y demostramos que la intervención con M y LM afecta la composición de la MI humana en los niveles de género en pacientes con prediabetes como se ha reportado en DM2^{242,243,254,258-262,264-267} e identificamos los cambios específicos en la estructura microbiana a los 6 y 12 meses de intervención con ambos antidiabéticos en géneros bacterianos y unidades taxonómicas operativas (OTUs).

Nosotros demostramos que la intervención con LM afecta la composición del MI humano en los niveles de género a los 6 y 12 meses de intervención. Este efecto de los fármacos solo se había observado en modelo animal con otros inhibidores de la DPP-4. Por una parte, Qian Zhang et al, en su estudio determinó el efecto de la vildagliptina en el incremento de bacterias productoras de butirato en ratas inducidas a DM2, con dieta alta en lípidos y estreptozotocina se proporcionó vildagliptina a

dos dosis, alta (0.02 gr/kg) y baja (0.01 gr/kg) los cuales mostraron diferencias estadísticamente significativas en comparación con ratas control en el número de Unidades Taxonómicas Operacionales (OTU), $p < 0.01$. La vildagliptina disminuyó la abundancia de *Tenericutes* y *Elusimicrobia*, eficaces en la extracción de energía de la dieta, con significancia estadística $p < 0.05^{259}$, contrario a lo observado en nuestro estudio. Sin embargo, coincidimos en el enriquecimiento de bacterias productoras de butirato como *Lactobacillus*, *Roseburia*, *Fusicatenibacter* y *Blautia*²⁵⁹, estos géneros promueven la producción de péptidos en íleon y reduce indirectamente la expresión hepática de citocinas proinflamatoria en DM2²⁵⁹. Por otra parte, Lin Wang et al, con otros inhibidores de la DPP-4 observaron que la MI puede modularse con dos tratamientos liraglutida (agonista de los receptores de GLP-1) y saxagliptina (inhibidor de la DPP-4), los autores encontraron que los ratones tratados con liraglutida enriquecieron los generos *Allobaculum*, *Turicibacter*, *Anaerostipes*, *Blautia*, y *Lactibacillus*²⁶⁰. La saxagliptina aumentó la abundancia de *Lactobacillus*, *Allobaculum* y *Turicibacter*²²⁷. Ambos tratamientos incrementaron géneros bacterianos productores de AGCC como lo que reportamos en lo observado por el algoritmo de Random Forest. Liraglutida y saxagliptina al enriquecieron *Lactobacillus*, este género posee actividad inhibitoria contra DPP-4, quedando evidente el probable incremento en las incretinas y a su vez su acción sobre la homeostasis de la glucosa²²⁷.

El conocimiento actual sobre la interacción entre la metformina y el microbioma intestinal destaca que la metformina reduce la diversidad interna del microbioma intestinal en ratones diabéticos alimentados con una dieta rica en grasas y su administración aumenta la abundancia relativa de *Akkermansia muciniphila*²⁸³. También hay evidencia de que la metformina aumenta la abundancia de algunos otros géneros degradadores de mucina productores de AGCC y patógenos oportunistas como *Escherichia spp*²⁸⁴. Asimismo, un metaanálisis de 199 personas con DM2 y 544 participantes control sin DM2 confirmó que la metformina alteró significativamente la composición del MI: los pacientes con DM2 que recibieron metformina pudieron identificarse en función de los cambios en la composición de

su MI²⁸⁵, Es probable que la metabolómica arroje mucha luz sobre este tema. En nuestro estudio, la composición del MI cambió con los medicamentos antidiabéticos a lo largo del tiempo y es parcialmente inconsistente con la evidencia; A los seis meses de seguimiento con metformina, los géneros *Fusicatenibacter*, *Blautia* y [*Ruminococcus*] *gauvreauii* group, aumentaron su abundancia, estas son bacterias productoras de AGCC. Además, evidenciaron un fuerte efecto inhibitor sobre bacterias potencialmente enteropatógenas y productoras de LPS, como *Proteobacteria*, *Escherichia-Shigella* y *Enterococcus*. Curiosamente, en el seguimiento de 12 meses, nosotros identificamos 8 géneros con mayor abundancia *Fusicatenibacter*, *Atopobiaceae*, *Coprococcus 1*, *Lachnospiraceae ND 3007 group*, *Anaerostipes*, *Dorea*, *Lachnospiraceae FCS020 group* y *Blautia*. Mayoritariamente productoras de ácidos grasos de cadena corta, y curiosamente *Akkermansia* y otras bacterias degradadoras de mucina reportadas en otras poblaciones no fueron protagonistas en sujetos con prediabetes, al contrario de lo reportado en franca DM2^{242,243,254,261}.

Al contrastar ambos fármacos en los diferentes periodos evaluados, observamos que el grupo de sujetos que consumió LM incremento géneros bacterianos; tanto productores de AGCC como patógenos oportunistas, sin establecer un patrón claro de la funcionalidad de la ecología microbiana. Lo cual pudimos corroborar con el análisis de componentes principales, evidenciando la complejidad de las interacciones microbianas que en este estudio no se dilucido. En cambio, a los 12 meses en el grupo tratado con M se observó claramente la reducción de patógenos oportunistas y géneros involucrados en el desarrollo de la DM2 reportados en distintos estudios a nivel mundial^{242,261}. Con base en los hallazgos, nosotros evidenciamos que el efecto de la metformina sobre la MI es superior a la terapia combinada, y con mayor efecto a largo plazo, a los 12 meses después de tratamiento mantiene abundancia superior en productores de AGCC y limita el incremento de patógenos oportunistas. Sin embargo, los fármacos evidencian en sus diferentes contrastes que el cambio en la composición de la MI esta mediado por el incremento de géneros productores de AGCC.

Los géneros productores de AGCC son un grupo abundante y filogenéticamente diverso de bacterias que desempeñan un papel esencial en el mantenimiento de la salud del huésped. Los AGCC, como el butirato juega un papel esencial en la sensibilidad a la insulina humana a través de las incretinas, que son péptidos intestinales que actúan como hormonas producidas en el tracto gastrointestinal por las células enteroendocrinas en respuesta a la ingesta de alimentos. A nivel funcional, las incretinas florecen en las células de los islotes de Langerhans, aumentando la secreción de insulina en un 70% en el estado posprandial y consecuentemente disminuyendo la secreción de glucagón en función de la glucosa circulante. Las principales incretinas son el péptido similar al glucagón 1 (GLP-1) y el péptido insulínico dependiente de glucosa (GIP). Los AGCC, productos de la fermentación sacarolítica, se unen a los receptores de ácidos grasos libres acoplados a proteína G en la mucosa colónica, que son el receptor acoplado a proteína G tipo 41 (GPR41) y el receptor acoplado a proteína G tipo 43 (GPR43). El receptor GPR41 libera el péptido YY, que reduce la energía extraída de la dieta, aumentando el peristaltismo intestinal. Por el contrario, GPR43 induce la liberación de insulina dependiente de glucosa, e inhibe la secreción de glucagón, mejora la sensibilidad a la insulina, reduce la gluconeogénesis hepática y controla el apetito. Además, los AGCC pueden prevenir la obesidad y la RI al pasar de la lipogénesis a la oxidación de ácidos grasos en el hígado y el tejido adiposo.

Existe evidencia de apoyo en un modelo de ratón alimentado con una dieta alta en grasas, donde la suplementación con butirato previene el aumento de peso corporal y aumenta la sensibilidad a la insulina. Además, el butirato y el propionato pueden inducir la gluconeogénesis intestinal, actuando a través de un circuito neural intestino-cerebro para mejorar la producción periférica de glucosa y la sensibilidad a la insulina. Los cambios en el MI pueden influir en el metaboloma intestinal, afectando así la producción intestinal de butirato y acetato^{285,286}. Estos son los principales metabolitos derivados del intestino que están implicados en la RI del huésped y, por lo tanto, en el control de la glucemia. Se ha sugerido que una mejora en las bacterias que producen los AGCC butirato y propionato podría mejorar la

glucosa en sangre²⁸⁷. El butirato y el propionato aumentan la gluconeogénesis intestinal. En roedores, el aumento de la gluconeogénesis intestinal da como resultado una reducción de la gluconeogénesis hepática, del apetito y del peso, lo que conduce a una mejor homeostasis de la glucosa²⁸⁷.

En particular, el MI de los participantes que tomaron metformina ejerció una mayor capacidad para producir butirato y propionato²⁸⁸. Sin embargo, hasta la fecha, los efectos de la linagliptina en la MI de humanos no se han evaluado²⁸⁹ en ensayos clínicos por tal motivo basamos nuestros conocimientos en diversos estudios que observaron un cambio en la composición microbiana asociado con el impacto directo de la inhibición de DPP-4 en modelo murino. Donde, la administración de sitagliptina + metformina en ratas Zucker ha demostrado un aumento de GLP1, que previamente se ha asociado a una mayor presencia de *Bacteroidetes*²⁹¹. Por el contrario, Yan et al., encontraron que la sitagliptina revertió parcialmente la disbiosis inducida experimentalmente y alteró la población de bacterias productora. Ambos estudios correlacionaron con variables bioquímicas y encontraron incremento en la sensibilidad a la insulina. Por otro lado, el tratamiento con vildagliptina se asoció con una menor abundancia de *Oscillibacter* y una mayor abundancia de *Lactobacillus*, con ligandos TLR reducidos y propionato aumentado. Estos efectos sobre las bacterias intestinales pueden influir potencialmente en los niveles circulantes de GLP-1, que a su vez pueden existir como un circuito de retroalimentación para influir en la composición microbiana y la abundancia de metabolitos microbianos. Asimismo, Zhan et al., determinaron el efecto de vildagliptina sobre el aumento de bacterias productoras de butirato en ratones con DM2. La vildagliptina redujo *Firmicutes* y aumentó *Bacteroidetes*, bacterias productoras de butirato y *Lactobacillus*. Estos cambios se asociaron con reducción de glucosa en ayunas, posprandial, HbA1c, HOMA-IR e IL-6 en comparación con los ratones normoglucémicos y con DM2, con una significancia estadística de $p < 0,01$ para cada variable^{292, 293}.

En este ensayo clínico es importante destacar que los participantes fueron tratados con metformina, en ambos grupos de tratamiento a dosis iguales, lo que permite hacer una comparación razonable con terapia combinada de LM. Esto favoreció la identificación de diferencias entre los grupos, lo que sugiere que el efecto de la linagliptina en la composición de MI es elevado solo en los primeros meses²⁹⁴, y la metformina logro eclipsar el efecto potencial de la linagliptina a largo plazo.

Con el fin de dilucidar la contribución de los MI por género bacteriano en el cambio de la sensibilidad a la insulina y en la función de las células β pancreáticas. Nuestro análisis estadístico incluyó métodos eficientes como bloques jerárquicos en regresión múltiple y ecuaciones estructurales, que se realizaron para comprender las asociaciones de géneros bacterianos como potenciales mediadores de los hallazgos en los índices clínicos ajustando por antidiabético, el mes de seguimiento, sexo, edad, IMC y los géneros bacterianos más relevantes. Observamos 21 bacterias que contribuyeron al aumento de la sensibilidad y secreción de insulina con tamaños de efecto pequeños y estadísticamente significativos. Los resultados asociaron a *Roseburia*, *Erysipelotrichaceae* UCG-003, *Butyrivicoccus*, *[Eubacterium] xylanophilum group* y *Eggerthellaceae* con el índice de Matsuda. En cambio, *Clostridiales vadinBB60 group_metagenome*, *Lachnospiraceae* NK4A136 group, *Actinomyces* y *Negativibacillus* con HOMA-IR. *Erysipelotrichaceae* UCG-003 fue un taxón que aumentó en abundancia y su incremento se asoció con la sensibilidad a la insulina²⁹⁵. Con respecto a la función de las células β pancreáticas; *Fournierella* con AIR, *Gnavus group*, *Turicibacter* y *Mogibacterium* con ORAL-DI, *Dorea*, *Parabacteroides*, *Catenibacterium* y *Holdemania* con Disp_Index2 y *Butyrivicoccus*, *[Eubacterium] xylanophilum group*, *Atopibiaceae uncultured*, *Peptococcaceae uncultured* y *Lachnospiraceae* UCG-004 con AUCinsgluc_OGTT. Por otro lado, la familia *Lachnospiraceae* aumenta la abundancia de AGCC y favorece la función de las células β pancreáticas²⁸⁴.

Los modelos de bloques jerárquicos para la regresión lineal mostraron que los fármacos antidiabéticos y el IMC explicaban en mayor medida la sensibilidad a la

insulina (evaluado por el índice de Matsuda) y la función de las células β (ORAL-DI y Disp_Index2). Sin embargo, cuatro géneros bacterianos son estadísticamente significativos para los índices clínicos, donde por cada aumento de unidad en *Catenibacterium* y *Catabacter*, el índice de Matsuda aumentó en 0,079 y disminuyó en -0,083, respectivamente. En cuanto al Disp_Index2, por cada unidad de incremento de *Negativibacilis* y *Lachnospiraceae UCG-004*, el índice de Matsuda aumentó en 0,061 y disminuyó en -0,103, respectivamente. Estudios recientes han informado una asociación entre la abundancia de géneros bacterianos específicos y la DM2, y se observó cambios en la abundancia de bacterias productoras de AGCC y degradadoras de mucina durante el tratamiento con metformina e inhibidores de DPP4 en modelos murinos y humanos²⁹⁶.

Los resultados de la mayoría de los estudios informados hasta el momento se limitan a una asociación entre MI y la homeostasis de la glucosa durante un corto período de tiempo. Sin embargo, la asociación entre la mejoría metabólica y el tratamiento farmacológico antidiabético por cambios en el MI aún no está clara²⁹⁷. Nuestros resultados son consistentes con estudios previos, las asociaciones entre la abundancia bacteriana de géneros específicos son bajas ($r=0.1-0.2$) con respecto a variables clínicas (glucosa en ayunas, posprandial, AUC de glucosa durante la curva de tolerancia oral, HOMA-RI o Matsuda Index) en diferentes poblaciones y modelos de estudio. Sin embargo, los medicamentos antidiabéticos afectan la composición de la MI, antropométrica (disminución del peso, la grasa corporal y la circunferencia de la cintura), bioquímica (aumento de la sensibilidad a la insulina y función de las células β pancreáticas) y clínica (reducción de la presión arterial sistólica y diastólica), lo que podría influir en los resultados anteriores. En concreto, encontramos que el efecto de los fármacos antidiabéticos tiene un mayor impacto en el resultado de los índices clínicos que la contribución de los MI. Porque la linagliptina y la metformina ejercen sus efectos hipoglucemiantes a través de mecanismos complementarios. Por una parte, la linagliptina inhibe la enzima DPP-4, prolongando así la vida media de las incretinas intestinales, GLP-1 y el polipéptido inhibidor gástrico. Esto da como resultado un aumento de la secreción de insulina

dependiente de la glucosa y una disminución de la producción de glucagón, lo que conduce a una mejora general en la homeostasis de la glucosa tanto en ayunas como posprandial. Además, los datos preclínicos han demostrado que la linagliptina, a través de sus efectos potenciadores de la incretina, puede retrasar la progresión de la enfermedad al preservar la masa y la función de las células β pancreáticas. El mecanismo de acción de la metformina es independiente de la secreción de insulina y se produce principalmente mediante la inhibición de la gluconeogénesis hepática y la mejora de la sensibilidad periférica a la insulina. Además, la metformina aumenta la producción de GLP-1 en pacientes obesos con y sin DM2, y un estudio reciente confirmó que la monoterapia con metformina aumenta los niveles de GLP-1 posprandial independientemente de la actividad de la DPP-4. Por tanto, el uso del SPC de linagliptina + metformina puede conducir a un mayor aumento de los niveles de GLP-1, lo que podría dar lugar a efectos hipoglucemiantes aditivos o sinérgicos²⁹⁸. Al usar SEM, encontramos evidencia sólida de una relación entre el IMC (pero no la adiposidad total medida por el IMC) y la sensibilidad y secreción de insulina. La metformina y la linagliptina son fármacos eficaces para la reducción de peso de forma ambulatoria en pacientes con sobrepeso y obesidad resistentes a la insulina²⁹⁹. Además de los fármacos, los pacientes presentaron cambios en el estilo de vida que favorecieron la reducción del peso corporal y porcentaje de grasa durante el año de intervención y aumento de la sensibilidad a la insulina. Según lo informado por Clamp et al., en su estudio en donde las personas que mantuvieron con éxito la pérdida de peso fueron significativamente más sensibles a la insulina en comparación con aquellas que mantuvieron el peso inicial³⁰⁰. La pérdida de peso en sí misma fue el predictor más fuerte de una mejor sensibilidad a la insulina, mientras que la recuperación de peso predijo significativamente una reducción de la sensibilidad a la insulina. Los programas de mantenimiento de la pérdida de peso son esenciales para retener los beneficios metabólicos obtenidos a través de la pérdida de peso. Ser físicamente activo y llevar una dieta equilibrada aumenta la sensibilidad a la insulina en pacientes con obesidad y DM2³⁰⁰.

Por otro lado, la abundancia bacteriana de los géneros productores de AGCC explicó débilmente el cambio en la sensibilidad a la insulina y la función de las células β pancreáticas con una eta cuadrada de 0,01 en ambos casos en comparación con los efectos mostrados por los fármacos antidiabéticos y la pérdida de peso. Por lo tanto, concluimos que los fármacos antidiabéticos tienen un fuerte efecto sobre el cambio de la condición metabólica (sensibilidad y secreción de insulina) y un efecto moderado sobre la composición del MI. Pero el MI tiene poco o ningún efecto sobre el cambio en la condición metabólica. Para reforzar la afirmación realizada, evaluamos la abundancia de géneros bacterianos utilizando un modelo lineal generalizado mixto y ajustado por antidiabéticos y el cambio en la sensibilidad a la insulina y aumento en la función de las células β pancreáticas, y verificamos que el cambio en la condición metabólica modifica la estructura de la MI. Es decir, la condición metabólica saludable determina la estructura y función de la MI. Al evaluar el cambio en la condición metabólica inducida por los tratamientos antidiabéticos, este efecto es mayor en el cambio en la composición del MI.

Hallazgos recientes han sugerido que la composición microbiana intestinal está asociada con enfermedades metabólicas, como la obesidad, la diabetes o la enfermedad del hígado graso no alcohólico. Estos hallazgos han indicado que los MI deben considerarse un factor importante en la modulación del metabolismo del huésped y los trastornos metabólicos. Esto respalda la teoría de que las bacterias intestinales han evolucionado junto con los humanos y han mostrado profundos efectos en varias respuestas del huésped³⁰¹. Es decir, la condición clínica explica mejor el cambio en la composición y función de la MI en pacientes con prediabetes. Una debilidad de nuestro estudio es que solo se midió la composición de MI y no se midieron metabolitos u otras medidas de la función de la MI. Sin embargo, nuestros resultados actuales constituyen la primera evaluación del efecto de la inhibición de DPP-4 sobre la composición de la MI en humanos con prediabetes.

XVI. Conclusiones

Se ha demostrado que la monoterapia con M y la terapia combinada de LM favorecen la homeostasis de la glucosa, y la LM incrementa la función de las células β pancreáticas y mejoran la condición clínico-metabólica de los sujetos. De manera simultánea el cambio metabólico reestructura la composición de la MI a nivel de género, aumentando las bacterias degradadoras de mucina y productoras de AGCC que mantienen la función de barrera intestinal y favorecen el efecto incretina, respectivamente. En estos términos concluimos que: 1) la pérdida de peso y grasa corporal y 2) el cambio en la condición metabólica generada por los fármacos antidiabéticos tiene un mayor efecto sobre la homeostasis de la glucosa y función de las células β pancreáticas en comparación con la débil contribución de los géneros bacterianos. Por lo tanto, esperamos que futuros estudios omicos a profundidad determinen cuánto del efecto hipoglucemiante de los fármacos proviene de su alteración de la MI y qué papel juega en el desarrollo y la progresión de la DM2.

XVII. Fortalezas y limitaciones.

Fortalezas.

Las fortalezas del estudio son la generación de conocimientos sobre el impacto del fármaco (LM) en el MI de sujetos con Prediabetes, durante una ingesta crónica, esta información actualmente es desconocida en humanos. Además, el uso de algoritmos estadísticos, la perspectiva de uso de Machine Learning, la integración de información clínica en diversos planos de la ciencia permitió ahondar en los datos y la integración interdisciplinaria del estudio.

- 3 artículos publicados en revistas de alto impacto:

- Rodolfo Guardado-Mendoza, Sara Stephania Salazar-López, Mildred Álvarez-Canales, Diana Farfán-Vázquez, **Yoscelina Estrella Martínez-López**, Lilia M. Jiménez-Ceja, Erick L. Suárez-Pérez, Fabiola Angulo-Romero, María Lola Evia-Viscarra, María Luisa Montes de Oca-Loyola, Edgar G. Durán-Pérez, Franco Folli, Alberto Aguilar-García. **The combination of linagliptin, metformin and lifestyle modification to prevent type 2 diabetes (PRELLIM). A randomized clinical trial.** *Metabolism Clinical and Experimental* 104 (2020) 154054. Effect of linagliptin on glucose metabolism and pancreatic β cell function in patients with persistent prediabetes after metformin and lifestyle.
- Mildred Fátima de la Luz Alvarez-Canales, Sara Stephania Salazar-López, Diana Farfán-Vázquez, **Yoscelina Estrella Martínez-López**, Jessica Noemí González-Mena, Lilia Marisela Jiménez-Ceja, Katya Vargas-Ortiz, María Lola Evia-Viscarra, María Luisa Montes de Oca-Loyola, Franco Folli, Alberto Aguilar-García & Rodolfo Guardado-Mendoza. **Effect of linagliptin on glucose metabolism and pancreatic beta cell function in patients with persistent prediabetes after metformin and lifestyle.** *Scientific Reports* (2021) 11:8750
- **Martínez_López Yoscelina Estrella**, Esquivel-Hernández Diego A., Sánchez-Castañeda Jean Paul, Neri-Rosario Daniel, Guardado-Mendoza Rodolfo, Resendis-Antonio Osbaldo. **Type 2 diabetes, gut microbiome, and systems biology: A novel perspective for a new era.** *Gut Microbes*, 14:1.
- El beneficio indirecto es poder descifrar la interacción bidireccional fármaco-MI y su influencia en los resultados clínicos, permitirá facilitar nuevos enfoques en medicina de precisión contra la prediabetes, patología poco conocida y de baja intervención.

- Consolidación de una línea de investigación en prediabetes, DM2 – Microbioma intestinal – Biología de sistemas y desarrollo de redes de colaboración con instituciones nacionales e internacionales.

Limitaciones.

Las limitaciones radican en los sujetos perdidos durante el seguimiento, la consistencia y cantidad de heces entregadas en cada visita de seguimiento por los participantes, ya que la cantidad de ADN obtenido puede ser insuficiente para la secuenciación. Además, no se midieron metabolitos u otros parámetros de la función de la MI y no contar con un grupo de sujetos con tratamiento de monoterapia de linagliptina. Por otro lado, el efecto confusor de las variables intrínsecas que permiten aislar las variables y su efecto.

XVIII. Bibliografía

1. Vázquez Morales E, Calderón Ramos ZG, Arias Rico J, Ruvalcaba Ledezma JC, Rivera Ramírez LA, Ramírez Moreno E. Sedentarismo, alimentación, obesidad, consumo de alcohol y tabaco como factores de riesgo para el desarrollo de diabetes tipo 2. *JONNPR*. 2019;4(10):1011-21. DOI: 10.19230/jonnpr.3068
2. Livia Bordalo Tonucci, Karina Olbrich Dos Santos, Celia Lucia De Lucas Fortes Ferreira, Sonia Machado Rocha Ribeiro, Leandro Licursi De Oliveira & Hercia Stampini Duarte Martino (2015): Clinical Application of Probiotics in Diabetes Mellitus: Therapeutics and New Perspectives, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, DOI: 10.1080/10408398.2014.934438
3. Jonietz, E. (2012). Pathology: Cause and effect. *Nature*. 485: 8-10.
4. Gomez-Eguilaz M, Ramon-Trapero JL, Perez-Martinez L, Blanco JR. El eje microbiota-intestino-cerebro y sus grandes proyecciones [The microbiota-gut-brain axis and its great projections]. *Rev Neurol*. 2019 Feb 1;68(3):111-117. Spanish. PMID: 30687918.
5. Schroeder BO, Bäckhed F. Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. *Nat Med*. 2016 Oct;22(10):1079-1089. doi: 10.1038/nm.4185. Epub 2016 Oct 6. PMID: 27711063.
6. Larsen N, Vogensen FK, van den Berg FWJ, Nielsen DS, Andreasen AS, Pedersen BK, et al. (2010) Gut Microbiota in Human Adults with Type 2 Diabetes Differs from Non-Diabetic Adults. *PLoS ONE* 5(2): e9085. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009085>.
7. Qin, J., Li, Y., Cai, Z., Li, S., Zhu, J., Zhang, F., et al. (2012). A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* 490, 55–60.
8. Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, Semenkovich CF, Gordon JI. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Nov 2;101(44):15718-23. doi:

- 10.1073/pnas.0407076101. Epub 2004 Oct 25. PMID: 15505215; PMCID: PMC524219.
9. Cani PD, Delzenne NM. Gut microflora as a target for energy and metabolic homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2007 Nov;10(6):729-34. doi: 10.1097/MCO.0b013e3282efdebb. PMID: 18089955.
 10. Gravitz, L. Microbiome: The critters within. *Nature* 485, S12–S13 (2012). <https://doi.org/10.1038/485S12a>
 11. Ceriello A, Motz E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 May;24(5):816-23. doi: 10.1161/01.ATV.0000122852.22604.78. Epub 2004 Feb 19. PMID: 14976002.
 12. Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol*. 2004 Jan;25(1):4-7. doi: 10.1016/j.it.2003.10.013. PMID: 14698276.
 13. Stephens JW, Khanolkar MP, Bain SC. The biological relevance and measurement of plasma markers of oxidative stress in diabetes and cardiovascular disease. *Atherosclerosis*. 2009 Feb;202(2):321-9. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2008.06.006. Epub 2008 Jun 20. PMID: 18640680.
 14. Petruzzelli M, Moschetta A. Intestinal ecology in the metabolic syndrome. *Cell Metab*. 2010 May 5;11(5):345-6. doi: 10.1016/j.cmet.2010.04.012. PMID: 20444415.
 15. Vijay-Kumar M, Aitken JD, Carvalho FA, Cullender TC, Mwangi S, Srinivasan S, Sitaraman SV, Knight R, Ley RE, Gewirtz AT. Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5. *Science*. 2010 Apr 9;328(5975):228-31. doi: 10.1126/science.1179721. Epub 2010 Mar 4. PMID: 20203013; PMCID: PMC4714868.
 16. Bonnie C. Nicholson, Robert A. Fox, Sheila D. Johnson. Parenting young children with challenging behavior. *Inf. Child Dev*. 14: 425–428 (2005)

17. Hsu SM, Raine L, Fanger H (1981) Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29: 577-580
18. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas 2015*. 7th ed. <http://www.diabetesatlas.org>. Accessed 11 November 2018.
19. King H, Aubert RE, Herman WH (1998) Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 21: 1414-1431
20. Lupi R, Del Prato S (2008) Beta-cell apoptosis in type 2 diabetes: quantitative and functional consequences. *Diabetes Metab* 34 Suppl 2: S56-6447
21. Villalpando S, de la Cruz V, Rojas R, et al. Prevalence and distribution of type 2 diabetes mellitus in Mexican adult population: a probabilistic survey. *Salud Pública Mex* 52 Suppl 1: S19-26
22. Villalpando S, Shamah-Levy T, Rojas R, Aguilar-Salinas CA Trends for type 2 diabetes and other cardiovascular risk factors in Mexico from 1993-2006. *Salud Publica Mex* 52 Suppl 1: S72-79
23. INEGI Censo de Población 2016. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2016.
24. INEGI Censo de Población 2018. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2018.
25. INEGI Censo de Población 2020. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2020.
26. Rull JA (2000) The impact of Diabetes Mellitus on Public Health in Mexico. *Current Science LTd*: 64-74.
27. Haffner SM, Lehto S, Ronnemaa T, Pyorala K, Laakso M (1998) Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med* 339: 229-234
28. Andrikopoulos S, Hull RL, Verchere CB, et al. (2004) Extended life span is associated with insulin resistance in a transgenic mouse model of insulinoma

- secreting human islet amyloid polypeptide. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286: E418-424
29. Schulz LO, Bennett PH, Ravussin E, et al. (2006) Effects of traditional and western environments on prevalence of type 2 diabetes in Pima Indians in Mexico and the U.S. *Diabetes Care* 29: 1866-1871
 30. Staiger H, Machicao F, Fritsche A, Haring HU (2009) Pathomechanisms of type 2 diabetes genes. *Endocr Rev* 30: 557-585
 31. Del Guerra S, Lupi R, Marselli L, et al. (2005) Functional and molecular defects of pancreatic islets in human type 2 diabetes. *Diabetes* 54: 727-735
 32. Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC (2003) Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52: 102-110
 33. DeFronzo RA, Bonadonna RC, Ferrannini E (1992) Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview. *Diabetes Care* 15: 318-368
 34. Hoppener JW, Ahren B, Lips CJ (2000) Islet amyloid and type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 343: 411-419
 35. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM (2002) Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 23: 599-622
 36. Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Tanaka Y, Takahashi H (2003) Glucose toxicity in beta-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. *Diabetes* 52: 581-587
 37. Guardado-Mendoza R, Davalli AM, Chavez AO, et al. (2009) Pancreatic islet amyloidosis, beta-cell apoptosis, and alpha-cell proliferation are determinants of islet remodeling in type-2 diabetic baboons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 13992-13997
 38. Martin BC, Warram JH, Krolewski AS, Bergman RN, Soeldner JS, Kahn CR (1992) Role of glucose and insulin resistance in development of type 2 diabetes mellitus: results of a 25-year follow-up study. *Lancet* 340: 925-929

39. Ritzel RA, Meier JJ, Lin CY, Veldhuis JD, Butler PC (2007) Human islet amyloid polypeptide oligomers disrupt cell coupling, induce apoptosis, and impair insulin secretion in isolated human islets. *Diabetes* 56: 65-71
40. DeFronzo RA (2004) Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med Clin North Am* 88:787-835
41. Ferrannini E (2009) Insulin resistance versus beta-cell dysfunction in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Curr Diab Rep* 9: 188-189
42. DeFronzo RA, Tripathy D (2009) Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 32 Suppl 2: S157-163
43. Ferrannini E, Gastaldelli A, Miyazaki Y, Matsuda M, Mari A, DeFronzo RA (2005) Beta-Cell function in subjects spanning the range from normal glucose tolerance to overt diabetes: a new analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 493-500
44. Gastaldelli A, Ferrannini E, Miyazaki Y, Matsuda M, DeFronzo RA (2004) Beta-cell dysfunction and glucose intolerance: results from the San Antonio metabolism (SAM) study. *Diabetologia* 47: 31-39
45. Weir GC, Bonner-Weir S (2004) Five stages of evolving beta-cell dysfunction during progression to diabetes. *Diabetes* 53 Suppl 3: S16-21
46. Dunning BE, Gerich JE (2007) The role of alpha-cell dysregulation in fasting and postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes and therapeutic implications. *Endocr Rev* 28: 253-283
47. Ferrannini E, Muscelli E, Natali A, et al. (2007) Association of fasting glucagon and proinsulin concentrations with insulin resistance. *Diabetologia* 50: 2342-2347
48. Gromada J, Franklin I, Wollheim CB (2007) Alpha-cells of the endocrine pancreas: 35 years of research but the enigma remains. *Endocr Rev* 28: 84-116
49. Yoon KH, Ko SH, Cho JH, et al. (2003) Selective beta-cell loss and alpha-cell expansion in patients with type 2 diabetes mellitus in Korea. *J Clin Endocrinol Metab* 88:2300-2308

50. Holst JJ, Gromada J (2004) Role of incretin hormones in the regulation of insulin secretion in diabetic and nondiabetic humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287: E199-206
51. Meier JJ, Hucking K, Holst JJ, Deacon CF, Schmiegel WH, Nauck MA (2001) Reduced insulinotropic effect of gastric inhibitory polypeptide in first-degree relatives of patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 50: 2497-2504
52. Nauck MA, El-Ouaghli A, Gabrys B, et al. (2004) Secretion of incretin hormones (GIP and GLP-1) and incretin effect after oral glucose in first-degree relatives of patients with type 2 diabetes. *Regul Pept* 122: 209-217
53. Enoki S, Mitsukawa T, Takemura J, et al. (1992) Plasma islet amyloid polypeptide levels in obesity, impaired glucose tolerance and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 15: 97-102
54. Kahn SE, Verchere CB, Andrikopoulos S, et al. (1998) Reduced amylin release is a characteristic of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes in Japanese Americans. *Diabetes* 47: 640-645
55. Knowles NG, Landchild MA, Fujimoto WY, Kahn SE (2002) Insulin and amylin release are both diminished in first-degree relatives of subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 25: 292-297
56. Ludvik B, Lell B, Hartter E, Schnack C, Prager R (1991) Decrease of stimulated amylin release precedes impairment of insulin secretion in type II diabetes. *Diabetes* 40: 1615-1619
57. Ludvik B, Thomaseth K, Nolan JJ, Clodi M, Prager R, Pacini G (2003) Inverse relation between amylin and glucagon secretion in healthy and diabetic human subjects. *Eur J Clin Invest* 33: 316-322
58. Makimattila S, Fineman MS, Yki-Jarvinen H (2000) Deficiency of total and nonglycosylated amylin in plasma characterizes subjects with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 2822-2827
59. Quintanilla – Garcia Cristina, Zuñiga – Guajardo Sergio. El efecto incretina y su participación en la diabetes mellitus tipo 2. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 2010; 48 (5): 509-520

60. Kieffer TJ, Habener JF. The glucagon-like peptides. *Endocr Rev* 1999;20(6):876-913.
61. Salehi M, Beneridkt A, D'Alessio DA. Targeting β cell mass in type 2 diabetes: promise and limitations of new drugs based on incretins. *Endocr Rev* 2008;29(3):367-379.
62. Chia CW, Egan JM. Incretin based therapies in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93(10):3703-3716.
63. Murphy KG, Dhillon WS, Bloom SR. Gut peptides in the regulation of food intake and energy homeostasis. *Endocr Rev* 2006;27(7):719-727.
64. Romero Zazueta A. Polipéptido insulíntrópico dependiente de glucosa y péptido semejante al glucagón tipo 1: acciones fisiológicas e implicaciones en la diabetes tipo 2 y la obesidad. *Revista de Endocrinología y Nutrición* 2007;15(3):156-164.
65. Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP1 and GIP. *Gastroenterology* 2007;132(6):2131-2157.
66. Ebert R, Creutzfeldt W. Gastrointestinal peptides and insulin secretion. *Diabetes Metab Rev* 1987;3 (1):1-26
67. Vilsboll T, Brock B, Perrild H, Levin K, Lervang HH, Kolendorf K, et al. Liraglutide, a once-daily human GLP-1 analogue improves β -cell function and arginine-stimulated insulin secretion at hyperglycaemia in patients with Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med* 2008; 25:152-156.
68. Abu-Hamdah R, Rabiee A, Meneilly GS, Shannon RP, Andersen DK, Elahi D. The extrapancreatic effects of glucagon-like peptide-1 and related peptides. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94(6): 1843-1852.
69. Vilsboll T, Krarup T, Deacon CF, Madsbad S, Holst JJ. Reduced post-prandial concentrations of intact biologically active glucagon-like peptide 1 in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 2001;50(3):609-613.
70. Neumiller JJ. Differential chemistry (structure), mechanism of action, and pharmacology of GLP-1 receptor agonist and DPP-4 inhibitors. *J Am Pharm Assoc* 2009;49 (Suppl 1): S16-29.

71. D'Alessio DA, Denney AM, Hermiller LM, Prigeon RL, Martin JM, Tharp WG, et al. Treatment with the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor vildagliptin improves fasting islet-cell function in subjects with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94(1):81-88.
72. Burgos A. Rol de las Incretinas. *Rev Hosp Clín Univ Chile* 2012; 23: 213 – 8.
73. Knop FK, Vilsboll T, Hojberg PV, Larsen S, Madsbad S, Volund A, et al. Reduced incretin effect in type 2 diabetes: cause or consequence of the diabetic state? *Diabetes* 2007;56(8):1951-1959.
74. Nauck MA, Heimesaat MM, Orskov C, Holst JJ, Ebert R, Creutzfeldt W. Preserved incretin activity of glucagons-like peptide 1 (7-36 amide) but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1993; 91(1):301-307.
75. Rachman J, Barrow BA, Levy JC, Turner RC. Near normalization of diurnal glucose concentrations by continuous administration of glucagon-like peptide 1 (GLP1) in subjects with NIDDM. *Diabetologia* 1997;4(2) 0:205-211.
76. Zander M, Madsbad S, Madsen JL, Holst JJ. Effects of 6-week course of glucagon like peptide 1 on glycaemic control, insulin sensitivity, and β cell function in type 2 diabetes: a parallel-group study. *Lancet* 2002;359(9309):824-830.
77. Holz GG, Kuhlreiber WM, Habener JF. Pancreatic β cells are rendered glucose-competent by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1(737). *Nature* 1993;361: 362-365.
78. Bonner-Weir S. Is let growth and development in the adult. *J Mol Endocrinol* 2000; 24:297-302.
79. Finegood DT, Scaglia L, Bonner Weir S. Dynamics of β -cell mass in the growing rat pancreas. Estimation with a simple mathematical model. *Diabetes* 1995; 44:249-256.
80. Wang H, Iezzi M, Theander S, Antinozzi PA, Gauthier BR, Halban BA, et al. Suppression of Pdx1 perturbs proinsulin processing, insulin secretion and GLP1 signaling in INS-1 cells. *Diabetologia* 2005;48(4):720-731.

81. Amiranoff B, Vauclin-Jacques N, Laburthe M. Functional GIP receptors in a hamster pancreatic β cell line, in 111: specific binding and biological effects. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 123(2):671-676.
82. Gromada J, Bokvist K, Ding WG, Holst JJ, Nielsen JH, Rorsman P. Glucagon like peptide 1(7-36) amide stimulates exocytosis in human pancreatic β cells by both proximal and distal regulatory steps in stimulus-secretion coupling. *Diabetes* 1998;47 (1):57-65.
83. Ehses JA, Casilla VR, Doty T, Pospisilik JA, Winter KD, Demuth HU, et al. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide promotes β (INS-1) cell survival via cyclic adenosine monophosphate-mediated caspase-3 inhibition and regulation of p38 mitogenactivated protein kinase. *Endocrinology* 2003;144 (10):4433-4445.
84. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. Volume 37, Supplement 1, January 2014.
85. Rhee SY, Woo JT. The prediabetic period: Review of clinical Aspects. *Diabetes Metab J* 2011; 35:107-116
86. Benjamin S, Valdez R, Geiss L, Rolka D, Venkat KM, Estimated Number of Adults with Prediabetes in the U.S. in 2000. *Diabetes Care*. 2003; 26: 3.
87. Tabák A, Herder C, Rathmann W., Brunner E, Kivimäki M, Prediabetes: a high-risk state for diabetes development. *The Lancet*. 2012; 379: 2379-90.
88. Standards of medical care in Diabetes, 2015. *Diabetes Care* Volume 38, Supplement 1, January 2015.
89. Faerch K, Borch-Johnsen K, Holst JJ, Vaag A (2009) Pathophysiology and etiology of impaired fasting glycaemia and impaired glucose tolerance: does it matter for prevention and treatment of type 2 diabetes? *Diabetologia* 52: 1714-1723
90. Elder DA, Prigeon RL, Wadwa RP, Dolan LM, D'Alessio DA (2006) Beta-cell function, insulin sensitivity, and glucose tolerance in obese diabetic and nondiabetic adolescents and young adults. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 185-191

91. Faerch K, Vaag A, Holst JJ, Glumer C, Pedersen O, Borch-Johnsen K (2008) Impaired fasting glycaemia vs impaired glucose tolerance: similar impairment of pancreatic alpha and beta cell function but differential roles of incretin hormones and insulin action. *Diabetologia* 51: 853-861
92. Faerch K, Vaag A, Holst JJ, Hansen T, Jorgensen T, Borch-Johnsen K (2009) Natural history of insulin sensitivity and insulin secretion in the progression from normal glucose tolerance to impaired fasting glycemia and impaired glucose tolerance: The Inter99 study. *Diabetes Care* 32: 439-444
93. Ahren B (2009) Beta- and alpha-cell dysfunction in subjects developing impaired glucose tolerance: outcome of a 12-year prospective study in postmenopausal Caucasian women. *Diabetes* 58: 726-731
94. Toft-Nielsen MB, Damholt MB, Madsbad S, et al. (2001) Determinants of the impaired secretion of glucagon-like peptide-1 in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 3717-3723
95. Abdul-Ghani MA, Molina-Carrion M, Jani R, Jenkinson C, DeFronzo RA (2008) Adipocytes in subjects with impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance are resistant to the anti-lipolytic effect of insulin. *Acta Diabetol* 45: 147-150
96. Rasouli N, Kern PA (2008) Adipocytokines and the metabolic complications of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 93: S64-73
97. Marzban L, Trigo-Gonzalez G, Zhu X, et al. (2004) Role of beta-cell prohormone convertase (PC)1/3 in processing of pro-islet amyloid polypeptide. *Diabetes* 53: 141-148
98. Marzban L, Soukhatcheva G, Verchere CB (2005) Role of carboxypeptidase E in processing of pro-islet amyloid polypeptide in beta-cells. *Endocrinology* 146: 1808-1817
99. Abdul-Ghani MA, Tripathy D, DeFronzo RA. Contributions of beta-cell dysfunction and insulin resistance to the pathogenesis of impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose. *Diabetes Care* 2006;29: 1130-9.
100. INEGI Censo de Población 2012. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2012.

101. Rojas-Martínez Rosalba, Basto-Abreu Ana, Aguilar-Salinas Carlos A, Zárata-Rojas Emiliano, Villalpando Salvador, Barrientos-Gutiérrez Tonatiuh. Prevalencia de diabetes por diagnóstico médico previo en México. *Salud pública Méx*; 60 (3): 224-232.
102. DeFronzo R. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med Clin N Am* 88 (2004) 787–835.
103. Muhammad A, DeFronzo R. Pathophysiology of Prediabetes. *Current Diabetes Reports* 2009, 9:193–199.
104. Abdul-Ghani MA, Tripathy D, Jenkinson C, et al.: Adipocytes in subjects with impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance are resistant to the antilipolytic effect of insulin. *Acta Diabetol* 2008, 45:147–150.
105. Reaven GM, Hollenbeck C, Jeng CY, et al.: Measurement of plasma glucose, free fatty acid, lactate, and insulin for 24 h in patients with NIDDM. *Diabetes* 1988, 37:1020–1024.
106. Kahn SE: The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of type 2 diabetes. *Diabetologia* 2003, 46:3–19.
107. Abdul-Ghani MA, Jenkinson C, Richardson D, DeFronzo RD: Impaired early but not late phase insulin secretion in subjects with impaired fasting glucose. *Eur J Clin Invest* 2009 (in press).
108. Meyer C, Pimenta W, Woerle HJ, et al.: Different mechanisms for impaired fasting glucose and impaired postprandial glucose tolerance in humans. *Diabetes Care* 2006, 29:1909–1914.
109. Laakso M, Zilinskaite J, Hansen T, et al.: Insulin sensitivity, insulin release and glucagon-like peptide-1 level in persons with impaired fasting glucose and/or impaired glucose tolerance in the EUGENE2 study. *Diabetologia* 2008, 51:502–511.
110. Abdul-Ghani MA, Matsuda M, Jenkinson C, et al.: The relationship between fasting hyperglycemia and insulin secretion in subjects with normal or impaired glucose tolerance. *Am J Physiol* 2008, 295: E401–E406.

111. Gastaldelli A, Ferrannini E, Miyazaki Y, et al.: Beta-cell dysfunction and glucose intolerance: results from the San Antonio metabolism (SAM) study. *Diabetologia* 2004, 47:31–39.
112. Unwin N, Shaw J, Zimmet P, Alberti KG: Impaired glucose tolerance and impaired fasting glycemia: the current status on definition and intervention. *Diabet Med* 2002, 19:708–723.
113. Glucose tolerance and cardiovascular mortality: comparison of fasting and 2-hour diagnostic criteria [no authors listed]. *Arch Intern Med* 2001, 161:397–405.
114. Pan XR, Li GW, Hu YH, et al. (1997) Effects of diet and exercise in preventing NIDDM in people with impaired glucose tolerance. The Da Qing IGT and Diabetes Study. *Diabetes Care* 20: 537-544
115. Tuomilehto J, Lindstrom J, Eriksson JG, et al. (2001) Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med* 344: 1343-1350
116. Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, et al. (2002) Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* 346: 393-403
117. Chiasson JL, Josse RG, Gomis R, Hanefeld M, Karasik A, Laakso M (2002) Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM randomised trial. *Lancet* 359:2072-2077
118. Gerstein HC, Yusuf S, Bosch J, et al. (2006) Effect of rosiglitazone on the frequency of diabetes in patients with impaired glucose tolerance or impaired fasting glucose: a randomised controlled trial. *Lancet* 368: 1096-1105
119. DeFronzo RA, Banerji M, Bray GA, et al. (2009) Actos Now for the prevention of diabetes (ACT NOW) study. *BMC Endocr Disord* 9: 1751
120. Pascoe L, Frayling TM, Weedon MN, et al. (2008) Beta cell glucose sensitivity is decreased by 39% in non-diabetic individuals carrying multiple diabetes-risk alleles compared with those with no risk alleles. *Diabetologia* 51: 1989-1992

121. Diamanti-Kandarakis E, Christakou CD, Kandaraki E, Economou FN
Metformin: an old medication of new fashion: evolving new molecular mechanisms and clinical implications in polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol* 162: 193-212
122. Nathan DM, Buse JB, Davidson MB, et al. (2009) Medical management of hyperglycaemia in type 2 diabetes mellitus: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetologia* 52: 17-30
123. Ahren B, Larsson H, Holst JJ (1997) Reduced gastric inhibitory polypeptide but normal glucagon-like peptide 1 response to oral glucose in postmenopausal women with impaired glucose tolerance. *Eur J Endocrinol* 137: 127-131
124. Ayala JE, Bracy DP, James FD, Julien BM, Wasserman DH, Drucker DJ (2009) The glucagon-like peptide-1 receptor regulates endogenous glucose production and muscle glucose uptake independent of its incretin action. *Endocrinology* 150: 1155-1164
125. DeFronzo RA Current issues in the treatment of type 2 diabetes. Introduction. *Am J Med* 123: S1-2
126. DeFronzo RA, Triplitt C, Qu Y, Lewis MS, Maggs D, Glass LC Effects of exenatide plus rosiglitazone on beta-cell function and insulin sensitivity in subjects with type 2 diabetes on metformin. *Diabetes Care* 33: 951-957
127. Drucker DJ, Sherman SI, Gorelick FS, Bergenstal RM, Sherwin RS, Buse JB Incretin-based therapies for the treatment of type 2 diabetes: evaluation of the risks and benefits. *Diabetes Care* 33: 428-433
128. Rosenstock J, Klaff LJ, Schwartz S, et al. Effects of exenatide and lifestyle modification on body weight and glucose tolerance in obese subjects with and without prediabetes. *Diabetes Care* 33: 1173-1175
129. Kim SH, Liu A, Ariel D, et al. (2014) Pancreatic beta cell function following liraglutide-augmented weight loss in individuals with prediabetes: analysis of a randomised, placebo-controlled study. *Diabetologia* 57: 455-462

130. Rosenstock J, Rendell MS, Gross JL, Fleck PR, Wilson CA, Mekki Q. Alogliptin added to insulin therapy in patients with type 2 diabetes reduces HbA(1C) without causing weight gain or increased hypoglycaemia. *Diabetes Obes Metab.* 2009; 11: 1145–52.
131. Kaku K, Mori M, Kanoo T, Katou M, Seino Y. Efficacy and safety of alogliptin added to insulin in Japanese patients with type 2 diabetes: a randomized, double-blind, 12-week, placebo-controlled trial followed by an open-label, long-term extension phase. *Expert Opin Pharmacother.* 2014; 15: 2121–30.
132. Vilsbøll T, Rosenstock J, Yki-Järvinen H, Cefalu WT, Chen Y, Luo E, et al. Efficacy and safety of sitagliptin when added to insulin therapy in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab.* 2010;1 2: 167–77.
133. Mathieu C, Shankar RR, Lorber D, Umpierrez G, Wu F, Xu L, et al. A randomized clinical trial to evaluate the efficacy and safety of co-administration of sitagliptin with intensively titrated insulin glargine. *Diabetes Ther.* 2015; 6: 127–42.
134. Shankar RR, Bao Y, Han P, Hu J, Ma J, Peng Y, et al. Sitagliptin added to stable insulin therapy with or without metformin in Chinese patients with type 2 diabetes. *J Diabetes Investig.* 2017; 8: 321–9.
135. Aschner P, Katzeff HL, Guo H, Sunga S, Williams-Herman D, Kaufman K D, et al. Efficacy and safety of monotherapy of sitagliptin compared with metformin in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 2010; 12:252-61.
136. Goldstein BJ, Feinglos MN, Luncford JK, Johnson J, Williams-Herman DE. Effect of initial combination therapy with sitagliptin, dipeptidyl peptidase-4inhibitor, and metformin on glycemic control in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2007; 30:1979-87
137. Hanefeld M, Herman GA, Wu M, Mickel C, Sanchez M, Stein PP. Once-daily sitagliptin, dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, for the treatment of patients with type 2 diabetes. *Curr Med Res Opin* 2007; 23:1329-39.

138. Jadzinsky M, Pfutzner A, Paz-Pacheco E, Xu Z, Allen E, Chen R. Saxagliptin given in combination with metformin as initial therapy improves glycaemic control in patients with type 2 diabetes compared with either monotherapy: a randomized controlled trial. *Diabetes Obes Metab* 2009; 11:611-22.
139. Barnett AH, Charbonnel B, Donovan M, Fleming D, Chen R. Effect of saxagliptin as add-on therapy in patients with poorly controlled type 2 diabetes on insulin alone or insulin combined with metformin. *Curr Med Res Opin.* 2012; 28:513–23.
140. Barnett AH, Charbonnel B, Li J, Donovan M, Fleming D, Iqbal N. Saxagliptin add-on therapy to insulin with or without metformin for type 2 diabetes mellitus: 52-week safety and efficacy. *Clin Drug Investig.* 2013; 33:707–17.
141. Hirose T, Suzuki M, Tsumiyama I. Efficacy and safety of vildagliptin as an add-on to insulin with or without metformin in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus: a 12-week, double-blind, randomized study. *Diabetes Ther.* 2015; 6:559–71.
142. Ning G, Wang W, Li L, Ma J, Lv X, Yang M, et al. Vildagliptin as add-on therapy to insulin improves glycemic control without increasing risk of hypoglycemia in Asian, predominantly Chinese, patients with type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes.* 2016; 8:345–53.
143. Bosi E, Dotta F, Jia Y, Goodman M. Vildagliptin plus metformin combination therapy provides superior glycaemic control to individual monotherapy in treatment-naive patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes Metab* 2009; 11:506-15.
144. Schweizer A, Couturier A, Foley JE, Dejager S. Comparison between vildagliptin and metformin to sustain reductions in HbA(1c) over 1 year in drug-naive patients with type 2 diabetes. *Diabet Med* 2007; 24:955-61.

145. Schweizer A, Dejager S, Bosi E. Comparison of vildagliptin and metformin monotherapy in elderly patients with type 2 diabetes: a 24-week, double-blind, randomized trial. *Diabetes ObesMetab* 2009; 11:804-12.
146. Marre M, Shaw J, Brändle M, Bebakar WM, Kamaruddin NA, Strand J, Zdravkovic M, Le Thi TD, et al. Liraglutide, a oncedaily human GLP-1 analogue, added to a sulphonylurea over 26 weeks produces greater improvements in glycaemic and weight control compared with adding rosiglitazone or placebo in subjects with Type 2 diabetes (LEAD-1 SU). *Diabet Med* 2009;26(3):268-78. 22.
147. Nauck M, Frid A, Hermansen K, Shah NS, Tankova T, Mitha IH, Zdravkovic M, et al. Efficacy and safety comparison of liraglutide, glimepiride, and placebo, all in combination with metformin, in type 2 diabetes (LEAD-2). *Diabetes Care* 2009;32(1):84-90
148. Drucker DJ, Buse JB, Taylor K, Kendall DM, Trautmann M, Zhuang D, Porter L; DURATION-1 Study Group. Exenatide once weekly versus twice daily for the treatment of type 2 diabetes: a randomised, open-label, non-inferiority study. *Lancet*. 2008 Oct 4;372(9645):1240-50.
149. Buse JB, Nauck M, Forst T, Sheu W, Shenouda SK, Heilmann CR et al. Exenatide once weekly versus liraglutide once daily in patients with type 2 diabetes (DURATION-6): a randomised, open-label study. *Lancet* 2013; 381: 117–24.
150. Ahrén B Et al. Efficacy and safety of lixisenatide once-daily morning or evening injections in type 2 diabetes inadequately controlled on metformin (GetGoal-M). *Diabetes Care*. 2013;36 (9):2543-50.
151. Riddle MC et al. Adding once-daily lixisenatide for type 2 diabetes inadequately controlled by established basal insulin: A 24-week, randomized, placebo-controlled comparison (GetGoal-L). *Diabetes Care*. 2013;36(9):2489-96.
152. Umpierrez G et al. Efficacy and safety of dulaglutide monotherapy versus metformin in type 2 diabetes in a randomized controlled trial (AWARD-3). *Diabetes Care*. 2014; 37:2168-76

153. Dungan KM et al. Once-weekly dulaglutide versus once-daily liraglutide in metformin-treated patients with type 2 diabetes (AWARD-6): a randomised, open-label, phase 3, noninferiority trial. *Lancet*. 2014 Oct 11;384 (9951):1349-57
154. Comunidad Profesional del Sector Farmacéutico. La FDA aprueba Linagliptina para el tratamiento oral de la diabetes tipo 2.
155. Yki-Järvinen H, Rosenstock J, Durán-García S, Pinnett S, Bhattacharya S, Thiemann S, et al. Effects of adding linagliptin to basal insulin regimen for inadequately controlled type 2 diabetes: a 52week randomized, double-blind study. *Diabetes Care*. 2013; 36:3875–81.
156. Sheu WH, Park SW, Gong Y, Pinnett S, Bhattacharya S, Patel S, et al. Linagliptin improves glycemic control after 1 year as add-on therapy to basal insulin in Asian patients with type 2 diabetes mellitus. *Curr Med Res Opin*. 2015; 31:503–12.
157. Durán-García S, Lee J, Yki-Järvinen H, Rosenstock J, Hehnke U, Thiemann S, et al. Efficacy and safety of linagliptin as add-on therapy to basal insulin and metformin in people with type 2 diabetes. *Diabet Med*. 2016; 33:926–33.
158. Barnett, A. H., Patel, S., Harper, R., Toorawa, R., Thiemann, S., von Eynatten, M., et al. (2012). Linagliptin monotherapy in type 2 diabetes patients for whom metformin is inappropriate: an 18- week randomized, double-blind, placebo-controlled Phase III trial with a 34-week active-controlled extension. *Diabetes Obes. Metab*. 14, 1145–1154
159. Kawamori, R., Inagaki, N., Araki, E., Watada, H., Hayashi, N., Horie, Y., et al. (2012). Linagliptin monotherapy provides superior glycaemic control versus placebo or voglibose with comparable safety in Japanese patients with type 2 diabetes: a randomized, placebo and active comparator-controlled, double-blind study. *Diabetes Obes. Metab*. 14, 348–357.
160. Haak, T., Meinicke, T., Jones, R., Weber, S., von Eynatten, M., and Woerle, H. J. (2012). Initial combination of linagliptin and metformin improves

- glycaemic control in type 2 diabetes: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Diabetes Obes. Metab.* 14, 565–574.
161. Forst, T., Uhlig-Laske, B., Ring, A., Graefe-Mody, U., Friedrich, C., Herbach, K., et al. (2010). Linagliptin (BI 1356), a potent and selective DPP-4 inhibitor, is safe and efficacious in combination with metformin in patients with inadequately controlled Type 2 diabetes. *Diabet. Med.* 27, 1409–1419.
162. Del Prato S., Barnett AH, Huisman H., Neubacher D., Woerle HJ, Dugi KA (2011) Efecto de la monoterapia con linagliptina en el control glucémico y marcadores de la función de las células beta en pacientes con diabetes tipo 2 inadecuadamente controlada: un control aleatorio controlado el juicio. *Diabetes Obes Metab* 13: 258–267
163. Taskinen MR, Rosenstock J., Tamminen I., Kubiak R., Patel S., Dugi KA, y col. (2011) Seguridad y eficacia de la linagliptina como terapia complementaria a la metformina en pacientes con diabetes tipo 2: un estudio aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo. *Diabetes Obes Metab* 13: 65–74.
164. Owens DR, Swallow R., Dugi KA, Woerle HJ (2011) Eficacia y seguridad de la linagliptina en personas con diabetes tipo 2 inadecuadamente controladas por una combinación de metformina y sulfonilurea: un estudio aleatorizado de 24 semanas. *Diabet Med* 28: 1352–1361.
165. Gomis R., Espadero RM, Jones R., Woerle HJ, Dugi KA (2011) Eficacia y seguridad de la terapia de combinación inicial con linagliptina y pioglitazona en pacientes con diabetes tipo 2 inadecuadamente controlada: un estudio aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo. *Diabetes Obes Metab* 13: 653–661
166. Forst, T., Uhlig-Laske, B., Ring, A., Ritzhaupt, A., Graefe-Mody, U., and Dugi, K. A. (2011). The oral DPP4 inhibitor linagliptin significantly lowers HbA1c after 4 weeks of treatment in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes. Metab.* 13, 542–550.

167. Ministerio de Salud/Instituto Nacional de Estadística. Encuesta Nacional de Salud 2003.
168. González S. Relationship between phenolic compounds from diet 1 and microbiota: 2 impact on human health. *Food Funct.*, 2015,6, 2424-2439.
169. Erejuwa O, Sulaiman SA and Mohd S. Ab Wahab MS. Modulation of Gut Microbiota in the Management of Metabolic Disorders: The Prospects and Challenges *Int. J. Mol. Sci.* 2014, 15, 4158-4188.
170. The human gut microbiome, a taxonomic conundrum. Sankara SA, Lagiera JC, Pontarotti P. Raoult D, Fourniera PE. *Systematic and Applied Microbiology* 2015, 38 276–286.
171. Simrén M, Barbara G, Flint HJ, Spiegel BMR, Spiller RC, Vanner S, Verdu EF, Whorwell PJ, Zoetendal EG. Intestinal microbiota in functional bowel disorders: A Rome foundation Report. *Gut* 2013; 62:159–176.
172. Robles-Alonso V y Francisco Guarner F. Progreso en el conocimiento de la microbiota intestinal humana. *Nutr Hosp.* 2013; 28(3):553-557.
173. Allin KH, Nielsen T and Pedersen O. Gut microbiota in patients with type 2 diabetes mellitus. *European Society of Endocrinology* 2015, 172: 4 R167–R177.
174. Intestinal microbiota, immune system and obesity. Ruiz-Álvarez V, Peña YP, Rodríguez M. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas.*2010; 29(3)364-397
175. Valdés L., Cuervo A., Salazar N, Ruas-Madiedo P, Gueimondea M and González S. Relationship between phenolic compounds from diet 1 and microbiota: 2 impact on human health. *Food Funct.*, 2015,6, 2424-2439.
176. Del Chierico F, Vernocchi P, Dallapiccola B and Putignani L. Mediterranean Diet and Health: Food Effects on Gut Microbiota and Disease Control. *Int. J. Mol. Sci.* 2014, 15, 11678-11699.
177. Graham C, Mullen Anne, and Kevin Whelan Obesity and the gastrointestinal microbiota: a review of associations and mechanisms. *Nutrition Reviews*, 2015; 73(6):376–385.

178. Clarke SF, Murphy EF, Nilaweera K, Ross PR, Shanahan F, O'Toole PW, and Cotter PD. The gut microbiota and its relationship to diet and obesity. *Gut Microbes* 2012; 3:3, 186-202.
179. DiBaise JK, Zhang H, Crowell MD, Krajmalnik-Brown R, Decker GA, Rittmann BE, et al. Gut microbiota and its possible relationship with obesity. *Mayo Clin Proc* 2008; 83:460-9.
180. Mai V, McCrary QM, Sinha R, Gleib M. Associations between dietary habits and body mass index with gut microbiota composition and fecal water genotoxicity: an observational study in African American and Caucasian American volunteers. *Nutr J* 2009; 8:49.
181. Whang A, Nagpal R, Yadav H. Bi-directional drug-microbiome interactions of anti-diabetics. *EBioMedicine* 39 (2019) 591–602
182. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER and Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 2006; 444: 21-28.
183. Ley RE¹, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 2006; 21;444 (7122):1022-3.
184. Duncan SH, Lobeley GE, Holtrop G, Ince J, Johnstone AM, Louis P and Flint HJ. Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *International Journal of Obesity*, 2008; 32, 1720–1724.
185. Jumpertz R, Le DS, Turnbaugh PJ, Trinidad C, Bogardus C, Gordon JI, and Krakoff J. Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans. *Am J Clin Nutr*, 2011;94:58–65.
186. Ley RE. Obesity and the human microbiome. *Curr Opin Gastroenterol* 2010; 26:5-11.
187. Amar J, Burcelin R, Ruidavets J, Cani P, Fauvel J, Alessi M, et al. Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men. *Am J Clin Nutr* 2008; 87: 1219-23.
188. León-Pedroza, J. I., González-Tapia, L. A., del Olmo-Gil, E., Castellanos-Rodríguez, D., Escobedo, G., and González-Chávez, A. (2015).

- Inflamación sistémica de grado bajo y su relación con el desarrollo de enfermedades metabólicas: de la evidencia molecular a la aplicación clínica. *Cirugía y Cirujanos* 83, 543–551. doi:10.1016/j.circir.2015.05.041.
189. Youssef-Elabd, E. M., McGee, K. C., Tripathi, G., Aldaghri, N., Abdalla, M. S., Sharada, H. M., et al. (2012). Acute and chronic saturated fatty acid treatment as a key instigator of the TLR-mediated inflammatory response in human adipose tissue, in vitro. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 23, 39–50. doi:10.1016/j.jnutbio.2010.11.003.
190. Jialal, I., Huet, B. A., Kaur, H., Chien, A., and Devaraj, S. (2012). Increased Toll-Like Receptor Activity in Patients With Metabolic Syndrome. *Diabetes Care* 35, 900–904. doi:10.2337/dc11-2375.
191. Imai, Y., Dobrian, A. D., Weaver, J. R., Butcher, M. J., Cole, B. K., Galkina, E. V., et al. (2013). Interaction between cytokines and inflammatory cells in islet dysfunction, insulin resistance and vascular disease. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 15, 117–129. doi:10.1111/dom.12161.
192. Hotamisligil, G., Shargill, N., and Spiegelman, B. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259, 87–91. doi:10.1126/science.7678183.
193. Rubinfeld, H., and Seger, R. The ERK Cascade As a Prototype of MAPK Signaling Pathways. *MAP Kinase Signaling Protocols*, 1–28. doi:10.1385/1-59259-671-1:1.
194. Nasimian, A., Taheripak, G., Gorgani-Firuzjaee, S., Sadeghi, A., and Meshkani, R. (2013). Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) modulates palmitate-induced cytokine production in macrophage cells. *Inflamm. Res.* 62, 239–246.
195. Wu, X., Ma, C., Han, L., Nawaz, M., Gao, F., Zhang, X., et al. (2010). Molecular characterisation of the faecal microbiota in patients with type II diabetes. *Curr. Microbiol.* 61, 69–78.
196. Allin, K. H., the IMI-DIRECT consortium, Tremaroli, V., Caesar, R., Jensen, B. A. H., Damgaard, M. T. F., et al. (2018). Aberrant intestinal

- microbiota in individuals with prediabetes. *Diabetologia* 61, 810–820. doi:10.1007/s00125-018-4550-1.
197. Chakaroun, R. M., Massier, L., and Kovacs, P. (2020). Gut Microbiome, Intestinal Permeability, and Tissue Bacteria in Metabolic Disease: Perpetrators or Bystanders? *Nutrients* 12. doi:10.3390/nu12041082.
 198. Devaraj S, Hemarajata P and Versalovic J. The Human Gut Microbiome and Body Metabolism: Implications for Obesity and Diabetes. *Clin Chem*. 2013 April; 59(4): 617–628.
 199. Everard A. Diabetes, obesity and gut microbiota. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 27 (2013) 73–83.
 200. Han J-L, Hui-Ling Lin. Intestinal microbiota and type 2 diabetes: from mechanism insights to therapeutic perspective. *World J Gastroenterol* 2014 December 21; 20(47): 17737-17745.
 201. Wu X, Ma C, Han L, Nawaz M, Gao F, Zhang Xu, Yu P, Zhao C, Li LA. Molecular Characterisation of the Faecal Microbiota in Patients with Type II Diabetes, *Curr Microbiol*, 2010; 61:69–78.
 202. Larsen N, Vogensen FK, Van den Berg FWJ, Nielsen DS, Andreasen AS, Pedersen BK, Al-Soud WA, Sørensen SJ, Hansen LH, Jakobsen M. Gut Microbiota in Human Adults with Type 2 Diabetes Differs from Non-Diabetic Adults. *PLoS ONE*, 2010; 5(2): 1-10.
 203. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 2010 (464): 59-65.
 204. Allin K, Tremaroli V, Caesar R. Aberrant intestinal microbiota in individual's whit prediabetes. *Diabetologia* (2018) 61:810-820.
 205. Palau-Rodriguez M, Tulipani S, Isabel Queipo-Ortuno~ M, UрпиSarda M, Tinahones FJ, Andres-Lacueva C. Metabolomic insights into the intricate gut microbial-host interaction in the development of obesity and type 2 diabetes. *Front Microbiol*. 2015; 6:1151.

206. Velasquez-Manoff M. Gut microbiome: The peacekeepers. *Nature*. 2015;518: S3-11.
207. Zhang X, Shen D, Fang Z, Jie Z, Qiu X, Zhang C, Chen Y, Ji L Human Gut Microbiota Changes Reveal the Progression of Glucose Intolerance Xiuying. *PLoS ONE*, 2013; 8(8).
208. Burcelin RM, Serino M, Chabo C, Blasco-Baque V, Amar J. Gut microbiota and diabetes: from pathogenesis to therapeutic Perspective. *Acta Diabetol* 2011; 48:257–273.
209. Amar J, Chabo C, Waget A, Klopp P, Vachoux C, Bermúdez-Humara LG, Smirnova N, Berge M, et al. Intestinal mucosal adherence and translocation of commensal bacteria at the early onset of type 2 diabetes: molecular mechanisms and probiotic treatment. *EMBO Mol Med* 2011; 3, 559–572
210. Igarashi, M., Morimoto, M., Suto, A., Nakatani, A., Hayakawa, T., Hara, K., et al. (2020). Synthetic dietary inulin, Fuji FF, delays development of diet-induced obesity by improving gut microbiota profiles and increasing short-chain fatty acid production. *PeerJ* 8, e8893.
211. Nomura, M., Nagatomo, R., Doi, K., Shimizu, J., Baba, K., Saito, T., et al. (2020). Association of Short-Chain Fatty Acids in the Gut Microbiome With Clinical Response to Treatment With Nivolumab or Pembrolizumab in Patients With Solid Cancer Tumors. *JAMA Netw Open* 3, e202895.
212. Martin-Gallausiaux, C., Marinelli, L., Blottière, H. M., Larraufie, P., and Lapaque, N. (2020). SCFA: mechanisms and functional importance in the gut. *Proc. Nutr. Soc.*, 1–13.
213. Bergman, E. N. (1990). Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiol. Rev.* 70, 567–590.
214. Rios-Covian, D., Salazar, N., Gueimonde, M., and de los Reyes-Gavilan, C. G. (2017). Shaping the Metabolism of Intestinal Bacteroides Population through Diet to Improve Human Health. *Frontiers in Microbiology* 8. doi:10.3389/fmicb.2017.00376.

215. Ley R, Turnbaugh P, Klein S, Gordon J. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 2006; 1022-1023.
216. Devaraj S, Hemarajata P, Versalovic J. La microbiota intestinal humana y el metabolismo corporal: Implicaciones con la obesidad y la diabetes. *Acta Bioquím Clín Latin* 2013; 421-434.
217. Tunngland, B. (2018). Short-Chain Fatty Acid Production and Functional Aspects on Host Metabolism. *Human Microbiota in Health and Disease*, 37–106. doi:10.1016/b978-0-12-814649-1.00002-8.
218. Hino, S., Mizushima, T., Kaneko, K., Kawai, E., Kondo, T., Genda, T., et al. (2020). Mucin-Derived O-Glycans Act as Endogenous Fiber and Sustain Mucosal Immune Homeostasis via Short-Chain Fatty Acid Production in Rat Cecum. *J. Nutr.* doi:10.1093/jn/nxaa097.
219. Muñoz – Garach A, Diaz – Perdigones C, Tinahones F. Microbiota y diabetes mellitus tipo 2. *Endocrinología y Nutrición* 2016; 560 – 566.
220. Inan MS, Rasoulpour RJ, Yin L, Hubbard A, Rosenberg DW, Giardina C: The luminal short-chain fatty acid butyrate modulates NF-κB activity in human colonic epithelial cell line. *Gastroenterology* 2000; 118: 724-734
221. Den Besten G, Bleeker A, Gerding A, et al. Short-chain fatty acids protect against high-fat diet-induced obesity via a PPARγ-dependent switch from lipogenesis to fat oxidation. *Diabetes* 2015; 64(7): 2398-408.
222. De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Goncalves D, Vinera J, et al. Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits. *Cell* 2014;156(1-2):84-96.
223. Han, J.-L., and Lin, H.-L. (2014). Intestinal microbiota and type 2 diabetes: from mechanism insights to therapeutic perspective. *World J. Gastroenterol.* 20, 17737–17745.
224. Ghanim, H., Abuaysheh, S., Sia, C. L., Korzeniewski, K., Chaudhuri, A., Fernandez-Real, J. M., et al. (2009). Increase in Plasma Endotoxin Concentrations and the Expression of Toll-Like Receptors and Suppressor of Cytokine Signaling-3 in Mononuclear Cells After a High-Fat, High-

- Carbohydrate Meal: Implications for insulin resistance. *Diabetes Care* 32, 2281–2287. doi:10.2337/dc09-0979.
225. Creely SJ, McTernan PG, Kusminski CM, Fisher FM, Da Silva NF, Khanolkar M, et al. Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007; 292: E740-7.
226. Cani PD, Delzenne NM. The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. *Current Pharmaceutical Design.* 2009; 15:1546-58.
227. Pussinen PJ, Havulinna AS, Lehto M, Sundvall J, Salomaa V. Endotoxemia is associated with an increased risk of incident diabetes. *Diabetes Care.* 2011; 34:392-7
228. Palau-Rodriguez M, Tulipani S, Isabel Queipo-Ortuno M, UrpiSarda M, Tinahones FJ, Andres-Lacueva C. Metabolomic insights into the intricate gut microbial-host interaction in the development of obesity and type 2 diabetes. *Front Microbiol.* 2015; 6:1151.
229. Velasquez-Manoff M. Gut microbiome: The peacekeepers. *Nature.* 2015;518: S3-11.
230. Boroni Moreira, A. P., and de Cássia Gonçalves Alfenas, R. (2012). The influence of endotoxemia on the molecular mechanisms of insulin resistance. *Nutr. Hosp.* 27, 382–390.
231. Randall, T., Rangel-Moreno, J., and de la Luz Garcia-Hernandez, M. (2012). Faculty Opinions recommendation of Microbiota-induced IL-1 β , but not IL-6, is critical for the development of steady-state TH17 cells in the intestine. *Faculty Opinions – Post-Publication Peer Review of the Biomedical Literature.* doi:10.3410/f.14267223.789952860.
232. Nymark, M., Pussinen, P. J., Tuomainen, A. M., Forsblom, C., Groop, P.-H., Lehto, M., et al. (2009). Serum lipopolysaccharide activity is associated with the progression of kidney disease in Finnish patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 32, 1689–1693.

233. Creely, S. J., McTernan, P. G., Kusminski, C. M., Fisher, ff M., Da Silva, N. F., Khanolkar, M., et al. (2007). Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 292, E740–7.
234. Zhao, X., Fritsche, J., Wang, J., Chen, J., Rittig, K., Schmitt-Kopplin, P., et al. (2010). Metabonomic fingerprints of fasting plasma and spot urine reveal human pre-diabetic metabolic traits. *Metabolomics* 6, 362–374.
235. Farías M, Silva C, Rozowski J. Microbiota intestinal: rol en obesidad. *Rev Chil Nutr* 2011; 38: 228 -233.
236. Forslund K, Hildebrand F, Nielsen T. Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota. *Nature* 2015; 528: 262 – 266.
237. Wu H, Esteve E, Tremaroli V, Khan MT, Caesar R, Mannerås-Holm L, Ståhlman M, Olsson LM, Serino M, Planas-Fèlix M, Xifra G, Mercader JM, Torrents D, Burcelin R, Ricart W, Perkins R, Fernández-Real JM, Bäckhed F. Metformin alters the gut microbiome of individuals with treatment-naive type 2 diabetes, contributing to the therapeutic effects of the drug. *Nat Med* 2017; 23: 850-858
238. Gall WE, Beebe K, Lawton KA. α -Hydroxybutyrate is an early biomarker of insulin resistance and glucose intolerance in a nondiabetic population. *PLoS One* 2010; 5: e10883
239. Sekar S, Chandrasekaran A, Rao U, Sastry TP. Comparison of some of the physicochemical characteristics of type 2 diabetic and normal human bones: a sample study. *J Diabetes Complicat* 2011; 25: 187–192
240. Shin NR, Lee JC, Lee HY, Kim MS, Whon TW, Lee MS, Bae JW. An increase in the *Akkermansia* spp. population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in diet-induced obese mice. *Gut* 2014; 63: 727-735
241. Karlsson FH, Tremaroli V, Nookaew. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature* 2013; 498: 99–103

242. Na – Ri Shin, June – Chul Lee, Hae – Youn Lee, Min – Soo Kim, Tae Woong Whon, Myung – Shik Lee, Jin – Woo Bae. An increase in the Akkermansia spp. Population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in diet – induced obese mice. *Gut* 2014; 63: 727 – 735.
243. De la Cuesta – Zuluaga J, Muller N, Corrales – Agudelo V, Velásquez – Mejía E, Carmona J, Abad J, Escobar J. Metformin is associated with higher relative abundance of mucin – degrading akkermansia muciniphila and several short – chain Fatty acid – producing microbiota in the gut. *Diabetes Care* 2017; 40: 54 – 62.
244. Everard A, Belzer C, Geurts L, Ouwerkerk JP, Druart C, Bindels LB, Guiot Y, Derrien M, Muccioli GG, Delzenne NM, de Vos WM, Cani PD. Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: 9066-71
245. Lee H, Ko G. Effect of metformin on metabolic improvement and gut microbiota. *Appl Environ Microbiol* 2014; 80: 5935-43
246. Yevheniia Kyriachenko, Tetyana Falalyeyeva, Oleksandr Korotkyi, Nataliia Molochech, Nazarii Kobyljak. Crosstalk between gut microbiota and antidiabetic drug action. *World J Diabetes* 2019 March 15; 10(3): 154-168
247. Buse JB, DeFronzo RA, Rosenstock J. The primary glucose-lowering effect of metformin resides in the gut, not the circulation: results from short-term pharmacokinetic and 12-week dose-ranging studies. *Diabetes Care* 2016; 39: 198–205.
248. Lee H, Ko G. Effect of metformin on metabolic improvement and gut microbiota. *Appl Environ Microbiol* 2014;80(19):5935-43.
249. Plovier H, Everard A, Druart C, Depommier C, Van Hul M, Geurts L, et al. A purified membrane protein from Akkermansia muciniphila or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. *Nat Med* 2016; 23:107.
250. Wu H, Esteve E, Tremaroli V, Khan MT, Caesar R, Manneras-Holm L, et al. Metformin alters the gut microbiome of individuals with treatment-naïve

- type 2 diabetes, contributing to the therapeutic effects of the drug. *Nat Med* 2017; 23(7): 850-8.
251. Zhang X, Zhao Y, Xu J, Xue Z, Zhang M, Pang X, et al. Modulation of gut microbiota by berberine and metformin during the treatment of high-fat diet-induced obesity in rats. *Sci Rep* 2015; 5:14405.
252. DeFronzo RA, Buse JB, Kim T. Once-daily delayed-release metformin lowers plasma glucose and enhances fasting and postprandial GLP-1 and PYY: results from two randomised trials. *Diabetologia* 2016; 59: 1645–1654.
253. Chen J, Wang R, Li X, Wang R. *Bifidobacterium adolescentis* supplementation ameliorates visceral fat accumulation and insulin sensitivity in an experimental model of the metabolic syndrome. *Br J Nutr* 2012; 107(10): 1429-34.
254. Rosario D, Benfeitas R, Bidkhorji G, Zhang C, Uhlen M, Shoaie S, et al. Understanding the representative gut microbiota dysbiosis in metformin-treated type 2 diabetes patients using genome-scale metabolic modeling. *Front Physiol* 2018;9 (775).
255. Tong X, Xu J, Lian F, Yu X, Zhao Y, Xu L, et al. Structural alteration of gut microbiota during the amelioration of human type 2 diabetes with hyperlipidemia by metformin and a traditional Chinese herbal formula: A multicenter, randomized, open label clinical trial. *MBio* 2018; 9(3).
256. Cabreiro F, Au C, Leung K, Vergara-Irigaray N, Cocheme H, Noori, et al. Metformin retards aging in *C. elegans* by altering microbial folate and methionine metabolism. *Cell* 2013; 153(1): 228-239.
257. Zhong J, Gong Q, Goud A, Srinivasamaharaj S, Rajagopalan S. Recent Advances in DipeptidylPeptidase-4 Inhibition Therapy: Lessons from the Bench and Clinical Trials. *J Diabetes Res* 2015; 2015: 606031
258. Xinfeng Yan, Bo Feng, Peicheng Li, Zhaosheng Tang, Lin Wang. Microflora Disturbance during Progression of Glucose Intolerance and Effect of Sitagliptin: An Animal Study. *Journal of Diabetes Research* 2016: 1 – 10.

259. Qian Zhang, Xinhua Xiao, Ming Li, Miao Yu, Fan Ping, Jia Zheng, Tong Wang, Xiaojing Wang. Vildagliptin increases butyrate – producing bacteria in the gut of diabetic rats. *Plos One* 2017; 1 – 10.
260. Lin Wang, Peicheng Li, Zhaosheng Tang, Xinfeng Yan, Bo Feng. Structural modulation of the gut microbiota and the relationship with body weight: compared evaluation of liraglutide and saxagliptin treatment. *Nature* 2016; 6: 33251.
261. Heetae Lee, GwangPyo Ko. Effect of Metformin on Metabolic Improvement and Gut Microbiota. *Journals AEM* 2014; 80: 19.
262. Qian Zhang, Xinhua Xiao, Ming Li, Miao Yu, Fan Ping, Jia Zheng, Tong Wang, Xiaojing Wang. Vildagliptin increases butyrate-producing bacteria in the gut of diabetic rats. *PLoS ONE* 12(10): e0184735.
263. Zhang Q, Xiao X, Li M, Yu M, Ping F, Zheng J, Wang T, Wang X. Vildagliptin increases butyrate-producing bacteria in the gut of diabetic rats. *PLoS One*. 2017 Oct 16;12(10): e0184735. doi: 10.1371/journal.pone.0184735. PMID: 29036231; PMCID: PMC5643055.
264. Zhang Q, Xiao X, Zheng J, Li M, Yu M, Ping F, Wang T, Wang X. Featured article: Structure moderation of gut microbiota in liraglutide-treated diabetic male rats. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2018 Jan;243(1):34-44. doi: 10.1177/1535370217743765. Epub 2017 Nov 24. PMID: 29171288; PMCID: PMC5788162.
265. Qian Zhang, Xinhua Xiao, Jia Zheng, Ming Li, Miao Yu, Fan Ping, Tong Wang and Xiaojing Wang. Structure moderation of gut microbiota in liraglutide-treated diabetic male rat. *Experimental Biology and Medicine* 2018; 243: 34–44
266. Dorines Rosario, Rui Benfeitas, Gholamreza Bidkhorji, Cheng Zhang, Mathias Uhlen, Saeed Shoaie and Adil Mardinoglu. Understanding the Representative Gut Microbiota Dysbiosis in Metformin-Treated Type 2 Diabetes Patients Using Genome-Scale Metabolic Modeling. *Front. Physiol.* 9:775

267. Wei Ma, Ji Chen, Yuhong Meng, Jichun Yang, Qinghua Cui and Yuan Zhou. Metformin Alters Gut Microbiota of Healthy Mice: Implication for Its Potential Role in Gut Microbiota Homeostasis. *Microbiota Homeostasis*. *Front. Microbiol.* 9:1336.
268. Olefsky J. Insulin resistance. En: Ellenberger & Rifkin's (Eds.). *Diabetes mellitus*, 5th ed. Appleton & Lange 1997:513-552.
269. Seija V, Vignologi R. Temas de bacteriología y virología médica: Principales grupos de antibióticos. Méndez Editores. Ed, 2006. 34:631-47.
270. Gibson R. Principles of nutritional assessment. Nueva York: Oxford University Press; 1990. p. 165-167.
271. Lee RD, Nieman DC. Nutritional assessment. 2nd ed. EUA: Mc Graw-Hill; 1996. p. 224-263.
272. Denova-Gutiérrez Edgar, Flores Yvonne N, Gallegos-Carrillo Katia, Ramírez-Palacios Paula, Rivera-Paredes Berenice, Muñoz-Aguirre Paloma et al. Health workers cohort study: methods and study design. *Salud pública Méx* [revista en la Internet]. 2016 Dic [citado 2020 Nov 27]; 58(6): 708-716.
273. Lohman TG, Roche AF, Martorell R. Anthropometric standardization reference manual. Champaign, Illinois: Human Kinetics Books; 1988. p. 44-45
274. Kaplan LA, Pesce AJ, et al., "Clinical Chemistry Theory, Analysis and Correlation". CV Mosby Company 1984.
275. Steven E Kahn, Ronald L Prigeon, David K McCulloch, Edward J Boyko, Richard N Bergman, Micheal W Schwartz, James L Neifing, W Kenneth Ward, James C Beard and Jerry P Palmer. Quantification of the Relationship Between Insulin Sensitivity and β -Cell Function in Human Subjects: Evidence for a Hyperbolic Function. *Diabetes* 1993 Nov; 42(11): 1663-1672.
276. C. LORENZO, et al. Disposition Index, Glucose Effectiveness and Conversion to Type 2 Diabetes, *Diabetes Care* 33:2098–2103, 2010.
277. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*. 2010 May; 7(5):335-6.

278. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: inferencia de muestra de alta resolución a partir de datos de amplicón de Illumina. *Métodos nacionales* (2016) 13: 581–3. doi: 10.1038/nmeth.3869
279. Caporaso, J. Gregory, J. Gregory Caporaso, Justin Kuczynski, Jesse Stombaugh, Kyle Bittinger, Frederic D. Bushman, Elizabeth K. Costello, et al. 2010. “QIIME Allows Analysis of High-Throughput Community Sequencing Data.” *Nature Methods*. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>.
280. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. El proyecto de base de datos de genes de ARN ribosomal SILVA: procesamiento de datos mejorado y herramientas basadas en la web. *Ácidos nucleicos Res* (2013) 41: D590–6. doi: 10.1093/nar/gks1219
281. McMurdie PJ, Holmes S. Shiny-phyloseq: aplicación web para el análisis interactivo de microbiomas con seguimiento de procedencia. *Bioinformática* (2015) 31:282–3. doi: 10.1093/bioinformática/btu616
282. Lyu, X. *et al.* Effects of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors on beta-cell function and insulin resistance in type 2 diabetes: meta-analysis of randomized controlled trials. *Sci. Rep.* 7, 44865 (2017).
283. Komorizono, Y. *et al.* Metformin dose increase versus added linagliptin in non-alcoholic fatty liver disease and type 2 diabetes: An analysis of the J-LINK study. *Diabetes, Obesity and Metabolism* vol. 23 832–837 (2021).
284. Lee, C. B., Chae, S. U., Jo, S. J., Jerng, U. M. & Bae, S. K. The Relationship between the Gut Microbiome and Metformin as a Key for Treating Type 2 Diabetes Mellitus. *Int. J. Mol. Sci.* 22, (2021).
285. Induri, S. N. R. *et al.* The Gut Microbiome, Metformin, and Aging. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 62, 85–108 (2022).

286. Salamone, D., Rivellese, A. A. & Vetrani, C. The relationship between gut microbiota, short-chain fatty acids and type 2 diabetes mellitus: the possible role of dietary fibre. *Acta Diabetol.* **58**, 1131–1138 (2021).
287. Bastos, R. M. C. & Rangel, É. B. Gut microbiota-derived metabolites are novel targets for improving insulin resistance. *World J. Diabetes* **13**, 65–69 (2022).
288. Cunningham, A. L., Stephens, J. W. & Harris, D. A. Gut microbiota influence in type 2 diabetes mellitus (T2DM). *Gut Pathog.* **13**, 50 (2021).
289. Mrozinska, S. *et al.* The effect of linagliptin treatment on gut microbiota in patients with HNF1A-MODY or type 2 diabetes — a preliminary cohort study. *Clinical Diabetology* vol. 8 263–270 (2020).
290. Reimer, R. A. *et al.* Combining sitagliptin/metformin with a functional fiber delays diabetes progression in Zucker rats. *J. Endocrinol.* **220**, 361–373 (2014).
291. Yan, X., Feng, B., Li, P., Tang, Z. & Wang, L. Microflora Disturbance during Progression of Glucose Intolerance and Effect of Sitagliptin: An Animal Study. *J Diabetes Res* **2016**, 2093171 (2016).
292. Zhang, Q. *et al.* Vildagliptin increases butyrate-producing bacteria in the gut of diabetic rats. *PLoS One* **12**, e0184735 (2017).
293. Wang, L., Li, P., Tang, Z., Yan, X. & Feng, B. Structural modulation of the gut microbiota and the relationship with body weight: compared evaluation of liraglutide and saxagliptin treatment. *Sci. Rep.* **6**, 33251 (2016).
294. Liao, X. *et al.* Alteration of gut microbiota induced by DPP-4i treatment improves glucose homeostasis. *EBioMedicine* **44**, 665–674 (2019).
295. Ghosh, T. S., Shanahan, F. & O'Toole, P. W. The gut microbiome as a modulator of healthy ageing. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* (2022) doi:10.1038/s41575-022-00605-x.
296. Liu, W., Luo, Z., Zhou, J. & Sun, B. Gut Microbiota and Antidiabetic Drugs: Perspectives of Personalized Treatment in Type 2 Diabetes Mellitus. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **12**, 853771 (2022).

297. Lee, H. & Ko, G. Effect of metformin on metabolic improvement and gut microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 5935–5943 (2014).
298. Haak, T. Combination of Linagliptin and Metformin for the Treatment of Patients with Type 2 Diabetes. *Clinical Medicine Insights: Endocrinology and Diabetes* vol. 8 CMED.S10360 (2015).
299. Seifarth, C., Schehler, B. & Schneider, H. J. Effectiveness of metformin on weight loss in non-diabetic individuals with obesity. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **121**, 27–31 (2013).
300. Clamp, L. D., Hume, D. J., Lambert, E. V. & Kroff, J. Enhanced insulin sensitivity in successful, long-term weight loss maintainers compared with matched controls with no weight loss history. *Nutr. Diabetes* **7**, e282 (2017).
301. Martin, A. M., Sun, E. W., Rogers, G. B. & Keating, D. J. The Influence of the Gut Microbiome on Host Metabolism Through the Regulation of Gut Hormone Release. *Front. Physiol.* **10**, 428 (2019).

XIX. ANEXOS

ANEXO 1.

Inhibidores de la DPP-4					
Autor y año	Diseño de estudio	Pacientes y tratamiento	Desenlace primario	Metodología	Resultados
Rosenstock et al (2009) ¹⁴⁴	Ensayo Clínico Aleatorizado, doble ciego, control con placebo.	Alogliptina 12.5mg/día (n=131) Alogliptina 25mg/día (n=129) Placebo (n=130)	Cambio en HbA1c en 26 semanas de tratamiento.	EC aleatorizado, doble ciego, control con placebo. Sujetos japoneses con DM2, inadecuado control glucémico, en tratamiento con insulina basal o con metformina. Sujetos aleatorizados en 3 tratamientos con dosis establecida una vez al día.	Valor de referencia de HbA1c promedio al inicio del estudio 9.3%. Los cambios medios en los valores de HbA1c con respecto al valor de referencia fueron mayores en las diferentes dosis de alogliptina en comparación con placebo: alogliptina 12.5mg/día -0.63±-0.08%, alogliptina 25mg/día -0.71±-0.08%, placebo -0.13±-0.08%; p<0.0001.
Kaku et al (2014) ¹⁴⁵	Ensayo Clínico Aleatorizado, doble ciego, control con placebo.	Alogliptina 25mg/día (n=179)	Cambio en HbA1c en 12 semanas de tratamiento.	EC aleatorizado, doble ciego, control con placebo. Sujetos japoneses con DM2, inadecuado control glucémico con insulina, dieta o ejercicio. Aleatorizado a 2 grupos y seguimiento máximo a 40 semanas. Tratamiento de insulina de base.	Cambio en los valores de HbA1c durante las 12 semanas de tratamiento de -0.96% para alogliptina y -0.29% para insulina y placebo. Diferencia estimada para los grupos -0.66% (IC del 95%: -0.824 a -0.503; p<0.0001).

Vilsboll et al (2010) ¹⁴⁶	Ensayo Clínico Aleatorizado, control con placebo.	Sitagliptina 100mg/día (n=322) Placebo (n=319)	Cambio en HbA1c en 24 semanas de tratamiento.	EC aleatorizado, doble ciego, control con placebo. Sujetos con DM2, con inadecuado control glucémico, se agregó sitagliptina a la terapia con insulina sola (acción prolongada, intermedia o premezclada) o en combinación con metformina, con valores de glucosa de 7.5 a 11%. Aleatorizados 1:1, sumando 100mg de sitagliptina al día o placebo.	Reducción de los valores de HbA1c en sujetos con sitagliptina en el tratamiento (-0.6%, p<0.0001) vs placebo (-0.0%). Sitagliptina disminuyó la glucosa plasmática en ayuno -15mg/dl y postprandial -36.1mg/dl, p<0.0001 vs placebo.
Mathieu et al (2015) ¹⁴⁷	Ensayo Clínico Aleatorizado, doble ciego, control con placebo.	Sitagliptina 100mg/día (n=329) Placebo (n=329)	Cambio en HbA1c en 24 semanas de tratamiento.	EC, multicéntrico aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo. Sujetos con DM2, inadecuado control glucémico, tratados con insulina basal y/o con metformina, los sujetos tenían que tener glucosa de ayuno de 72 a 100mg/dl para ser elegidos. Se administró sitagliptina y titulación intensiva de insulina basal (glargina).	Niveles menores de HbA1c en el grupo de sitagliptina en relación al placebo, diferencia entre grupos de -0.4% (IC del 95%: -0.6 a -0.3; p<0.001).
Shankar et al (2017) ¹⁴⁸	Ensayo Clínico Aleatorizado, doble ciego, control con placebo.	Sitagliptina 100mg/día (n=234) Placebo (n=233)	Cambio en HbA1c en 24 semanas de tratamiento.	EC aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo. Sujetos chinos con DM2, inadecuado control glucémico, tratados con insulina basal y/o con metformina. HbA1c de 7.5 a 11%, aleatorizados 1:1 en sitagliptina 100mg y placebo; se estratifico a la población de estudio por uso de metformina (con o sin) y tipo de insulina (acción intermedia y prolongada).	Los sujetos tratados con sitagliptina presentaron una reducción significativamente mayor de HbA1c vs placebo (-0.7% vs -0.3%, p<0.001) respectivamente. 16% de los sujetos tratados con sitagliptina tuvieron un valor de HbA1c < a 7% a las 24 semanas de tratamiento vs 8% del grupo placebo.

Aschner et al (2010) ¹⁴⁹	Ensayo Clínico Aleatorizado, doble ciego.	Sitagliptina 100mg/día (n=528) Metformina 1000mg/e veces al día (n=522)	Cambio en HbA1c en 24 semanas de tratamiento.	EC aleatorizado, doble ciego. Sujetos con DM2, inadecuado control glucémico, sin tratamiento antidiabético como mínimo 16 semanas previas al ingreso al estudio, HbA1c de 6.5 a 9%, aleatorizados 1:1.	Cambios en los valores de HbA1c; -0.43% en sitagliptina vs -0.57% con metformina. La diferencia entre los grupos fue de 0.14% (IC del 95%: 0.06 a 0.21, p<0.0001). Cambios en la glucosa plasmática de ayuno: -11.5mg/dl para sitagliptina vs -19.4 para metformina. La diferencia entre los grupos fue de 8.0mg/dl (IC del 95%: 4.5 a 11.4, p<0.0001).
Goldstein et al (2007) ¹⁵⁰	Ensayo Clínico Aleatorizado, doble ciego, control con placebo.	Sitagliptina 100mg/día (n=179) Metformina 1000mg/e veces al día (n=182)	Cambio en HbA1c en 104 semanas de tratamiento. Análisis a las semanas: 24, 30 y 50.	EC aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo en paralelo. Sujetos con DM2, inadecuado control glucémico con dieta y ejercicio. Concentración de HbA1c de 7.5 a 11%. Aleatorizados en 6 tratamientos: sitagliptina 100mg/metformina 1000mg, sitagliptina 100mg/metformina 2000mg, metformina 1000mg, metformina 2000mg; todas las dosis anteriores administradas 2 veces al día, sitagliptina 100mg o placebo.	Valor promedio de HbA1c basal de 8.8%, cambio promedio entre grupos: -2.07% (S100 / M2000), -1.57% (S100 / M1000), -1.30% (M2000), -0.99% (M1000) y -0.83% (S100) (P <0,001 para comparaciones versus placebo y para administración conjunta versus monoterapias respectivas).
Hanefeld et al (2009) ¹⁵¹	Ensayo Clínico Aleatorizado, doble ciego, control con placebo.	Sitagliptina 100mg/día (n=110) Metformina 850mg/dos veces al día (n=111)	Cambio en HbA1c en 52 semanas de tratamiento.	EC aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo en paralelo. Sujetos con DM2, inadecuado control glucémico. Concentración de HbA1c de 6.5 a 10%.	El tratamiento con sitagliptina disminuyó los valores de HbA1c entre -0.39% y -0.56%, p<0.05. Además, disminuyó los valores de glucosa en ayuno entre -11.0mg/dl y -17.2mg/dl, p<0.05. Con todas las dosis de sitagliptina.

				Aleatorizados en 5 grupos: sitagliptina 25, 50 o 100mg/día o sitagliptina 50mg/dos veces al día y placebo.	
Jadzinsk et al (2009) ¹⁵²	Ensayo Clínico Aleatorizado, doble ciego, control con placebo.	Saxagliptina 10mg/día (n=335) Metformina 1000 – 2000mg/día (n=328)	Cambio en HbA1c en 24 semanas de tratamiento.	EC multicéntrico, aleatorizado, doble ciego, fase III, activo controlado. Sujetos con DM2, inadecuado control glucémico. Concentración de HbA1c de 8 a 12%. Aleatorizados en 4 grupos: Saxagliptina 5mg/metformina 500mg, saxagliptina 10mg/metformina 500mg, saxagliptina 10mg/placebo o metformina 500mg/placebo. En las semanas 1 a 5 de tratamiento se incrementó dosis de metformina de 500mg/día a 2000mg/día.	Los grupos de la combinación disminuyeron las medias ajustadas significativamente vs la monoterapia de los activos: Saxagliptina 5mg/metformina 500mg; -2.5%, saxagliptina 10mg/metformina 500mg; -2.5%, saxagliptina 10mg/placebo; -1.7% o metformina 500mg/placebo; -2.0%. estadísticamente significativas p<0.0001 vs monoterapia.
Barnett et al (2012) ¹⁵³	Ensayo Clínico Aleatorizado, doble ciego, control con placebo.	Saxagliptina 5mg/día (n=304) Placebo (n=151)	Cambio en HbA1c en 24 semanas de tratamiento.	EC aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo. Sujetos con DM2, inadecuado control glucémico, tratados con insulina y/o con metformina. Adultos con HbA1c de 7.5 a 11%, con tratamiento de insulina (30 a 150UI) y/o metformina, 8 semanas de tratamiento como mínimo, se estratificaron por el uso de metformina y aleatorizados 2:1 para saxagliptina o placebo.	Reducción significativa en los valores de HbA1c en el grupo de saxagliptina vs placebo; diferencia de -0.41%, p<0.0001. Las reducciones fueron similares en relación al placebo independientemente del tratamiento con metformina. Diferencia en glucemia en ayuno para saxagliptina vs placebo fue de -4.02mg/dl, p=0.39.

Barnett et al (2013) ¹⁵⁴	Ensayo Clínico Aleatorizado, doble ciego, control con placebo.	Saxagliptina 5mg/día (n=304) Placebo (n=151)	Cambio en HbA1c en 52 semanas de tratamiento.	EC aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo. Sujetos con DM2, inadecuado control glucémico, tratados con insulina y/o con metformina. Extensión de estudio previo a 28 semanas. Todos los sujetos que concluyeron a la semana 24 con y sin tratamiento de rescate se seleccionaron.	De la semana 24 a la 52 de intervención los resultados se mantuvieron. La diferencia ajustada fue de saxagliptina -0.75% vs placebo -0.38% y entre los grupos fue de -0.37% (IC del 95%: -0.55 a -0.19). Las diferencias entre los grupos de sujetos tratados con y sin metformina fueron similares; -0.37% (IC del 95%: -0.59 a -0.19) vs -0.37% (IC del 95%: -0.69 a -0.04).
Hirose et al (2015) ¹⁵⁵	Ensayo Clínico Aleatorizado, doble ciego, control con placebo.	Vildagliptina 50mg dos veces al día (n=76) Placebo (n=75)	Cambio en HbA1c en 12 semanas de tratamiento.	EC aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo. Sujetos japoneses con DM2, inadecuado control glucémico, tratados con insulina (intermedia o premezclada) y/o con metformina. Aleatorizados 1:1 con activo y placebo.	Reducción estadísticamente significativa en HbA1c en sujetos tratados con vildagliptina de $-1.01 \pm 0.06\%$, con diferencia entre tratamientos de $-0.91 \pm 0.09\%$; $p < 0.001$.
Ning et al (2016) ¹⁵⁶	Ensayo Clínico Aleatorizado, doble ciego, control con placebo.	Vildagliptina 50mg dos veces al día (n=146) Placebo (n=147)	Cambio en HbA1c en 24 semanas de tratamiento.	EC multicéntrico, aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo. Sujetos asiáticos con DM2, inadecuado control glucémico, tratados con insulina (acción prolongada, intermedia o premezclada) y/o con metformina. Valor de HbA1c al inicio del estudio de 7.5 a 11%. Aleatorizados 1:1.	La diferencia media ajustada en HbA1c en la semana 24 de tratamiento para los grupos de vildagliptina $-1.08 \pm 0.12\%$ vs placebo $-0.38 \pm 0.12\%$. La diferencia entre tratamientos fue de $-0.70 \pm 0.16\%$, $p < 0.001$.
Bosi et al (2009) ¹⁵⁷	Ensayo Clínico Aleatorizado,	Vildagliptina 50mg/dos veces al día	Cambio en HbA1c en 24 semanas de tratamiento.	EC aleatorizado, doble ciego, activo control.	Los valores de HbA1c disminuyeron en los 4 grupos de tratamiento, fue mayor en la combinación con vildagliptina y

	doble ciego, activo control.	(n=300) Metformina 1000mg/dos veces al día (n=294)		Sujetos con DM2, inadecuado control glucémico. Valor de HbA1c al inicio del estudio de 7.5 a 11%. Aleatorizados 1:1 en 4 tratamientos: vildagliptina 50mg/metformina 1000mg dos veces al día, vildagliptina 50mg/metformina 500mg dos veces al día, monoterapia con vildagliptina 50mg dos veces al día, metformina 1000mg dos veces al día.	dosis altas de metformina. Vildagliptina/dosis alta de metformina -1.8±0.06%, vildagliptina/dosis bajas de metformina -1.6±0.06%, monoterapia de vildagliptina -1.1±0.06%, monoterapia de metformina -1.4±0.06%.
Schweizer et al (2009) ¹⁵⁸	Ensayo Clínico Aleatorizado, doble ciego, activo control.	Vildagliptina 100mg/día (n=169) Metformina 1500mg/día (n=166)	Cambio en HbA1c en 24 semanas de tratamiento.	EC multicéntrico, aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo, grupos en paralelo. Sujetos con DM2, inadecuado control glucémico. HbA1c basal de 7 a 9%. Aleatorizados 1:1.	Los valores de HbA1c disminuyeron en los dos grupos de tratamiento. Vildagliptina -0.64±0.07% vs Metformina -0.75±0.07%.
Schweizer et al (2007) ¹⁵⁹	Ensayo Clínico Aleatorizado, doble ciego, activo control.	Vildagliptina 100mg/día (n=526) Metformina 1000mg/dos veces al día (n=254)	Cambio en HbA1c en 104 semanas de tratamiento.	EC multicéntrico, aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo, grupos en paralelo. Sujetos con DM2, inadecuado control glucémico, sin tratamiento previo, HbA1c basal de 7.5 a 11%. Aleatorizados 1:1.	Los valores de HbA1c disminuyeron durante las primeras 12 semanas (punto máximo de disminución) y la eficacia se mantuvo por un año con los dos tratamientos; vildagliptina -1.0±0.1% y metformina -1.4±0.1%, ambas p<0.001.
Análogos de GLP-1					
Marre M et al (2009) ¹⁶⁰	Ensayo Clínico Aleatorizado, doble ciego,	Liraglutida 0.6mg/día (n=233) Liraglutida	Cambio en HbA1c, glucosa en ayuno y postprandial en	EC multicéntrico, aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo, grupos en paralelo.	Liraglutida a 1.2 y 1.8mg/día presento reducciones mayores en HbA1c en comparación con placebo (-1.1% vs 0.2%, p<0.0001) respectivamente.

	control con placebo.	1.2mg/día (n=228) Liraglutida 1.8mg/día (n=234) Rosiglitazona 4mg/día (n=232) Placebo (n=114)	26 semanas de tratamiento.	Sujetos con DM2, inadecuado control glucémico. Valor de HbA1c al inicio del estudio de 8.4±1.0%. Aleatorizados 1:1 a 5 grupos de tratamiento.	Rosiglitazona + pirimidina (-0.4%, p<0.0001). Liraglutida 0.6mg/día menos efectivo en la comparación con el resto de activos (-0.6%)
Nauck M et al (2009) ¹⁶¹	Ensayo Clínico Aleatorizado, doble ciego, control con placebo.	Liraglutida 0.6mg/día (n=100) Liraglutida 1.2mg/día (n=100) Liraglutida 1.8mg/día (n=100) Glimepirida 4mg/día (n=100) Placebo (n=100)	Cambio en HbA1c en 26 semanas de tratamiento.	EC aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo, grupos en paralelo. Sujetos con DM2, inadecuado control glucémico. Valor de HbA1c al inicio del estudio de 7 a 11%. Con monoterapia previa al tratamiento con antidiabéticos orales de por lo menos 3 meses. Aleatorizados 1:1 a 5 grupos de tratamiento.	Reducción de valores de HbA1c en todos los grupos tratados con liraglutida vs placebo. Disminución media de 1.0% en dosis de liraglutida a 1.8 y 1.2. Glimepirida tuvo una reducción de 1.0%. Liraglutida 0.6mg/día tuvo una reducción de 0.7% y placebo incremento 0.1%. La diferencia entre grupos fue estadísticamente significativa p<0.0001.
Drucker D et al (2008) ¹⁶²	Ensayo Clínico Aleatorizado, abierto, de no inferioridad.	Exenatida 2mg/1 vez por semana (n=151) Exenatida 10mg/dos veces al día (n=152)	Cambio en HbA1c en 30 semanas de tratamiento.	EC aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo, grupos en paralelo. Sujetos con DM2, inadecuado control glucémico. Valor de HbA1c al inicio del estudio de 8.3±1.0%. Con monoterapia previa al tratamiento con antidiabéticos orales.	Exenatida una vez a la semana presentaron una reducción mayor en valores de HbA1c en comparación a Exenatida aplicada 2 veces al día (-1.9% vs -1.5%, p=0.0023).

				Aleatorizados 1:1 a 2 grupos de tratamiento.	
Buse J et al (2013) ¹⁶³	Ensayo Clínico Aleatorizado, abierto, grupos en paralelo.	Liraglutida 1.8mg/día (n=450) Exenatida 2mg/día (n=461)	Cambio en HbA1c en 26 semanas de tratamiento.	EC multicéntrico, aleatorizado, abierto, controlado con placebo, grupos en paralelo. Sujetos con DM2, inadecuado control glucémico. Tratados previamente con fármacos antidiabéticos y cambios en estilo de vida. Aleatorizados 1:1 a los principios activos.	Cambio medio de los valores de HbA1c en los tratamientos fue mayor en pacientes en el grupo de liraglutida -1.4% vs exenatida -1.28%, con diferencia de 0.21% (IC del 95%: 0.88 a 0.33).
Ahren B et al (2013) ¹⁶⁴	Ensayo Clínico Aleatorizado, doble ciego, control con placebo.	Lixisenatida 20µg/día por la mañana (n=255) Lixisenatida 20µg/día por la noche (n=255) Placebo por la mañana (n=85) Placebo por la noche (n=85)	Cambio en HbA1c en 24 semanas de tratamiento.	EC aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo, grupos en paralelo. Sujetos con DM2, inadecuado control glucémico. Tratados previamente con metformina y sin responder adecuadamente al tratamiento. HbA1c de 7 a 10%. Aleatorizados al azar.	Cambio en los valores de HbA1c media con Lixisenatida por la mañana -0.9% vs -0.5% con placebo, p<0.0001. Lixisenatida nocturna redujo los valores medios de HbA1c -0.8% vs -0.4% con placebo, p<0.0001.
Criba M et al (2013) ¹⁶⁵	Ensayo Clínico Aleatorizado, doble ciego, control con placebo.	Lixisenatide 20µg/día (n=328) Placebo (n=167)	Cambio en HbA1c en 24 semanas de tratamiento.	EC aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo, grupos en paralelo. Sujetos con DM2, inadecuado control glucémico.	El cambio de lixisenatida en el valor de HbA1c media corregido por placebo fue de -0.4% (IC del 95%: -0.6 a -0.2; p<0.0001)

				<p>Tratados previamente con metformina e insulina basal y sin responder adecuadamente al tratamiento.</p> <p>Ambos grupos de tratamiento tenían como terapia basal insulina y metformina (sin o con) y se agregó placebo o lixisenatida.</p>	
Umpierrez G et al (2014) ¹⁶⁶	Ensayo Clínico Aleatorizado, doble ciego.	<p>Dulaglutide 1.5mg/una vez a la semana (n=233)</p> <p>Dulaglutide 0.75mg/una vez a la semana (n=242)</p> <p>Metformina 2000mg/día (n=226)</p>	Cambio en HbA1c en 26 semanas de tratamiento.	<p>EC aleatorizado, doble ciego, grupos en paralelo.</p> <p>Sujetos con DM2, inadecuado control glucémico.</p> <p>Tratados previamente con fármacos antidiabéticos y cambios en estilo de vida.</p> <p>Valores de HbA1c basales $\geq 6.5\%$.</p>	Los cambios en los valores medios de HbA1c fueron: dulaglutida 1.5mg; $-0.78 \pm 0.06\%$, dulaglutida 0.75mg; $-0.71 \pm 0.06\%$ y metformina $-0.56 \pm 0.06\%$.
Dungan K et al (2014) ¹⁶⁷	Ensayo Clínico Aleatorizado, fase III, abierto.	<p>Dulaglutida una vez a la semana (n=299)</p> <p>Liraglutida una vez al día (n=300)</p>	Cambio en HbA1c en 26 semanas de tratamiento.	<p>EC multicéntrico, aleatorizado, abierto, fase III, grupos en paralelo.</p> <p>Sujetos con DM2, inadecuado control glucémico.</p> <p>Tratados previamente con metformina ($\geq 1500\text{mg/día}$) sin lograr control metabólico.</p>	La reducción media de los valores promedios de HbA1c fue de -1.42% en dulaglutida y -1.36% en el grupo de liraglutida. -0.06% (IC del 95%: -0.19 a 0.07 ; $p < 0.0001$).

ANEXO 2.

Autor y año	Diseño de estudio	Pacientes y tratamiento	Desenlace primario	Metodología	Resultados
Yki-Järvinen et al (2013) ¹⁶⁹	Ensayo Clínico Aleatorizado/control con placebo.	Linagliptina (5mg/día) n= 631 Placebo n=630	Cambio en HbA1c en 24 semanas de tratamiento.	EC aleatorizado, doble ciego, control con placebo, fase III, multicéntrico. Sujetos con inadecuado control glicémico (HbA1c: $\geq 7\%$ y $\leq 10\%$, IMC ≤ 45). Recibieron 12 semanas previas tratamiento con insulina basal sola o en combinación con Metformina y/o pioglitazona. Seguimiento de 72 semanas de tratamiento, análisis a: 24, 52 y 72.	Linagliptina es superior a placebo, reduce HbA1c -0.58% vs -0.07% a las 24 semanas ($p < 0.0001$) y a las 52 semanas -0.48% vs -0.05%, ($p < 0.0001$).
Sheu et al (2015) ¹⁷⁰	Ensayo Clínico Aleatorizado/control con placebo.	Linagliptina (5mg/día) n= 80 Placebo n=74	Cambio en HbA1c en 24 semanas de tratamiento.	EC aleatorizado, doble ciego, control con placebo, análisis Post Hoc. Sujetos con tratamiento de insulina basal, se asignó aleatoriamente 5mg de Linagliptina al día (1:1). La dosis basal de insulina se mantuvo por 24 semanas, después se realizaron ajustes en los sujetos para mejorar el control glicémico.	El cambio promedio ajustado en HbA1c respecto al placebo fue de $-0.9\% \pm -0.1\%$ en 24 semanas de tratamiento. Como análisis secundario se encontró diferencia en peso corporal: linagliptina -0.67kg vs placebo -0.38kg.
Durán García et al (2015) ¹⁷¹	Ensayo Clínico Aleatorizado/control con placebo.	Linagliptina (5mg/día) n= 475 Placebo	Cambio en HbA1c en 24 semanas de tratamiento.	EC aleatorizado, doble ciego, control con placebo, fase III, subanálisis Post Hoc.	El cambio promedio ajustado en HbA1c respecto al placebo fue de

		n=475		<p>Sujetos con tratamiento de insulina basal y metformina, se asignó aleatoriamente 5mg de linagliptina al día (1:1).</p> <p>La dosis basal de insulina se mantuvo por 24 semanas, después se realizaron ajustes en los sujetos para mejorar el control glicémico.</p> <p>El análisis de seguridad incorporó datos hasta un máximo de 110 semanas.</p>	-0.7 en linagliptina vs -0.04% en placebo a las 24 semanas de tratamiento.
Barnett AH et al (2012) ¹⁷²	Ensayo Clínico Aleatorizado, doble ciego, paralelo, control con placebo.	Linagliptina 5mg/día (n=151) Placebo (n=76)	Cambio en HbA1c en 18 semanas de tratamiento.	<p>EC aleatorizado, doble ciego, control con placebo.</p> <p>Sujetos con DM2, con inadecuado control glucémico, sin tratamiento previo, con valores de HbA1c de 7.0a 10.0%, si los sujetos estaban tratados con algún fármaco antidiabético se sometieron a lavado y los valores de HbA1c fueron posterior al mismo de 6.5 a 9.0%.</p> <p>Incluyó sujetos para los que la metformina estaba contraindicada.</p> <p>Aleatorizados a 2 tratamiento.</p>	<p>A un valor de HbA1c inicial de 8.1%, en la semana 18 la diferencia media ajustada en el cambio para el valor de HbA1c inicial: -0.39% con linagliptina y +0.20% con placebo.</p> <p>-0.60% (IC del 95%: -0.88 a -0.32; p<0.0001).</p>
Kawamori R et al (2012) ¹⁷³	Ensayo Clínico Aleatorizado, doble ciego, paralelo, control con placebo.	Linagliptina 5mg/día (n=159) Linagliptina 10mg/día (n=160)	Cambio en HbA1c con placebo después de 12 semanas y en	<p>EC aleatorizado, doble ciego, control con placebo.</p> <p>Sujetos con DM2, con inadecuado control glucémico, previamente tratados con uno o dos fármacos antidiabéticos orales. Lavado de 2 a 4</p>	<p>El promedio general basal de HbA1c fue de 8.01%. las diferencias del tratamiento ajustadas en la semana 12 para HbA1c: -0.87% (IC del 95%: -1.04 a -0.70%; p<0.0001) para linagliptina 5mg/día y -0.88% (IC del</p>

		Voglibose 0.2mg/día (n=162)	comparación con voglibosa después de 26 semanas de tratamiento.	semanas y placebo para todos los grupos previo a la medicación de 1 semana. Sujetos aleatorizados al azar (2:2:2:1) con linagliptina a 5 o 10mg/día, voglibosa 0.2mg/día o placebo.	95%: -1.05 a -0.71%; p<0.0001) para linagliptina 10mg/día en comparación con placebo. Para la semana 26 de tratamiento en HbA1c: -0.32% (IC del 95%: -0.49 a -0.15%; p<0.0001) para linagliptina 5mg/día y -0.39% (IC del 95%: -0.56 a -0.21%; p<0.0001) para linagliptina 10mg/día en comparación con voglibosa.
Haak T et al (2012) ¹⁷⁴	Ensayo Clínico Aleatorizado, doble ciego, fase III, paralelo, control con placebo.	Linagliptina 5mg/día (n=142) Metformina 500mg/día n=144) Metformina 1000mg/día (n=147) Linagliptina 2.5mg/día + metformina 500mg/día (n=143) Linagliptina 2.5mg/día + metformina 1000mg/día (n=143) Placebo (n=72)	Cambio en HbA1c en 24 semanas de tratamiento.	EC aleatorizado, doble ciego, control con placebo. Sujetos con DM2, con inadecuado control glucémico. Los sujetos con HbA1c ≥11% no fueron elegibles para participar en el estudio. Participantes aleatorizados en linagliptina 2.5mg/dos veces al día + dosis baja (500mg) o dosis alta (1000mg) de metformina. Las intervenciones con monoterapia se administraron 1 vez al día.	Para HbA1c el cambio medio corregido por placebo, considerando el valor de HbA1c basal de 8.7%, fue de: para linagliptina + metformina en dosis alta -1.7% (IC del 95%: -2.0 a -1.4%; p<0.0001), para linagliptina + metformina en dosis baja -1.3% (IC del 95%: -1.6 a -1.1%; p<0.0001), para metformina en dosis alta -1.2% (IC del 95%: -1.5 a -0.9%; p<0.0001), para metformina en dosis baja -0.8% (IC del 95%: -1.0 a -0.5%; p<0.0001) y para linagliptina -0.6% (IC del 95%: -0.9 a -0.3%; p<0.0001).

Forst T et al (2011) ¹⁷⁵	Ensayo Clínico Aleatorizado, doble ciego, paralelo, control con placebo.	Linagliptina (2.5mg [n=26], 5mg [n=16], 10mg/día [n=19]) n=61 Placebo n= 16	Cambio en HbA1c en 28 días de tratamiento.	EC aleatorizado, doble ciego, control con placebo. Sujetos con DM2, lavado de medicamentos antidiabéticos por 14 días. Los sujetos de la intervención se aleatorizaron en 3 grupos por dosis: 2.5, 5 y 10mg/día y comparados con placebo. Se consideró como valor de HbA1c basal en 7.0%.	Las 3 dosis diferentes de linagliptina estudiadas causaron disminuciones estadísticamente significativas del área bajo la curva de glucosa, incremento de GLP-1. En HbA1c el cambio medio corregido con placebo fue de: -0.31% para la dosis de linagliptina de 2.5mg/día, -0.37% para la dosis de linagliptina de 5mg/día y -0.28% para la dosis de linagliptina de 10mg/dl.
Del Prado et al (2011) ¹⁷⁶	Ensayo Clínico Aleatorizado/control con placebo.	Linagliptina (5mg/día) n= 336 Placebo n=167	Cambio en HbA1c y FPG en 24 semanas de tratamiento.	EC aleatorizado, doble ciego, control con placebo, multicéntrico. Sujetos con DM2, IMC ≤40, sin tratamiento previo y si así fuese después de un lavado de 8 semanas al consumo de otro antidiabético a excepción de TZDs, posterior al lavado 7.0-10.0% en HbA1c. Aleatorización en una relación 2:1, duración del tratamiento 24 semanas.	Linagliptina fue superior en cambios con diferencia estadísticamente significativa en comparación con placebo: HbA1c; Linagliptina -0.69% vs placebo -0.53% (IC del 95%: -0.85 a -0.53%; p>0.0001). FPG; Linagliptina tuvo una diferencia significativamente mayor. Diferencia entre grupos -23.3mg/dl (IC del 95%: -30.4 a -16.3mg/dl; p>0.0001).
Taskinen et al (2011) ¹⁷⁷	Ensayo Clínico Aleatorizado/control con placebo.	Linagliptina (5mg/día) n= 524 Placebo n=177	Cambio en HbA1c y FPG en 24 semanas de tratamiento.	EC aleatorizado, doble ciego, control con placebo, multicéntrico. Sujetos con DM2, IMC ≤40, metformina (monoterapia) o con otro fármaco antidiabético oral como tratamiento (≥1500mg/día o dosis máxima tolerada), con HbA1c de 7.0 a	Ligiptina + metformina fue superior en cambios con diferencia estadísticamente significativa en comparación con placebo: HbA1c: la diferencia entre los grupos fue de -0.64% (IC del 95%: -0.78 a -0.50%; p>0.0001).

				<p>10.0% posterior a un lavado de antidiabéticos orales que no fueron metformina.</p> <p>Aleatorización en una proporción de 3:1 a linagliptina o placebo por 24 semanas.</p>	<p>FPG: la diferencia entre los grupos fue de -21.1mg/dl (IC del 95%: -27.4 a -15.0mg/dl; p<0.0001).</p>
Owens et al (2011) ¹⁷⁸	Ensayo Clínico Aleatorizado/control con placebo.	Linagliptina (5mg/día) n= 792 Placebo n=263	Cambio en HbA1c y FPG en 24 semanas de tratamiento.	<p>EC aleatorizado, doble ciego, control con placebo, multicéntrico.</p> <p>Sujetos con DM2, IMC ≤40, con régimen de fármacos estable de metformina y sulfonilurea (en descontrol glucémico), con HbA1c de 7.0 a 10.0% (no fue necesario el lavado a fármacos antidiabéticos orales).</p> <p>Aleatorización en una proporción de 3:1 a linagliptina 5mg/día o placebo por 24 semanas, además del régimen que se tenía establecido de metformina + sulfonilurea, sin modificación de dosis.</p>	<p>Los sujetos que tuvieron en sus tratamientos linagliptina de forma adicional presentaron cambios significativamente mayores en HbA1c y FPG en comparación al placebo.</p> <p>El cambio ajustado corregido por placebo en HbA1c: -0.62% (IC del 95%: -0.73 a -0.50%; p<0.0001) y FPG: -12.7mg/dl (IC del 95%: -18.1 a -7.3mg/dl; p<0.0001).</p>
Gomis et al (2011) ¹⁷⁹	Ensayo Clínico Aleatorizado/control con placebo.	Linagliptina (5mg/día) + pioglitazona 30mg/día n= 259 Placebo + pioglitazona 30mg/día n=130	Cambio en HbA1c y FPG en 24 semanas de tratamiento.	<p>EC aleatorizado, doble ciego, control con placebo, multicéntrico.</p> <p>Sujetos con DM2, IMC ≤40, con régimen de fármacos estable de fármacos antidiabéticos estables, con HbA1c de 7.5 a 11.0% después de un lavado de 8 semanas a cualquier tratamiento antidiabético oral.</p>	<p>Los cambios medios ajustados a HbA1c y FPG para la combinación con linagliptina fueron mayores estadísticamente significativos.</p> <p>El cambio ajustado corregido por pioglitazona + placebo en HbA1c: -0.51% (IC del 95%: -0.71 a -0.30%; p<0.0001) y</p>

				<p>Todos los pacientes fueron sometidos a placebo abierto por 2 semanas previo al tratamiento, aleatorización en proporción 2:1 para la combinación: pioglitazona 30mg/día + linagliptina 5mg/día y pioglitazona 30mg/día + placebo.</p>	<p>FPG: -14.2mg/dl (IC del 95%: -21.1 a -7.3mg/dl; p<0.0001).</p>
<p>Forst T et al (2010)¹⁸⁰</p>	<p>Ensayo Clínico Aleatorizado, doble ciego, paralelo, control con placebo.</p>	<p>Sujetos con las diferentes dosis de Linagliptina (n= 197), de los cuales: Linagliptina 1mg/día (n=65), Linagliptina 5mg/día (n=66), linagliptina 10mg/día (n=66). Glimepirida 1mg/día (n=65) Placebo (n=71) *con metfomina.</p>	<p>Cambio en HbA1c y glucosa en ayuno en 12 semanas de tratamiento</p>	<p>EC aleatorizado, doble ciego, control con placebo. Sujetos con DM2, con terapia de metformina en curso, control glucémico inadecuado HbA1c ≥7.5 a ≤10%) Aleatorización para los 5 grupos de tratamiento.</p>	<p>Los cambios medios ajustados por placebo en HbA1c fueron: -0.40% para 1mg/día de linagliptina, -0.73% para 5mg/día de linagliptina y -0.67% para 10mg/día de linagliptina, todos con p<0.0001. El cambio medio de HbA1c corregido por placebo para glimepirida fue de -0.90%.</p> <p>Cambios medios ajustados y corregidos por placebo en glucosa de ayuno fueron estadísticamente significativos para el tratamiento con linagliptina en sus diferentes dosis, p<0.0001.</p>

ANEXO 3

Somatometría

Técnica de medición de peso:

- La báscula debe colocarse en una superficie dura y plana.
- Revisar antes de cada medición que la báscula esté en ceros.
- El sujeto se sitúa de pie en el centro de la plataforma de la báscula distribuyendo el peso por igual en ambas piernas, sin que el cuerpo este en contacto con nada que haya alrededor.
- Los brazos se deben de colgar libremente a ambos lados del cuerpo.
- La medida se realizará con la persona en ropa interior, o bien de no ser posible con ropa ligera, sin zapatos ni adornos personales.
- Se deberá anotar la hora en la cual se efectuó la medición.

Técnica de medición de la talla:

- Al medir la estatura el sujeto se coloca de pie y descalzo, completamente derecho con la cabeza posicionada de tal manera que el plano de Frankfurt quede horizontal.
- El sujeto no debe tener ningún adorno en la cabeza.
- Los pies deben estar juntos, rodillas derechas; los tobillos, las nalgas y la parte trasera de los hombros deben estar en contacto con la superficie vertical del estadímetro.
- Los brazos deben colgar libremente a los lados del cuerpo con las palmas de las manos hacia los muslos.
- Se indica al sujeto que realice una inspiración profunda sin levantar la planta de los pies y manteniendo la posición de la cabeza.
- Se desciende lentamente la plataforma horizontal del estadímetro hasta contactar con la cabeza del paciente, ejerciendo una suave presión para minimizar el efecto del pelo.
- La medición será tomada cuando el sujeto realice la mayor inspiración.
- Para registrar la medición, los ojos del evaluador deben apuntar hacia el borde de la cabeza del sujeto.
- Si la medida cae entre dos valores el valor más pequeño es el que se deberá de tomar. Se debe anotar la hora en la que se efectuó la medición.

Técnica de medición de cintura:

- El sujeto se colocará en posición erecta, con los miembros superiores a ambos lados del cuerpo, las palmas y dedos de las manos rectos y extendidos hacia abajo, mirando hacia el frente, en bipedestación, con el peso distribuido equitativamente en ambos pies.
- El sujeto debe de portar el mínimo de ropa para poder realizar esta medición.
- Se determina el perímetro en la zona abdominal, a un nivel intermedio entre el último arco costal y la cresta ilíaca, en la posición más estrecha del abdomen. Se utiliza la técnica de cinta yuxtapuesta, sostenida en nivel horizontal.

Técnica de medición de cadera:

- El sujeto se colocará en posición erecta, con los miembros superiores a ambos lados del cuerpo, las palmas y dedos de las manos rectos y extendidos hacia abajo, mirando hacia el frente, en bipedestación, con el peso distribuido equitativamente en ambos pies.
- El sujeto debe de portar el mínimo de ropa para poder realizar esta medición.
- El personal de salud que realice la medición deberá localizar el nivel máximo de los glúteos en un plano horizontal, posteriormente pasar la cinta sin comprimir y la lectura se leerá en cm.

ANEXO 4.

Carta de aceptación del Comité de Investigación.

		
MEMORANDO		
2017, "Año del Centenario de la Promulgación de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos"		
Para	Dr. Rodolfo Guardado Mendoza Responsable Técnico	Fecha: 14-Sept-2017
		Folio: CI/HRAEB/086/2017
De	Dr. José Antonio de Jesús Álvarez Canales Presidente del Comité de Investigación:	Hoja: 1 de 1

Estimado **Dr. Rodolfo Guardado Mendoza** al respecto de su solicitud de evaluación del protocolo de investigación **Análisis funcional y comparación taxonómica del microbioma intestinal en pacientes con prediabetes con y sin adecuada respuesta a terapias combinadas de prevención de diabetes, y su relación con resistencia a la insulina y función del islote pancreático**, se le comunica la decisión del Comité de Investigación:

APROBADO con el número de registro **CI/HRAEB/2017/048**

Se le informa que la aprobación cuenta **con vigencia de un año**, al final de la cual deberá entregar un reporte de los avances o finalización de la investigación.

Sin otro particular, me despido reiterándole nuestro más alto compromiso institucional.

Atentamente 

"En el 2017, estamos de 10"

ANEXO 5

Carta de aceptación del Comité de Ética.



León, Gto. a 14 de septiembre de 2017.

Asunto:

1. Respuesta del Comité de Ética en Investigación a la propuesta de revisión de los documentos del Proyecto "Análisis funcional y comparación taxonómica del microbioma intestinal en pacientes con prediabetes con y sin adecuada respuesta a terapias combinadas de prevención de diabetes, y su relación con resistencia a la insulina y función del islote pancreático"

DR. RODOLFO GUARDADO MENDOZA
Investigador principal



Le informo que el Comité de Ética en Investigación del Hospital Regional de Alta Especialidad del Bajío ha evaluado los siguientes documentos:

- Protocolo del proyecto

De acuerdo a lo anterior, ha resuelto emitir la siguiente decisión: **APROBADO**

Se hacen las siguientes observaciones: Sin observación

En cuanto agregue y/o corrija los cambios, le pedimos reenvíe su protocolo al Comité, para extenderle su carta de aprobación.

Le reiteramos el apoyo del CEI para el logro de su proyecto

Dr. Jorge F. Acuña Valerio
Presidente
Comité de Ética en Investigación,
Hospital Regional de Alta Especialidad
del Bajío

María Maldonado Vega
Dra. María Maldonado Vega
Secretario
Comité de Ética en Investigación,
Hospital Regional de Alta Especialidad
del Bajío

ANEXO 6

Formato de Consentimiento Informado.



FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título: “Efecto de la Linagliptina + Metformina vs Metformina sola sobre la composición del microbioma intestinal y su relación con resistencia a la insulina y secreción de insulina en pacientes con prediabetes durante 12 meses”

Número de protocolo: _____

Lugar: Hospital Regional de Alta Especialidad del Bajío, Departamento de Medicina y Nutrición, División de Ciencias de la Salud, Universidad de Guanajuato, Campus León, e Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN)

Dirección: Blvd. Puente Milenio No. 1001, San Carlos la Roncha, León Guanajuato, C.P. 37670.

Investigadores: Dr. Rodolfo Guardado Mendoza (Hospital Regional de Alta Especialidad del Bajío), Dra. Ma. De Lourdes Reyes Escogido (Universidad de Guanajuato), Dr. Osbaldo Resendiz Antonio (INMEGEN)

Teléfono de los investigadores: 477-2672000, Ext. 1701 y 1708 (Hospital Regional de Alta Especialidad del Bajío); 477-2674900, Ext. 3683 (Universidad de Guanajuato), 55-53501900, Ext. 1145 (INMEGEN).

Introducción:

La diabetes mellitus tipo 2 es un problema de salud muy importante en México, por lo que se realizan diferentes esfuerzos para identificarla en etapas tempranas (como la prediabetes), para poder tratarla oportunamente y en lo posible evitar que la enfermedad siga avanzando. En el Hospital Regional de Alta Especialidad, estamos realizando una investigación en colaboración con la Universidad de Guanajuato Campus León y el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) en personas con prediabetes, cuyo objetivo principal es determinar el efecto de los tratamientos para prevenir la diabetes (Linagliptina + Metformina en comparación con Metformina sola) en la composición del microbioma intestinal (composición de los microorganismos/bacterias intestinales) en pacientes con diagnóstico de prediabetes (glucosa alterada de ayuno e intolerancia a la glucosa). En este estudio se invitarán a participar todos los pacientes que están incluidos en proyectos de prevención de diabetes (aproximadamente 116 personas). La finalidad de este documento es informarle en qué consiste la investigación que estamos realizando e invitarlo a que usted participe, ya que usted está participando en un proyecto de prevención de diabetes, y es candidato para ingresar en este estudio, que nos permitirá identificar el efecto de los tratamientos para prevenir la diabetes la (Linagliptina + Metformina en comparación con Metformina sola) sobre la composición del microbioma intestinal (composición de los

microorganismos/bacterias intestinales) en pacientes con prediabetes y además determinar la relación de la composición del microbioma intestinal con la resistencia a la insulina y la secreción de insulina durante 12 meses.

No tiene que decidir hoy si participa en la investigación, antes de decidirse, puede hablar sobre la investigación con alguien con quien se sienta cómodo, como un familiar o un amigo.

Es posible que haya algunas palabras que no entienda, por favor, deténgame según le informo para darme tiempo de explicarle. Si tiene dudas más tarde, puede preguntarme a mí o a cualquier miembro del equipo que realiza la investigación.

Le informo también que su participación es completamente voluntaria y que puede retirarse del estudio en caso de que así lo desee en cualquier momento, sin que esto tenga ninguna repercusión en la atención que Usted recibirá como parte de la investigación de prevención de diabetes en la que Usted participa, y en este caso no se utilizará ni sus datos ni sus muestras para el presente estudio. En caso de aceptar participar, toda la información que se obtenga en este estudio será manejada de manera confidencial y será utilizada únicamente con fines científicos.

Propósito de la investigación.

Este estudio tiene como objetivo principal determinar el efecto de los tratamientos para prevenir la diabetes la (Linagliptina + Metformina en comparación con Metformina sola) sobre la composición del microbioma intestinal (composición de los microorganismos/bacterias intestinales) en pacientes con prediabetes y establecer la relación de la composición del microbioma intestinal con la resistencia a la insulina y la secreción de insulina durante 12 meses.

Procedimientos de la investigación.

Si acepta participar en este trabajo de investigación, se le realizará lo siguiente:

Se le pedirá recolectar una muestra de heces al inicio de la intervención de prevención de diabetes, y otras dos a los 6 y 12 meses de la intervención; para poder realizar el análisis de las bacterias intestinales benéficas antes y durante la intervención, misma que deberá entregar el día de su seguimiento en el laboratorio de investigación en metabolismo de la Universidad de Guanajuato en el material que se le entregará, para esto no requerirá más de 15 minutos.

Si así lo decido, ¿a qué me comprometo al participar en esta investigación?

Si usted acepta participar en esta investigación, deberá consumir el medicamento indicado por 12 meses, asistir mensualmente a las consultas de seguimiento, realizarse 3 curvas de tolerancia oral a la glucosa, clamp hiperglucémico y entregar las muestras de heces antes de la intervención, a los 6 y 12 meses en el laboratorio de Investigación en Metabolismo de la Universidad de Guanajuato, mismas que serán estudiadas mediante diferentes técnicas en dicho laboratorio y en el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) en la Ciudad de México.

Si acepto, ¿me pagarán por participar en esta investigación?

No, si usted decide participar en esta investigación no recibirá ningún pago por ello.

¿Cuáles son los beneficios que obtendré al participar en esta investigación?

Usted no obtendrá un beneficio directo por participar en este estudio; el beneficio y su contribución al participar en este estudio de investigación radica en que con los datos que se obtengan de la investigación se podrán identificar factores que pudieran influir en la respuesta que se tendrá al iniciar un tratamiento para prevenir la diabetes. Los procedimientos realizados durante el estudio no tendrán costo alguno para usted y tampoco recibirá ninguna compensación por participar en el estudio.

Confidencialidad de la información

Recuerde que su identidad será protegida en todo momento, para ello su nombre y toda información que pudiera ser utilizada para identificarle será cuidadosamente resguardada. Le asignaremos un número que utilizaremos para identificar sus datos, y usaremos ese número en lugar de su nombre con fines del reporte de esta investigación. Cuando los resultados de este estudio sean publicados o presentados en conferencias, por ejemplo, no se dará información que pudiera revelar su identidad.

Contactos para dudas e información del estudio y sus derechos como participante del mismo

Agradecemos mucho su participación en el estudio **Efecto de la Linagliptina + Metformina vs Metformina sola sobre la composición del microbioma intestinal y su relación con resistencia a la insulina y secreción de insulina en pacientes con prediabetes durante 12 meses**. Si tiene preguntas o quiere hablar con alguien sobre este estudio de investigación puede comunicarse con el personal de la investigación o con los Coordinadores del proyecto de Investigación Dr. Rodolfo Guardado Mendoza, y Dra. Ma. De Lourdes Reyes Escogido a los teléfonos 477-2672000, Ext. 1701 y 1708, y 477-2674900, ext. 3683, respectivamente.

Además, ponemos a sus órdenes los teléfonos de contacto del Comité de Ética en Investigación del Hospital Regional de Alta Especialidad del Bajío 477-2672000, Ext. 1701 y 1708 para que pueda aclarar cualquier duda que tenga respecto a su participación en este proyecto de investigación.

DECLARACIÓN DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO

Por _____ medio de la presente, yo _____ acepto participar en el estudio de investigación titulado: **Efecto de la Linagliptina + Metformina vs Metformina sola sobre la composición del microbioma intestinal y su relación con resistencia a la insulina y secreción de insulina en pacientes con prediabetes durante 12 meses**; registrado ante el Comité de Ética en Investigación del Hospital Regional de Alta Especialidad del Bajío, con el número _____, y cuyo objetivo principal es determinar el efecto de los tratamientos para prevenir la diabetes la (Linagliptina + Metformina en comparación con Metformina sola) sobre la composición del microbioma intestinal (composición de los microorganismos/bacterias intestinales) en pacientes con prediabetes y establecer la relación de la composición del microbioma intestinal con la resistencia a la insulina y la secreción de insulina durante 12 meses. El investigador principal me ha informado que mi participación es completamente voluntaria y que puedo retirarme del estudio en caso de que así lo desee en cualquier momento durante el curso del mismo, sin que esto tenga ninguna repercusión en la atención que debo recibir en mi centro de atención médica; así mismo, se me ha informado que la información que se obtenga en dicho estudio será manejada de manera confidencial y únicamente utilizada con fines científicos.

Al aceptar participar en el presente trabajo de investigación, deberé consumir el medicamento indicado por 12 meses, asistir mensualmente a las consultas de seguimiento, realizarme 3 curvas de tolerancia oral a la glucosa, clamp hiperglucémico y deberé entregar 3 muestras de heces en diferentes momentos en el Laboratorio de Investigación en Metabolismo de la Universidad de Guanajuato, Campus León.

Los investigadores responsables de este proyecto, por parte del Hospital Regional de Alta Especialidad del Bajío y de la Universidad de Guanajuato, Dr. Rodolfo Guardado Mendoza y Dra. Ma. De Lourdes Reyes Escogido, respectivamente, me han proporcionado toda la información respecto al estudio, ha aclarado todas mis dudas en relación a los beneficios, riesgos y utilidad de mi participación, me ha proporcionado su número telefónico (Cel. 044 477 2744215, y 477 234 4944) para en caso de que posteriormente me surgieran más dudas, y me han dado un duplicado de este documento para que lo conserve.

Participante:

Nombre y apellidos:

Firma o huella dactilar:

Fecha: _____

Representante legal (sólo si aplica):

Nombre y apellidos:

Firma:

Fecha: _____

Primer testigo:

Nombre y apellidos:

Firma:

Fecha: _____

Relación con el participante:

Domicilio:

Segundo testigo:

Nombre y apellidos:

Firma:

Fecha: _____

Relación con el participante:

Domicilio:

Investigador del estudio y/o responsable de llevar a cabo el proceso de consentimiento informado:

He explicado al (la) participante este estudio de investigación. He respondido a todas las preguntas del participante.

Nombre y apellidos:

Firma:

Fecha: _____

Matrícula o cédula o sello:

ANEXO 7

HOMA-IR

Variable	Model 1	Model 2	Model 3	Model 4
V6 Tmet	-0.442***	-0.450***	-0.336***	-0.275***
V12 Tmet	-0.408***	-0.419***	-0.374***	-0.340***
V6 Tlina+met	-0.317***	-0.306***	-0.271***	-0.268***
V12 Tlina+met	-0.389***	-0.383***	-0.292***	-0.271***
Sexo		-0.130*	-0.129*	-0.127*
Edad		-0.408	-0.346	-0.398
IMC			1.181***	0.971**
<i>Erysipelotrichaceae UCG-003</i>				-0.003
<i>Catanibacterium</i>				-0.068
<i>Butyricoccus</i>				0.001
<i>Xylanophilum group</i>				0.004
<i>Bilophila</i>				-0.057
<i>Eggerthellaceae_uncultured</i>				0.022
<i>Actinomyces</i>				-0.049
<i>Negativibacilis</i>				-0.043
<i>Mogibacterium</i>				-0.009
<i>Peptococcaceae_uncultured</i>				0.033
<i>Lachnospiraceae UCG-004</i>				0.029
<i>Granulicatella</i>				-0.026
<i>Fournierella</i>				0.002
<i>Ruminococcaceae UCG-008</i>				0.073
<i>Prevotella 6</i>				0.048
<i>Atopobium</i>				0.025
<i>Catabacter</i>				0.067
Constant	0.667***	1.435***	-0.450	-0.093
N	142	142	142	142
R²	0.248	0.287	0.344	0.388

Tabla S1. Modelo jerárquico para el Índice HOMA-IR. Todos los modelos se ajustaron por tratamientos antidiabéticos. Se seleccionó el método intro en el que se introducen todas las variables de un bloque en un solo paso. Regresión por pasos: medicamentos antidiabéticos en el modelo 1; género y edad en el modelo 2; IMC en el modelo 3 y géneros bacterianos en el modelo 4.

AIR

Variable	Model 1	Model 2	Model 3	Model 4
V6 Tmet	0.011	0.036	0.106	0.206*
V12 Tmet	0.044	0.049	0.077	0.114
V6 Tlina+met	0.202*	0.234***	0.256***	0.341***
V12 Tlina+met	0.045	0.078	0.135	0.203*
Sexo		-0.107	-0.107	-0.051
Edad		-0.813***	-0.778***	-0.776***
IMC			0.732*	0.628
<i>Erysipelotrichaceae</i> UCG-003				-0.005
<i>Catanibacterium</i>				-0.032
<i>Butyricoccus</i>				-0.034
<i>Xylanophilum</i> group				0.012
<i>Bilophila</i>				-0.057
<i>Eggerthellaceae_uncultured</i>				-0.014
<i>Actinomyces</i>				-0.019
<i>Negativibacilis</i>				0.038
<i>Mogibacterium</i>				0.063
<i>Peptococcaceae_uncultured</i>				0.000
<i>Lachnospiraceae</i> UCG-004				-0.077
<i>Granulicatella</i>				-0.033
<i>Fournierella</i>				0.070
<i>Ruminococcaceae</i> UCG-008				0.003
<i>Prevotella</i> 6				0.046
<i>Atopobium</i>				0.059
<i>Catabacter</i>				0.022
Constant	-0.132***	1.283***	0.120	0.169
N	140	140	140	140
R²	0.013	0.108	0.132	0.190

Tabla S2. Modelo jerárquico para el Índice AIR. Todos los modelos se ajustaron por tratamientos antidiabéticos. Se seleccionó el método intro en el que se introducen todas las variables de un bloque en un solo paso. Regresión por pasos: medicamentos antidiabéticos en el modelo 1; género y edad en el modelo 2; IMC en el modelo 3 y géneros bacterianos en el modelo 4.

ORAL-DI

Variable	Model 1	Model 2	Model 3	Model 4
V6 Tmet	0.298***	0.305***	0.270***	0.346***
V12 Tmet	0.249***	0.251***	0.237***	0.257***
V6 Tlina+met	0.359***	0.363***	0.352***	0.441***
V12 Tlina+met	0.252***	0.257***	0.229	0.296***
Sexo		0.010	0.010	0.065
Edad		-0.056	-0.076	-0.037
IMC			-0.361	-0.234
<i>Erysipelotrichaceae</i> UCG-003				-0.001
<i>Catanibacterium</i>				-0.018
<i>Butyricoccus</i>				-0.025
<i>Xylanophilum</i> group				0.004
<i>Bilophila</i>				-0.003
<i>Eggerthellaceae</i> _uncultured				-0.047
<i>Actinomyces</i>				-0.001
<i>Negativibacilis</i>				0.078*
<i>Mogibacterium</i>				0.089*
<i>Peptococcaceae</i> _uncultured				-0.030
<i>Lachnospiraceae</i> UCG-004				-0.092*
<i>Granulicatella</i>				0.011
<i>Fournierella</i>				0.088*
<i>Ruminococcaceae</i> UCG-008				-0.055
<i>Prevotella</i> 6				-0.015
<i>Atopobium</i>				0.040
<i>Catabacter</i>				-0.054
Constant	-1.257***	-1.173***	-0.595	0.927
N	139	139	139	139
R²	0.133	0.120	0.120	0.207

Tabla S3. Modelo jerárquico para el Índice ORAL-DI. Todos los modelos se ajustaron por tratamientos antidiabéticos. Se seleccionó el método intro en el que se introducen todas las variables de un bloque en un solo paso. Regresión por pasos: medicamentos antidiabéticos en el modelo 1; género y edad en el modelo 2; IMC en el modelo 3 y géneros bacterianos en el modelo 4.

Variable	Model 1	Model 2	Model 3	Model 4
V6 Tmet	0.298***	0.305***	0.270***	0.310***
V12 Tmet	0.249***	0.251***	0.237***	0.253***
V6 Tlina+met	0.359***	0.363***	0.352***	0.378***
V12 Tlina+met	0.252***	0.257***	0.229***	0.245***
Sexo		0.010	0.010	0.020
Edad		-0.056	-0.076	-0.058
IMC			-0.361	-0.058
<i>Fournierella</i>				-0.402
Constant	-1.257***	-1.173***	-0.595	-0.595
N	139	139	139	139
R²	0.133	0.120	0.120	0.135

Tabla S4. Modelo jerárquico para ORAL-DI. Se fijó el ajuste por fármacos antidiabéticos en todos los modelos. Se seleccionó el método intro en el que se introducen todas las variables de un bloque en un solo paso. Regresión por pasos: medicamentos antidiabéticos en el modelo 1; género y edad en el modelo 2; IMC en el modelo 3 y géneros bacterianos en el modelo 4.

Fixed effects	β	SE	p-value	95% CI	
<i>Fournierella</i>					
V0T0	0.311	0.199	0.119	-0.080	0.702
V6 Tmet	0.099	0.155	0.524	-0.205	0.402
V12 Tmet	0.079	0.158	0.618	-0.230	0.388
V6 Tlina+met	0.065	0.231	0.779	-0.387	0.517
V12 Tlina+met					
Sexo	-0.030	0.127	0.811	-0.279	0.219
Edad	-0.507	0.681	0.457	-1.842	0.828
IMC	-1.457	0.858	0.090	-3.139	0.225
Oral-DI	0.355	0.182	0.052	-0.003	0.712
N	143				

Tabla S5. Modelos lineales generalizados mixtos para el género *Fournierella*.

AUCinsgluc_OGTT

Variable	Model 1	Model 2	Model 3	Model 4
V6 Tmet	-0.098	-0.086	-0.013	0.053
V12 Tmet	-0.098	-0.102	-0.073	-0.020
V6 Tlina+met	0.020	0.033	0.056	0.106
V12 Tlina+met	0.037	0.051	0.110	0.151**
Sexo		-0.030	-0.030	-0.012
Edad		-0.301	-0.261	-0.386*
IMC			0.764**	0.618*
<i>Erysipelotrichaceae</i> UCG-003				-0.049*
<i>Catanibacterium</i>				-0.041
<i>Butyricoccus</i>				-0.021
<i>Xylanophilum</i> group				0.049*
<i>Bilophila</i>				-0.024
<i>Eggerthellaceae</i> _uncultured				0.041
<i>Actinomyces</i>				-0.024
<i>Negativibacilis</i>				0.028
<i>Mogibacterium</i>				0.017
<i>Peptococcaceae</i> _uncultured				0.001
<i>Lachnospiraceae</i> UCG-004				-0.089**
<i>Granulicatella</i>				-0.004
<i>Fournierella</i>				0.019
<i>Ruminococcaceae</i> UCG-008				0.054
<i>Prevotella</i> 6				0.058
<i>Atopobium</i>				0.038
<i>Catabacter</i>				0.042
Constant	-0.341***	0.176	-1.044*	-0.686
N	142	142	142	142
R²	0.026	0.038	0.090	0.227

Tabla S6. Modelo jerárquico para el Índice AUCinsgluc_OGTT. Todos los modelos se ajustaron por tratamientos antidiabéticos. Se seleccionó el método intro en el que se introducen todas las variables de un bloque en un solo paso. Regresión por pasos: medicamentos antidiabéticos en el modelo 1; género y edad en el modelo 2; IMC en el modelo 3 y géneros bacterianos en el modelo 4.

Variable	Model 1	Model 2	Model 3	Model 4
V6 Tmet	-0.098	-0.086	-0.013	0.005
V12 Tmet	-0.098	-0.102	-0.073	-0.070
V6 Tlina+met	0.020	0.033	0.056	0.075
V12 Tlina+met	0.037	0.051	0.110	0.112
Sexo		-0.030	-0.030	-0.020
Edad		-0.301	-0.261	-0.295
IMC			0.764***	0.797***
<i>Lachnospiraceae</i> UCG-004				-0.053*
Constant	-0.341***	0.176	-1.044*	-1.044*
N	142	142	142	142
R²	0.026	0.038	0.090	0.109

Tabla S7. Modelo jerárquico para AUCinsgluc_OGTT. Se fijó el ajuste por fármacos antidiabéticos en todos los modelos. Se seleccionó el método intro en el que se introducen todas las variables de un bloque en un solo paso. Regresión por pasos: medicamentos antidiabéticos en el modelo 1; género y edad en el modelo 2; IMC en el modelo 3 y géneros bacterianos en el modelo 4.

Fixed effects	β	SE	p-value	95% CI	
<i>Catabacter</i>					
V0T0	-0.036	0.145	0.806	-0.319	0.248
V6 Tmet	0.278	0.140	0.048	0.003	0.553
V12 Tmet	0.462	0.282	0.101	-0.090	1.014
V6 Tlina+met	0.423	0.257	0.100	-0.081	0.928
V12 Tlina+met					
Sexo	-0.157	0.148	0.177	-0.447	0.132
Edad	-0.713	0.528	0.287	-1.747	0.322
IMC	0.680	0.889	0.444	-1.062	2.421
AUCinsgluc_OGTT	0.018	0.265	0.944	-0.501	0.538
N	143				

Tabla S8. Modelos lineales generalizados mixtos para el género *Catabacter*.