



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**Cambios en la microbiota intestinal asociados con  
el desarrollo de diabetes tipo 2**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**ERANDY SALGADO VALLADARES**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DR. SAMUEL CANIZALES QUINTEROS**

**ASESORA TÉCNICA**

**M. EN C. BLANCA ESTELA LÓPEZ CONTRERAS**



**Ciudad Universitaria, Cd. Mx., Agosto de 2023**



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.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE: Profesor: Pedraza Chaverri José**

**VOCAL: Profesor: Escalante Lozada José Adelfo**

**SECRETARIO: Profesor: Canizales Quinteros Samuel**

**1er. SUPLENTE: Profesora: Morán Ramos Sofía**

**2° SUPLENTE: Profesora: León Mimila Paola Viridiana**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Unidad de Genómica de Poblaciones Aplicada a la Salud, Departamento de Biología de la Facultad de Química, UNAM en el INMEGEN  
Periférico Sur No. 4809, Col. Arenal Tepepan, Alcaldía Tlalpan, C.P. 14610,  
Ciudad de México, México.

**ASESOR DEL TEMA:**

Dr. Samuel Canizales Quinteros

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

Mtra. Blanca Estela López Contreras

**SUSTENTANTE:**

Erandy Salgado Valladares

El presente trabajo fue realizado con el financiamiento otorgado por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCyT), mediante el Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social SS/IMSS/ISSSTE-CONAHCyT (FOSISS), No. 289699.

---

## **DEDICATORIA**

A quienes nunca han dejado de creer en mí, quienes incondicionalmente me han apoyado en cada paso estando físicamente tan lejos. A quienes me han enseñado lo que es el amor leal y la fortaleza. A quienes les debo todo lo que soy:

Mamá y papá, esto es de ustedes.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi asesor, el Dr. Samuel Canizales por aceptarme en su unidad de investigación y compartirme de su conocimiento en el área. Gracias por el apoyo y la paciencia; es una fuente de inspiración para el constante crecimiento académico y profesional.

A la M. en C. Blanca Estela López, agradezco todo el tiempo dedicado para resolver mis dudas y brindarme asesoría técnica. Así como al Dr. Daniel Cerqueda, por su paciencia y colaboración para la realización de análisis bioinformáticos.

Al Dr. Hugo Villamil por su ardua labor en la coordinación de protocolos experimentales y su amabilidad para resolver cualquiera de mis dudas.

Al Dr. Rafael Velázquez, la Dra. Blanca del Río y la Dra. Sofía Morán por su apoyo al proporcionar los datos de las pacientes para el presente estudio.

A los miembros del jurado por su tiempo para revisar mi proyecto de tesis y por sus valiosas observaciones.

A la UNAM, a la Facultad de Química y la DGECI por otorgarme la Beca de Iniciación a la Investigación para realizar una estancia en Toledo, España y permitirme adquirir conocimientos invaluable que impactaron positivamente en mi tesis. Mi gratitud a la Universidad de Castilla–La Mancha por recibirme con los brazos abiertos. Gracias infinitas a la Dra. Carmen Arribas y la Dra. Cristina Pintado por toda su confianza.

A mis compañeras y compañeros del laboratorio y a cada miembro de UGPAS por brindarme sus consejos y apoyarme cada que lo necesitaba.

A mis amistades de la FQ, sin ustedes el camino no hubiera sido tan divertido.

A mi hermano, José Feliciano, por ser mi ejemplo de disciplina y trabajo constante para lograr cada meta, tú me enseñas que no hay imposibles.

A mis padres, José Salgado y Vianey Valladares. Todo mi amor y mi gratitud para ustedes siempre. Mi motivación más grande para ser fuerte y valiente, gracias por nunca soltarme y brindarme todo su apoyo de manera incondicional. Este logro es para ustedes. Los amo.

A Dios por ser siempre fiel a mis sueños. ¡Gracias!

## **Contenido**

<b>LISTADO DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>7</b>
<b>LISTADO DE TABLAS.....</b>	<b>8</b>
<b>LISTADO DE FIGURAS.....</b>	<b>9</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>10</b>
<b>ANTECEDENTES .....</b>	<b>11</b>
<b>I.    DEFINICIÓN DE LA DIABETES TIPO 2 .....</b>	<b>11</b>
<b>II.   EPIDEMIOLOGÍA DE LA PREDIABETES Y LA DT2 .....</b>	<b>11</b>
<b>III.  FISIOPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD .....</b>	<b>13</b>
<b>IV.  FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE DT2.....</b>	<b>19</b>
<b>JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>23</b>
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>23</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>23</b>
<b>METODOLOGÍA.....</b>	<b>24</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>30</b>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>41</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>55</b>

## LISTADO DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
<b>ADA</b>	Asociación Americana de Diabetes
<b>AGCC</b>	Ácidos grasos de cadena corta
<b>AGL</b>	Ácidos grasos libres
<b>AS160</b>	Sustrato de Akt de 160 kDa (Proteína activadora de Rab GTPasa)
<b>ASV</b>	Variantes de Secuencia de Amplicón
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>BCAAS</b>	Aminoácidos de cadena ramificada
<b>c-HDL</b>	Colesterol de lipoproteínas de alta densidad
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DT2</b>	Diabetes tipo 2
<b>ENSANUT</b>	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
<b>GLP-1</b>	Péptido similar al glucagon-1
<b>GLUT4</b>	Transportador de glucosa tipo 4
<b>GPx</b>	Glutación peroxidasa
<b>HbA1c</b>	Hemoglobina glicosilada
<b>IG</b>	Intolerancia a la glucosa
<b>IL-1</b>	Interleucina 1
<b>IL-10</b>	Interleucina 10
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>IMC</b>	Índice de masa corporal
<b>IRS</b>	Sustrato receptor de insulina
<b>ISR</b>	Receptor de insulina
<b>LDA</b>	Análisis de discriminante lineal
<b>LEfSe</b>	Tamaño del efecto del análisis discriminante lineal
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>MaAsLin2</b>	Modelo lineal de asociación multivariable
<b>MAPK/Ras</b>	Proteína cinasa activada por mitógeno
<b>NFkB</b>	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>OTU</b>	Unidades taxonómicas operacionales
<b>p85</b>	Posición 85
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PDK1</b>	Cinasa-1 dependiente de PIP3
<b>PERMANOVA</b>	El análisis de varianza multivariante permutacional

<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol 3-cinasa
<b>PIP2</b>	Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
<b>PIP3</b>	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
<b>PKC</b>	Proteína cinasa C
<b>pY</b>	Fosforilación
<b>QIIME 2</b>	Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2
<b>RI</b>	Resistencia a la insulina
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>rRNA</b>	Ácido ribonucleico ribosomal
<b>TG</b>	Triglicéridos
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral- $\alpha$
<b>Tyr</b>	Tirosina

## LISTADO DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Nombre de la tabla</b>	<b>Página</b>
Tabla 1	Características antropométricas, bioquímicas y dietarias de los grupos de estudio.	31
Tabla 2	Comparaciones de la diversidad beta entre los grupos de estudio.	33
Tabla 3	Géneros bacterianos enriquecidos en dos comparaciones.	38
Tabla 4	Prevalencia de géneros bacterianos asociados con diabetes.	40
Tabla suplementaria A	Géneros bacterianos que mostraron incremento diferencial en la abundancia relativa al compararse entre los grupos de estudio.	53
Tabla suplementaria B	Comparación entre estudios previos en la progresión de DT2 en población mexicana.	54

## LISTADO DE FIGURAS

Figura	Nombre de la figura	Página
Figura 1	Distribución de la prevalencia de DT2 a nivel mundial.	12
Figura 2	Mecanismo de captación de glucosa a través de GLUT4.	15
Figura 3	Resistencia a la insulina en el tejido adiposo, hepático y muscular.	17
Figura 4	Implicaciones de la microbiota intestinal en el desarrollo de la DT2.	22
Figura 5	Metodología general para la caracterización de la población de estudio.	24
Figura 6	Estimaciones de la diversidad alfa bacteriana por grupos de estudio.	32
Figura 7	Bacterias diferenciadas entre sujetos con prediabetes y el grupo control.	34
Figura 8	Bacterias diferenciadas entre sujetos con diabetes y el grupo control a distintos niveles taxonómicos.	36
Figura 9	Bacterias diferenciadas entre sujetos con diabetes y el grupo con prediabetes a distintos niveles taxonómicos.	37
Figura 10	Abundancia relativa de los géneros incrementados significativamente en los grupos Control y DT2 comparados con el grupo con prediabetes.	38
Figura 11	Comparación de géneros diferencialmente abundantes en los grupos Control y Prediabetes comparados con el grupo DT2.	39
Figura suplementaria 1	Cladograma de la microbiota representativa en la comparación entre Controles y Prediabetes.	51
Figura suplementaria 2	Cladograma de la microbiota representativa de la comparación entre Controles y DT2.	51
Figura suplementaria 3	Abundancia relativa del género <i>Akkermansia</i> estratificando por uso de metformina.	52

## **RESUMEN**

La diabetes tipo 2 es una enfermedad caracterizada por concentraciones elevadas de glucosa en sangre, debido a una deficiente secreción y/o acción de la insulina. Esta patología puede cursar con resistencia a la insulina, la cual genera una hiperinsulinemia compensatoria que puede condicionar al desarrollo de intolerancia a la glucosa. Aunque existen diversos factores genéticos y ambientales relacionados con esta enfermedad, recientemente la microbiota intestinal se ha propuesto como uno de los factores relevantes en su desarrollo. Son pocos los estudios que han evaluado los cambios en la microbiota intestinal en presencia de prediabetes y diabetes.

**Objetivo:** Identificar los cambios en la composición taxonómica de la microbiota intestinal asociados con la presencia de prediabetes y diabetes tipo 2 en un grupo de mujeres adultas mexicanas.

**Metodología:** Este estudio incluyó un grupo de 133 mujeres adultas, de las cuales 92 fueron controles, 21 con prediabetes y 20 con diagnóstico de diabetes, de las cuales se obtuvieron datos antropométricos, bioquímicos y nutrimentales. Se evaluó la composición de la microbiota intestinal con el programa QIIME2, utilizando datos de secuenciación masiva del gen rRNA 16S, generados en la plataforma Illumina MiSeq.

**Resultados:** Las mujeres con prediabetes o diabetes presentaron un índice de masa corporal mayor y concentraciones séricas de triglicéridos significativamente más altas. El análisis de la microbiota reveló una menor diversidad alfa en las personas con diabetes. Además, este grupo también tuvo una menor abundancia de los géneros *Lachnospiraceae UCG 003*, *Lactococcus* y *Coprococcus 2*, sugeridos como productores de ácidos grasos de cadena corta y relacionados con una mayor sensibilidad a la insulina. Los géneros *Akkermansia* y *Odoribacter* estuvieron disminuidos en el grupo con prediabetes, lo cual podría relacionarse con alteraciones metabólicas.

**Conclusiones:** Estos resultados evidencian una menor diversidad en la microbiota intestinal y disminución en la abundancia de géneros bacterianos productores de ácidos grasos de cadena corta en las mujeres con diabetes.

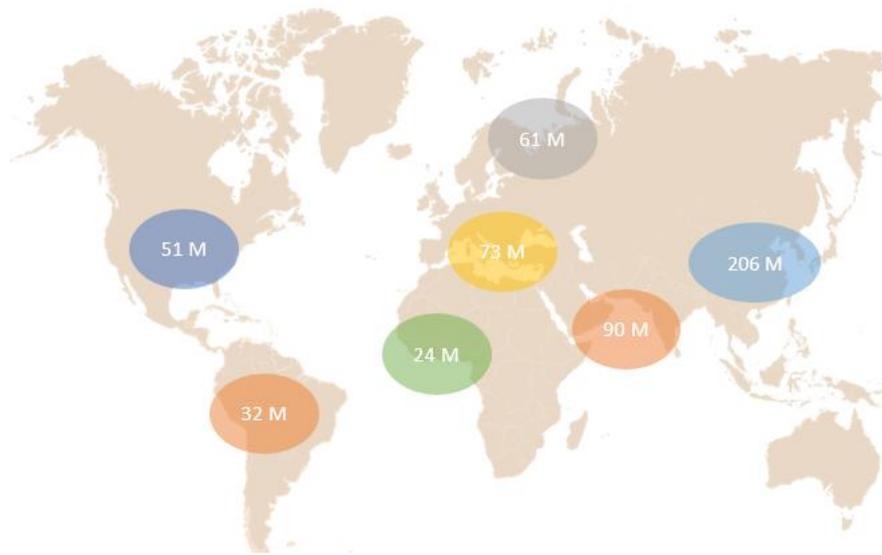
## **ANTECEDENTES**

### **I. DEFINICIÓN DE LA DIABETES TIPO 2**

De acuerdo con la Asociación Americana de Diabetes (ADA), la diabetes tipo 2 (DT2) es una enfermedad metabólica caracterizada por concentraciones elevadas de glucosa en sangre (hiperglucemia), debido a una deficiente secreción y/o acción de la insulina (ADA, 2014). Los pacientes con DT2 comúnmente presentan alteraciones en el peso corporal, acompañado por un mayor porcentaje de grasa corporal, distribuida predominantemente en la región abdominal. Los síntomas de hiperglucemia diabética incluyen poliuria, polidipsia, pérdida de peso y en ocasiones polifagia y visión borrosa (ADA, 2014). El diagnóstico de la enfermedad se basa principalmente en concentraciones de glucosa en ayuno mayores o iguales a 126 mg/dL o la presencia de hemoglobina glucosilada mayor o igual al 6.5% (ADA, 2023).

### **II. EPIDEMIOLOGÍA DE LA PREDIABETES Y LA DT2**

La DT2 se ha convertido en un problema de salud pública con impacto mundial, afectando la calidad de vida de los pacientes y conduciendo al aumento en la morbilidad y mortalidad de la población (Alotaibi et al., 2017). Diversos estudios epidemiológicos del 2021, revelaron que la DT2 fue responsable de 6.7 millones de muertes en el mundo. Durante ese periodo, 537 millones de mujeres y hombres adultos con edades entre 20 y 79 años tuvieron diabetes (Figura 1). De los cuales, la prevalencia fue mayor en hombres que en mujeres. Además, se prevé que el número de personas con DT2 en el mundo aumente a 643 millones para 2030 y 783 millones para 2045 (IDF, 2022). En América del Norte, incluido México, existen alrededor de 51 millones de personas con DT2 y se estima que este número va a aumentar a 63 millones para 2045, lo que representa un incremento de 24% y, en consecuencia, un gran reto para el sistema de salud (IDF, 2022) (Figura 1).



**Figura 1. Distribución de la prevalencia de DT2 a nivel mundial. (IDF, 2022).**

Durante las últimas dos décadas se ha observado un aumento en la prevalencia de DT2 en la población mexicana. Con base en los datos de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT), la DT2 estuvo presente en 18.3% de la población adulta de México, con una mayor incidencia a partir de los 40 años. Además, se encontró que la prevalencia de esta enfermedad considerando sujetos con y sin diagnóstico previo de DT2 fue mayor en mujeres (20.1%) que en hombres (16.3%) (Basto et al., 2023).

Aunado a ello, se ha estimado que a nivel mundial cerca de 541 millones de adultos tienen intolerancia a la glucosa (IG) definida como la capacidad alterada del organismo para utilizar la glucosa. Por ello se le considera como un estado prediabético y, en consecuencia, con alto riesgo para desarrollar la patología (IDF, 2022). De acuerdo con los datos más recientes de la ENSANUT, en México la prediabetes tiene una prevalencia total de 22.1% (Basto et al., 2023). La aparición de esta alteración tiende a ser mayor en mujeres (24.9%) a diferencia de los hombres (18.9%), y a pesar de que su incidencia aumenta con la edad, la mitad de las personas con prediabetes son menores de 50 años (Basto et al., 2023). Por ello, una proporción significativa de adultos con prediabetes son personas jóvenes. De hecho, casi un tercio de los sujetos con prediabetes (29.8%) tienen entre 20 y 39

años, por lo que el riesgo para desarrollar DT2, se prolonga por un número elevado de años (FMD, 2023).

### **III. FISIOPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD**

#### **a) Homeostasis de la glucosa**

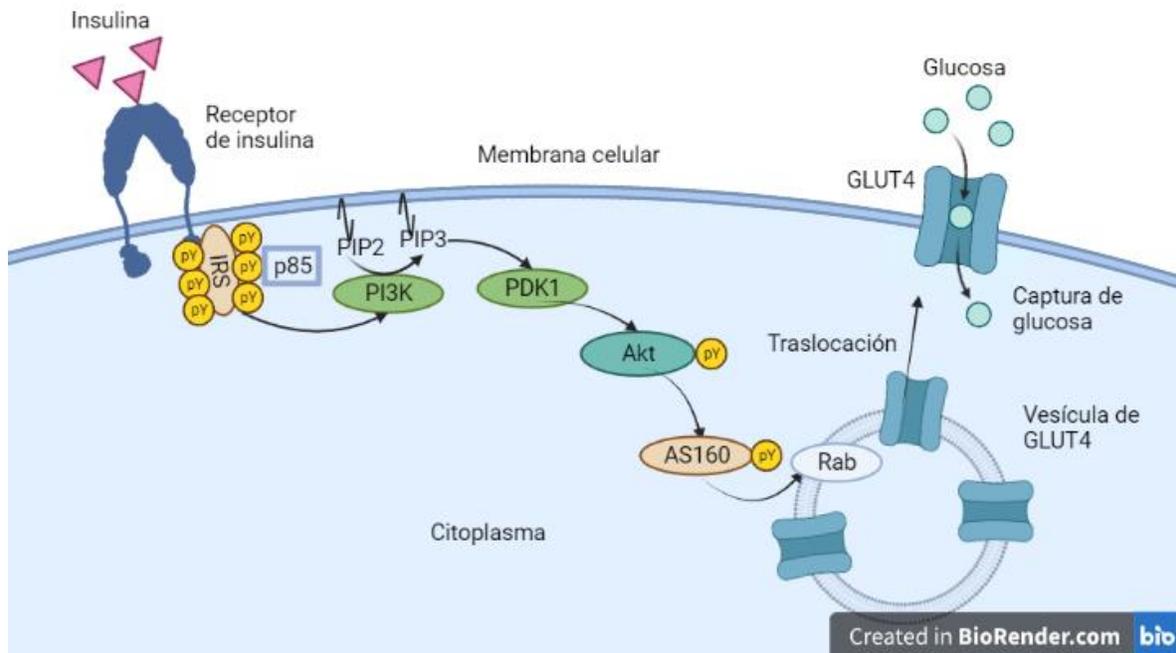
Para comprender la fisiopatología de la DT2, se debe comprender la regulación de las concentraciones de glucosa, las cuales están dadas en función de la tasa de glucosa circulante y la que es utilizada para los procesos que requieran energía (Aronoff et al., 2004). La regulación de la glucosa se realiza principalmente a través de las hormonas insulina y glucagón, las cuales se producen en el páncreas (Hantzidiamantis y Lappin, 2023). Existen tres fuentes de las que se deriva la glucosa en circulación. La primera es la absorción intestinal que ocurre durante la ingesta de alimentos, cabe mencionar que el vaciado gástrico es el principal determinante de la rapidez con la que la glucosa pasa a la circulación. La segunda fuente es la glucogenólisis hepática, durante la cual se produce energía a través de hidrólisis del glucógeno. Finalmente, la gluconeogénesis, en este proceso se obtiene glucosa durante el estado de ayuno, a partir de sustratos como el lactato y aminoácidos (Aronoff et al., 2004).

Cuando la concentración de glucosa plasmática es menor a la del rango normal durante el ayuno, la secreción del glucagón se incrementa dando como resultado un aumento en la producción de glucosa hepática y en consecuencia, la recuperación de las concentraciones de glucosa plasmática (Aronoff et al., 2004). Por otro lado, la hormona insulina tiene la función de reducir la producción de glucosa por parte del hígado, así como aumentar la captación de glucosa por el músculo esquelético y suprimir la liberación de ácidos grasos del tejido adiposo. La secreción y acción de la insulina se ven afectadas por los diversos factores que contribuyen a la patogenia de la DT2 (Stumvoll et al., 2005).

La producción de insulina se realiza en las células beta del páncreas. Primeramente, se sintetiza como pre-proinsulina, posteriormente tiene modificaciones postraduccionales en el retículo endoplásmico para producir proinsulina, la cual se transloca al aparato de Golgi, formando parte de las vesículas secretoras

inmaduras. Finalmente, esta proteína se escinde en péptido-C e insulina. almacenándose esta última en gránulos hasta que se activa su liberación (Galicia et al., 2020). La insulina es una hormona con acción en dos vías principales, la primera es la vía responsable de acciones metabólicas (PI3K/Akt), mientras que la segunda regula la expresión génica para proliferación celular (MAPK/Ras).

Para fines de este trabajo, nos enfocaremos en la vía de acciones metabólicas. El transporte de glucosa mediado por GLUT4 dependiente de insulina, se observa en las células del músculo esquelético, del tejido adiposo y del corazón (White, 2012; Satoh et al., 2014). De manera general, este proceso fisiológico está regulado a través de la unión de la insulina a las subunidades alfa de su receptor (ISR), induciendo su activación y la autofosforilación (pY) de varios residuos de tirosina (Tyr), ubicados en la subunidad beta de dicho receptor. Posteriormente, los residuos autofosforilados son reconocidos por los sustratos del receptor de insulina (IRS), principalmente IRS1 e IRS2. Dichas proteínas activan la vía del fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) iniciando una cascada de señalización, donde PI3K fosforila a fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), quien a su vez activa a la cinasa-1 dependiente de PIP3 (PDK1) y, por último, se activa la proteína cinasa Akt y la proteína cinasa C (PKC). Esta señalización da como resultado la translocación de vesículas que contienen GLUT4 a la membrana plasmática, proceso necesario para el transporte de glucosa al interior de la célula (DeFronzo et al., 2015; Gutiérrez et al., 2017) (Figura 2).



**Figura 2. Mecanismo de captación de glucosa a través de GLUT4.**

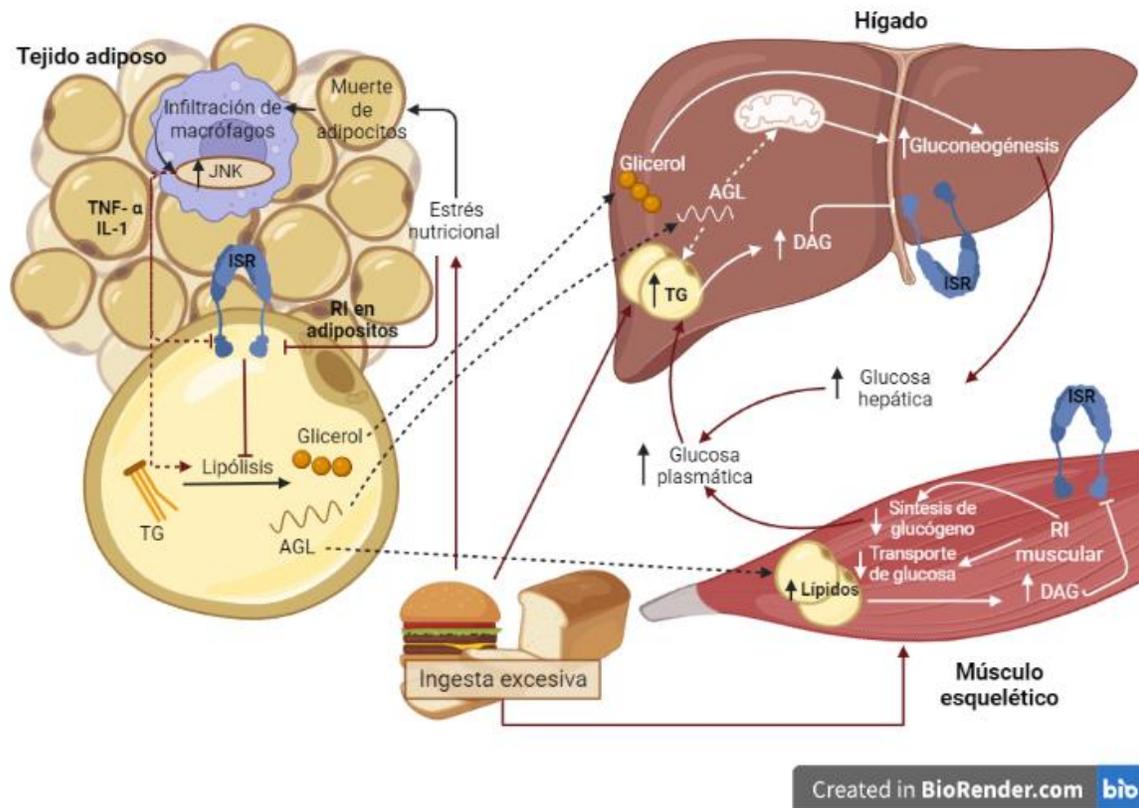
La insulina se une a su receptor (ISR), generando una cascada de señalización vía fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) a través de la unión de la subunidad en p85 (posición 85) con el sustrato receptor de insulina (IRS) para que posteriormente, el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) pase a inositol 1,4,5-trisfosfato (PIP3). A su vez, PIP3 activa a la cinasa-1 dependiente de PIP3 (PDK1). Como consecuencia, se activa la proteína cinasa Akt que se encarga de fosforilar a la proteína activadora de Rab GTPasa (AS160). Esta fosforilación inactiva a AS160 lo que resulta en la activación de la proteína Rab, un tipo de proteína G, que se encarga de la regulación del tráfico y translocación de las vesículas con transportadores GLUT4 a la membrana celular, permitiendo la captación de glucosa. Tomado y adaptado de Lankatillake y cols. (2019).

## **b) Resistencia a la insulina e Intolerancia a la glucosa**

La resistencia a la insulina (RI) es una condición patológica que se presenta cuando las células dependientes de insulina, como las del músculo esquelético o del tejido adiposo, no responden de manera adecuada a la insulina circulante (Samuel y Shulman, 2016). Estas alteraciones en la transducción de la señalización de la insulina conducen a la hiperglucemia debido a la incapacidad de las células para internalizar glucosa (Yeribeygi et al., 2018). Además, la RI en el hígado provoca el aumento del glucagón, hormona secretada en condiciones de concentraciones bajas de glucosa en la sangre. Esto conduce a un aumento de la gluconeogénesis a través de sustratos como ácidos grasos, glicerol, lactato y aminoácidos. Dicho

proceso es responsable del aumento de la tasa basal de producción de glucosa (DeFronzo et al., 2015).

La ingesta elevada y crónica de alimentos hipercalóricos promueve la RI a través de la acumulación de lípidos en el tejido muscular y hepático. Esto propicia que en el tejido adiposo se presente un aumento, de macrófagos y la producción de citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y la interleucina 1 (IL-1). Dichas citocinas pueden impactar en el incremento de ácidos grasos libres (AGL) y glicerol, a través de la lipólisis. Como se mencionó anteriormente, los AGL y el glicerol son sustratos para la gluconeogénesis, por lo que se incrementan las concentraciones de glucosa producida a través de esta ruta metabólica. Además, el aumento de AGL y glicerol también favorece la acumulación hepática de triglicéridos, propiciando la RI hepática. Si la lipólisis se mantiene de manera crónica, se promueve también la acumulación de lípidos en las células musculares; así como RI. Asimismo, la disminución de la captación de glucosa en los miocitos hace que las células del hígado tengan mayor disponibilidad de glucosa lo que favorecería la acumulación de lípidos en este tejido y con ello, la RI en el tejido hepático (Petersen y Shulman, 2018) (Figura 3).



**Figura 3. Resistencia a la insulina en el tejido adiposo, hepático y muscular.** La ingesta excesiva de alimentos hipercalóricos favorece el incremento de triglicéridos (TG) en el hígado, de lípidos en el músculo esquelético y la lipólisis y muerte de adipocitos. Se propicia la infiltración de macrófagos en los adipocitos, que activan las cinasas c-Jun N-terminal (JNK) y dan lugar al aumento de las citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 1 (IL-1), que inhiben la acción del receptor de insulina (ISR). En consecuencia, se propicia la resistencia a la insulina (RI) en adipocitos. La lipólisis es favorecida incrementando los niveles de glicerol y ácidos grasos libres (AGL). Estos son sustratos para la gluconeogénesis por lo que incrementan las concentraciones de glucosa hepática y posteriormente, de glucosa plasmática. Además, el incremento en las concentraciones lipídicas conlleva al incremento del diacilglicerol (DAG), el cual también favorece el desarrollo de RI muscular. Tomado y adaptado de Petersen y Shulman (2018).

Dado que en un estado de RI no hay una captación eficiente de glucosa, se incrementa la secreción de insulina para mantener la glucosa en concentraciones normales, este fenómeno se conoce como hiperinsulinemia. Si la RI se mantiene, las células beta pueden presentar fallas y no secretar la concentración necesaria de insulina para mantener la homeostasis de la glucosa, llevando a un estado de

intolerancia a la glucosa (IG). La presencia de IG puede deberse a la incapacidad de las células beta para detectar los cambios en las concentraciones de glucosa plasmática y responder a dicho estímulo (Goyal et al., 2022). Las personas con IG tienen un mayor riesgo de desarrollar DT2, por lo que se considera un estadio prediabético (Vega, 2023). La prediabetes se caracteriza por concentraciones de glucosa en sangre más altas de lo que se establece en sujetos normoglucémicos, pero más bajas que el punto de corte definido para el diagnóstico de diabetes (Barbu et al., 2021).

Las personas con prediabetes a menudo presentan sobrepeso, hipertrigliceridemia, RI e inflamación de bajo grado. Además, tienen un mayor riesgo no solo de desarrollar diabetes tipo 2, sino también enfermedad cardiovascular isquémica (CDC, 2022). Alrededor de 37% de los pacientes prediabéticos pueden desarrollar DT2 en un tiempo estimado de 4 años, si no reciben intervención en el estilo de vida (dieta o ejercicio) o si es necesario, tratamiento farmacológico con hipoglucemiantes (Modhumi et al., 2019).

Como se ha mencionado, la IG se caracteriza por concentraciones elevadas de glucosa en sangre. Si dichas concentraciones se mantienen altas, pueden conducir a glucotoxicidad, causando un daño potencialmente irreversible en las células beta e incrementando el riesgo de desarrollar DT2 (Robertson et al., 2004). La toxicidad de la glucosa para la célula beta puede ser explicada a partir del incremento del metabolismo de la glucosa y de los AGL en el páncreas por medio de la oxidación mitocondrial. Este proceso desencadena la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y disminuye la producción de ATP, lo cual compromete la producción de insulina y propicia el estrés del retículo endoplásmico. Para protegerse, la célula beta debe metabolizar el peróxido de hidrógeno, a través de las enzimas catalasa y glutatión peroxidasa (GPx). Sin embargo, la célula beta puede presentar niveles bajos de enzimas detoxificantes, por lo que se incrementa el riesgo de estrés oxidante (Robertson et al., 2004). Además, las ROS incrementan la actividad de NFkB, lo que induce potencialmente la apoptosis de las células beta (Stumvoll et al., 2005).

Siguiendo la historia natural comúnmente estudiada para el desarrollo de DT2, tras una primera fase de RI, se genera una hiperinsulinemia compensatoria y después de esto se presenta la disfunción de las células beta del páncreas, dando lugar a la IG y con ello un mayor riesgo para desarrollar DT2 (Solares et al., 2023).

#### **IV. FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE DT2**

Existen diferencias en la incidencia de DT2 entre mujeres y hombres, siendo estos últimos los que presentan una prevalencia mayor de DT2 (10.8%), comparada con la observada en mujeres (10.2%) (IDF, 2023). Esta diferencia puede ser explicada al menos en parte por el dimorfismo sexual, relacionado con una acumulación mayor de grasa visceral en los hombres (Gao et al., 2021). En consistencia, un estudio en adipocitos obtenidos del tejido adiposo visceral de ratones machos mostró que son menos sensibles a la insulina, requiriendo concentraciones elevadas de esta hormona para activar la vía de señalización Akt y la lipogénesis. De manera interesante, se identificó en este mismo modelo que después de la castración, la sensibilidad a la insulina y la lipogénesis se incrementaron sugiriendo la participación de las hormonas sexuales en la homeostasis de la glucosa (Macotela et al., 2009). Aunado a ello, existen evidencias de que las hormonas sexuales modulan la composición corporal, el metabolismo energético y la respuesta inflamatoria (Kautzky et al., 2016). Un estudio realizado en 2898 personas de Estados Unidos, encontró que en los hombres, la estrona, el sulfato de estrona y el estradiol estuvieron directamente relacionadas con el riesgo de diabetes, mientras que la tiroxina se asoció inversamente con el riesgo de esta enfermedad (Mather et al., 2015).

Diversos estudios han mostrado que la incidencia de DT2 varía dependiendo del origen étnico y la región geográfica, ejemplo de ello es la mayor prevalencia de esta enfermedad en la población hispana de los Estados Unidos, consistente con la alta prevalencia reportada en México (Galicia et al., 2020; Abreu et al., 2022). Aunque la predisposición genética puede contribuir al desarrollo y alta prevalencia de la diabetes en distintos grupos étnicos; son los factores modificables como una dieta hipercalórica rica en grasas saturadas y la falta de ejercicio lo que ha generado una

epidemia de DT2 (Wu et al., 2014). Así, el aumento de la prevalencia de esta patología está correlacionado con el incremento en el consumo de dietas poco saludables y estilos de vida sedentarios, aumentando el índice de masa corporal (IMC), que como ya se mencionó es un factor de riesgo para el desarrollo de RI, IG y DT2 (Mahanta et al., 2015). Es de llamar la atención que algunos estudios han presentado que el consumo de dietas no saludables está asociado con un riesgo mayor de prediabetes, principalmente en las mujeres (Siddiqui et al., 2020; Amiri et al., 2017; Mcnaughton et al., 2009).

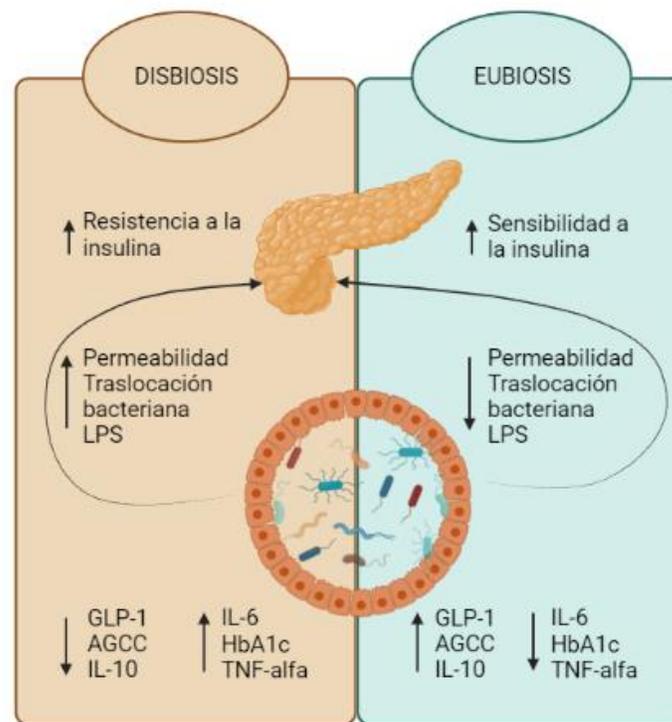
Uno de los mecanismos a través de los cuales la dieta puede impactar en el desarrollo de las alteraciones metabólicas, incluida la DT2, es la modulación de la microbiota intestinal (Scheithauer et al., 2020), la cual puede ser definida como una comunidad de microorganismos que incluye bacterias, hongos y arqueas; así como parásitos y virus, aunque la mayoría de los estudios están basados en el análisis de las bacterias presentes en el intestino (Thursby y Juge, 2017). La microbiota lleva a cabo distintas funciones indispensables para el hospedero, incluyendo la obtención y utilización de energía de la dieta y el desarrollo del sistema inmunitario. Por ello, se requiere que los microorganismos que forman parte de esta comunidad permanezcan en equilibrio (eubiosis), generando beneficios tanto para el hospedero como para los microorganismos huéspedes (Thursby y Juge, 2017). Sin embargo, la pérdida del equilibrio entre la abundancia y representación de los microorganismos (disbiosis), se ha asociado con distintas enfermedades, incluyendo metabólicas como la DT2 (Doumatey et al., 2020).

Para evaluar la causalidad de la microbiota intestinal en el desarrollo de alteraciones metabólicas, se han realizado estudios en modelos murinos libres de gérmenes. En uno de estos trabajos, se trasplantó a un ratón libre de gérmenes, la microbiota intestinal de una muestra fecal proveniente de ratones con síndrome metabólico. De manera notable, el grupo trasplantado desarrolló el fenotipo de síndrome metabólico, con las características de obesidad, hiperglucemia, RI y niveles elevados de citocinas proinflamatorias, a pesar de tener una dieta control (Vijay et al., 2010). Estos hallazgos sugieren una participación causal de la microbiota intestinal en el desarrollo de alteraciones metabólicas.

Es importante resaltar que se han identificado distintos perfiles de microbiota intestinal asociados con el desarrollo de DT2, acompañados en la mayoría de los casos por una menor diversidad de microorganismos (Chávez et al., 2020; Gaike et al., 2020; Huang et al., 2022). Diversos estudios han observado cambios en la composición de la microbiota intestinal a nivel de género, algunos de ellos como *Faecalibacterium* y *Roseburia* se han encontrado disminuidos en los pacientes con DT2. Estos géneros son productores de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), incluyendo butirato, el cual tiene propiedades benéficas para el hospedero como la modulación de la integridad de la barrera intestinal, mejora la homeostasis de la glucosa y la estimulación de las hormonas gastrointestinales relacionadas con la saciedad (Liu et al., 2018). En un estudio en un modelo murino se reportó que el butirato disminuyó la obesidad inducida por la dieta alta en grasas; así como la RI (Hong et al., 2016).

De manera interesante, el género *Akkermansia* se ha encontrado disminuido en pacientes con alteraciones en el metabolismo de carbohidratos. *Akkermansia* es una bacteria conocida por degradar la mucina del intestino y por producir metabolitos como el butirato en presencia de fibra dietaria, por lo que ha sido propuesta como un potencial probiótico, con utilidad para el tratamiento de enfermedades metabólicas (Zhang et al., 2018). De manera consistente, se ha sugerido que su abundancia está relacionada con una mejora de los trastornos metabólicos, como la endotoxemia metabólica, la RI y la IG (Hasani et al., 2021). Es de llamar la atención que la relación de la microbiota intestinal con las enfermedades metabólicas parece ser dependiente del sexo. Un estudio realizado en sujetos con síndrome metabólico, identificó una abundancia mayor de los géneros *Collinsella*, *Alistipes*, *Anaerotruncus* y *Phascolarctobacterium*, particularmente en mujeres con síndrome metabólico (Santos et al., 2018). A pesar de que los cambios taxonómicos de la microbiota intestinal pueden ser importantes en el desarrollo de la DT2 (Wu et al., 2020), la redundancia de bacterias con funciones compartidas sugiere que los productos de origen bacteriano como lipopolisacáridos (LPS) y AGCC, también son importantes en la participación de la microbiota en el desarrollo de DT2. En ratones alimentados con una dieta alta en grasas se puede inducir hasta tres veces la

producción de LPS, lo que contribuye a una inflamación de bajo grado y RI (Li et al., 2017). El aumento en la permeabilidad intestinal característico de las enfermedades metabólicas, propicia el incremento de las concentraciones circulantes de LPS generando una endotoxemia metabólica, que puede implicar un estado inflamatorio, aumento del peso, RI y eventualmente, el desarrollo de diabetes (Cani et al., 2008). La disbiosis intestinal observada en los pacientes con DT2 puede reducir la síntesis de AGCC, afectar la integridad de la barrera intestinal, la proliferación de células pancreáticas y la biosíntesis de insulina (Tan et al., 2014; Li et al., 2020) (Figura 4). Por ello cada vez resulta más relevante estudiar la participación de la microbiota intestinal en el desarrollo de enfermedades metabólicas, como la DT2.



Created in BioRender.com bio

**Figura 4. Implicaciones de la microbiota intestinal en el desarrollo de la DT2.** La homeostasis de la microbiota se conoce como eubiosis, cuando esta se altera conduce a un estado de disbiosis que impacta directamente en la disminución de la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC). Asimismo, en un estado de disbiosis se reducen las concentraciones del péptido similar al glucagón (GLP-1) que tiene un papel importante en la saciedad, la sensibilidad a la insulina y también mejora la función de barrera intestinal. Tomado y adaptado de Kawata y cols., (2019).

## **JUSTIFICACIÓN**

La microbiota intestinal es uno de los factores modificables que participan en el desarrollo de la DT2. Sin embargo, aún son pocos los trabajos que evalúan los cambios en la microbiota en distintas etapas de alteraciones del metabolismo de la glucosa, como es la presencia de prediabetes y DT2, incluyendo dos estudios previos en población mexicana (Chávez et al., 2020; Diener et al., 2021). Por ello, en este trabajo se evaluaron los cambios taxonómicos de la microbiota intestinal particularmente en mujeres con prediabetes y con DT2. Se espera que los hallazgos obtenidos sean de utilidad para construir un perfil taxonómico característico de los fenotipos de estudio.

## **HIPÓTESIS**

La microbiota intestinal de las mujeres con prediabetes o con diabetes tipo 2 presentará una menor diversidad y diferentes géneros bacterianos comparada con mujeres con normogluceemia.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Identificar las diferencias en la composición taxonómica de la microbiota intestinal asociadas con la presencia de prediabetes y DT2.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar las diferencias en el perfil antropométrico, bioquímico y dietarias de los grupos de estudio que incluyen a mujeres con normogluceemia, con prediabetes o DT2.
- Establecer y comparar la diversidad y el perfil taxonómico de la microbiota intestinal en los tres grupos de estudio.
- Identificar los géneros microbianos asociados con la DT2, diferenciados desde la prediabetes y establecer sus posibles implicaciones en la patología.

## METODOLOGÍA

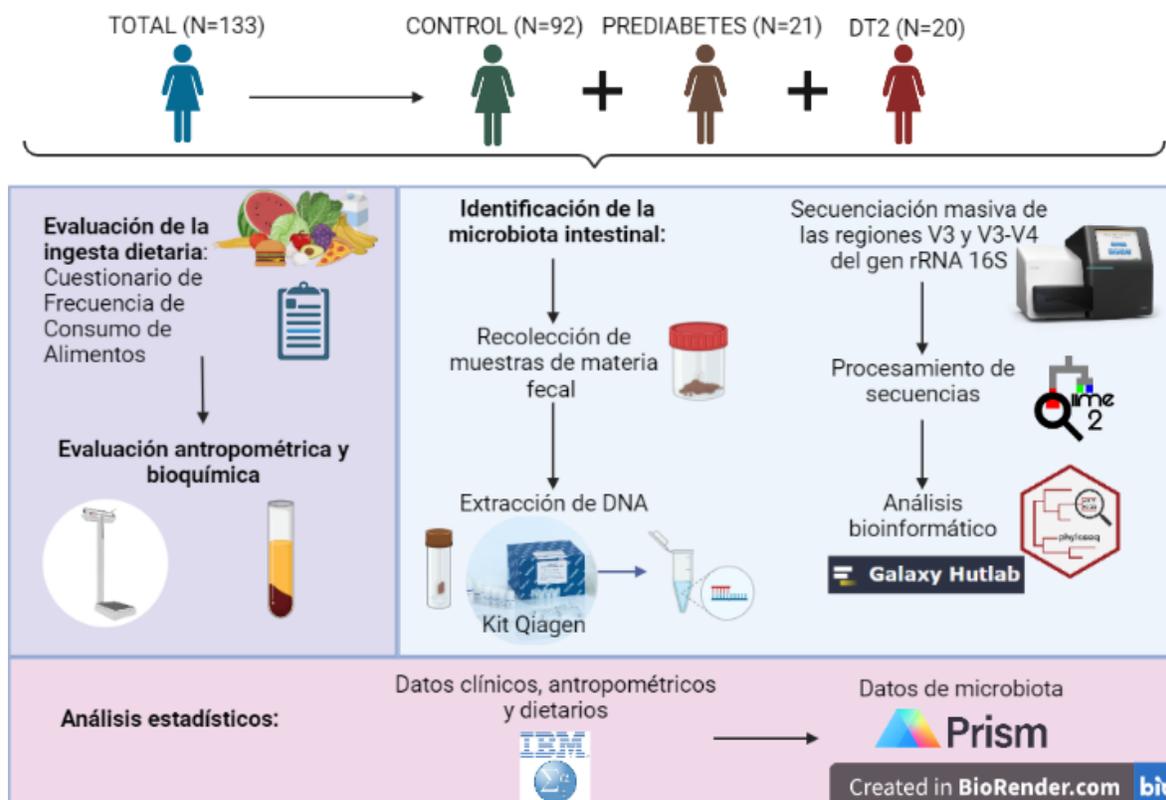


Figura 5. Metodología general para la caracterización de la población de estudio.

## **CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN**

### **1. Sujetos de estudio**

Este trabajo incluyó un grupo de 133 mujeres adultas con edades entre 37 – 88 años, las cuales forman parte de una cohorte con base poblacional de Trabajadores de la Salud del IMSS (colaboración con el Dr. Rafael Velázquez) o fueron invitadas a participar en el Hospital Infantil de México Federico Gómez, mediante una colaboración con la Dra. Blanca del Río y la Dra. Sofía Morán. Todos los sujetos aceptaron participar y firmaron un consentimiento informado, aprobado por los Comités de Ética del Instituto Nacional de Medicina Genómica, Instituto Mexicano del Seguro Social o el Hospital Infantil de México Federico Gómez. Datos de algunas de las participantes de este trabajo, fueron incluidos en Tesis previas del grupo de

investigación para evaluar la relación de la microbiota intestinal con la presencia de dislipidemia aterogénica o la ingesta de vitamina B12 (López, 2022 y Hernández, 2022; respectivamente).

## ***2. Evaluación de la ingesta dietaria***

La evaluación de la ingesta dietaria habitual se realizó mediante un cuestionario de frecuencia de consumo que incluye 116 alimentos, previamente validado para la población mexicana (Hernández, 1998).

A continuación, se presenta una breve descripción del procedimiento descrito en extenso en las Tesis de López, 2022 y Hernández, 2022. El promedio de la ingesta diaria de energía y nutrientes se calculó mediante el software del Sistema de Evaluación de Hábitos Nutricionales e Ingesta de Nutrientes. Los gramos de proteínas, carbohidratos y diferentes tipos de grasas consumidos diariamente (grasa vegetal y animal), se convirtieron en kilocalorías utilizando el factor de Atwater correspondiente (OMS, 1975). De esta forma, el consumo de cada macronutriente se expresó como porcentaje de la ingesta energética diaria. La ingesta total de fibra dietaria se presenta en gramos por 1,000 kilocalorías, para reducir la variación por las diferencias en la ingesta del contenido energético total entre individuos.

## ***3. Evaluación antropométrica y bioquímica***

El IMC se calculó dividiendo el peso en kg entre la estatura en metros elevada al cuadrado ( $m^2$ ) (OMS, 2023). La concentración sérica de glucosa, triglicéridos, colesterol total y lipoproteínas de alta densidad (c-HDL), se determinó en una muestra de sangre periférica obtenida después de 8 a 12 horas de ayuno nocturno. Para las muestras captadas como parte de la cohorte del IMSS, las determinaciones bioquímicas se realizaron mediante procedimientos enzimáticos en equipos automatizados (Denova, 2016; Morán et al., 2017).

#### **4. Recolección de muestras de materia fecal**

Debido a que la muestra de materia fecal se recolectó por cada participante en su domicilio, se le proporcionaron los materiales requeridos para ello. Las muestras se mantuvieron en una cadena de frío y una alícuota de aproximadamente 200 mg se almacenó a -70 °C, para su posterior procesamiento.

#### **5. Establecimiento de los grupos de estudio**

Las 133 mujeres participantes forman parte de un estudio con base poblacional y fueron seleccionadas de acuerdo a la disponibilidad de una muestra de materia fecal para el análisis. De estas mujeres 92 presentaron normoglucemia (controles), 21 tuvieron prediabetes y 20 con DT2. Esta distribución de casos y controles mantiene la prevalencia reportada en mujeres mexicanas (Basto et al., 2023). Cada grupo fue definido con base en la concentración de glucosa sérica (OMS, 2006): grupo control  $\leq 100$  mg/dL, grupo con prediabetes  $\geq 110$  mg/dL y  $< 126$  mg/dL y para el grupo con DT2, se consideró una concentración de glucosa  $\geq 126$  mg/dL o diagnóstico previo de la enfermedad.

A continuación, se describen los criterios utilizados:

Criterios de inclusión: Para todos los grupos se incluyeron mujeres mayores de 18 años, las cuales fueron clasificadas con base en las concentraciones séricas de glucosa previamente mencionadas para cada grupo.

Criterios de exclusión: Uso de antibióticos en los tres meses previos al estudio; así como de medicamentos hipoglucemiantes, excepto para las pacientes con DT2. Presentar concentraciones séricas de glucosa en ayuno  $>100$  mg/dL y  $<110$  mg/dL.

Criterios de eliminación: Ingesta energética diaria menor a 500 kcal o mayor a 5,000 kcal; así como haber obtenido un número  $<10,000$  de lecturas en la secuenciación de la región analizada del gen rRNA 16S.

## **CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA BACTERIANA INTESTINAL**

### **1. Extracción de DNA de la muestra de materia fecal**

Para homogeneizar las muestras de materia fecal se realizó un procedimiento inicial de lisis mecánica en el equipo FastPrep (MP Biomedicals). Para la obtención de DNA de las muestras de materia fecal se utilizaron dos estuches comerciales, ambos fabricados por la empresa Qiagen Inc.: *DNA Stool Mini Kit* para las participantes del Hospital Infantil de México y *Power Fecal Kit* para la cohorte de Trabajadoras del IMSS. El procedimiento completo se encuentra descrito en el Anexo A. El DNA obtenido se eluyó en 200  $\mu$ L de agua grado biología molecular y su concentración se determinó por espectrofotometría con el instrumento Nanodrop 2000c (Thermo Fisher). Las alícuotas de DNA se almacenaron a -20 °C hasta su posterior utilización.

### **2. Secuenciación del gen rRNA 16S**

Como se describe en un trabajo de Tesis de Maestría de López, 2022, se evaluaron las regiones variables V4 y V3-V4 del gen rRNA 16S, debido a que la población de este trabajo pertenece a dos estudios previos que se realizaron en distintas fechas. Sin embargo, para descartar sesgos atribuibles a la región secuenciada, se compararon datos de secuenciación para las dos regiones V3-V4 y para la región V4. En dicha comparación no se observaron diferencias significativas en los análisis de diversidad y taxonomía, por lo que se decidió trabajar solamente con la región V4 con el objetivo de que todas las muestras fueran comparables. Para la amplificación de la región hipervariable V4 se usaron los oligonucleótidos 515F y 806R (López, 2022) en la población de trabajadoras del IMSS. Con este procedimiento se analizaron las muestras de 84 mujeres controles, 14 con prediabetes y 14 con DT2. Adicionalmente, en la población captada del Hospital Infantil de México, el DNA de la muestra fecal de 8 mujeres controles, 7 con prediabetes y 6 con DT2, se amplificó usando oligonucleótidos para la región V3-V4 del gen rRNA 16S, siguiendo el protocolo para la preparación de bibliotecas de Illumina (Illumina, 2013). En ambos procedimientos se realizó la amplificación por PCR con 100 ng de DNA, pero utilizando los diferentes oligonucleótidos

mencionados. La presencia y tamaño de los amplificadores fue corroborada mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Las bibliotecas resultantes fueron purificadas con perlas Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter) y su concentración se determinó en un fluorómetro Qubit 2.0 (Invitrogen). Posteriormente, se realizó una mezcla equimolar con todos los amplicones. La secuenciación se realizó en la Unidad de Secuenciación del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) con la plataforma MiSeq (Illumina).

### **3. Procesamiento de secuencias del gen rRNA 16s**

El procesamiento de secuencias se realizó como se describió previamente en la Tesis de López, (2022) y de Hernández, (2022), utilizando el programa QIIME2 (Bolyen et al., 2019). Para los análisis bioinformáticos se utilizó únicamente la secuencia de 220 pares de bases de la región V4 compartida en los dos ensayos de amplificación realizados.

Previo a la obtención de las Variantes de Secuencia de Amplicón (ASV) se corrigieron los errores de secuenciación con el complemento DADA2 (Callahan, 2016). Posteriormente, las ASV se agruparon en unidades taxonómicas operativas (OTU) con una identidad del 97 %, utilizando como referencia la base de datos SILVA (v.132). Finalmente, las muestras se estandarizaron por rarefacción a una profundidad de 10, 000 lecturas de alta calidad.

### **4. Procesamiento de datos**

#### **a. Análisis bioinformático**

La tabla de abundancia de OTUs y el árbol de filogenia se exportaron a la plataforma de RStudio (v. 4.1.1), utilizando el paquete Phyloseq (v1.38.0) (McMurdie y Holmes, 2013). Para estimar la riqueza de géneros microbianos se realizaron determinaciones de la diversidad alfa, la cual indica el número de especies diferentes encontradas en una comunidad. Se evaluaron los índices de diversidad alfa más utilizados, incluyendo el número de OTUs observadas, el índice Chao1 que indica la riqueza de especies encontradas en una muestra, el índice Shannon y el

índice de Simpson, que consideran tanto la riqueza como la abundancia de especies microbianas (Kim et al., 2017)

En cuanto a la estimación de la diversidad beta, se utilizaron métricas de distancia UniFrac ponderadas y no ponderadas. La diversidad beta determina la heterogeneidad considerada a través del cambio en la diversidad de especies entre dos comunidades (Ferriol y Merle, 2012). El análisis de varianza multivariante permutacional (PERMANOVA) fue usado para probar las diferencias en la diversidad beta entre grupos, usando el paquete Vegan (v2.5.7) y aplicando la función adonis con 9999 permutaciones (Oksanen, 2023).

Para evaluar las diferencias en la composición microbiana a nivel de género entre los casos con DT2, prediabetes y las mujeres controles, se realizó un análisis del tamaño del efecto del discriminante lineal (LefSe), mediante el servidor en línea de Galaxy Hutlab (Segata et al., 2011). Este análisis permite obtener el tamaño del efecto; una puntuación del análisis discriminante lineal (LDA) mayor a 2.0 y un valor de  $p < 0.05$  se consideró estadísticamente significativo. El efecto confusor del IMC sobre la asociación de la abundancia relativa de géneros bacterianos con la presencia de IG o DT2, se evaluó mediante un modelo lineal de asociación multivariable (MaAsLin2; Rahnavard et al., 2021).

## **b. Análisis estadísticos**

Para la comparación de las características de los grupos de estudio (datos clínicos, antropométricos y dietarios) se utilizó el programa estadístico SPSS v.24.0 (IBM Corp., 2016). La normalidad en la distribución de los datos se evaluó con las pruebas de Kolmogorov-Smirnov o Shapiro-Wilk. Para aquellos parámetros que no mostraron una distribución normal, se utilizaron las pruebas no paramétricas de U de Mann-Whitney para comparar dos muestras independientes o la prueba de Kruskal Wallis para comparar tres grupos. Las pruebas aplicadas a datos con distribución normal fueron t-Student y la prueba ANOVA (post hoc de Tukey para los datos con varianzas iguales y T3 de Dunnet para los datos que no presentaron varianzas iguales). El valor para establecer diferencias significativas fue  $p < 0.05$ .

## RESULTADOS

### **1. Características antropométricas, bioquímicas y nutricionales**

El estudio incluyó 133 mujeres adultas, de las cuales 92 fueron controles normoglucémicos, 21 con prediabetes y 20 con DT2 (Tabla 1). Las mujeres con prediabetes o DT2 mostraron un IMC y concentraciones de triglicéridos significativamente mayores que los observados en las mujeres controles. Debido a que el uso de metformina fue un criterio de exclusión para los grupos control y con prediabetes, solamente el grupo de DT2 presentó el uso de este hipoglucemiante (45%).

Aunque no se observaron diferencias significativas en el consumo de macronutrientes, la ingesta de fibra dietaria fue mayor en mujeres con DT2, comparada con los grupos control y prediabetes; aunque sin alcanzar diferencias significativas ( $p=0.077$ ).

**Tabla 1. Características antropométricas, bioquímicas y dietarias de los grupos de estudio.**

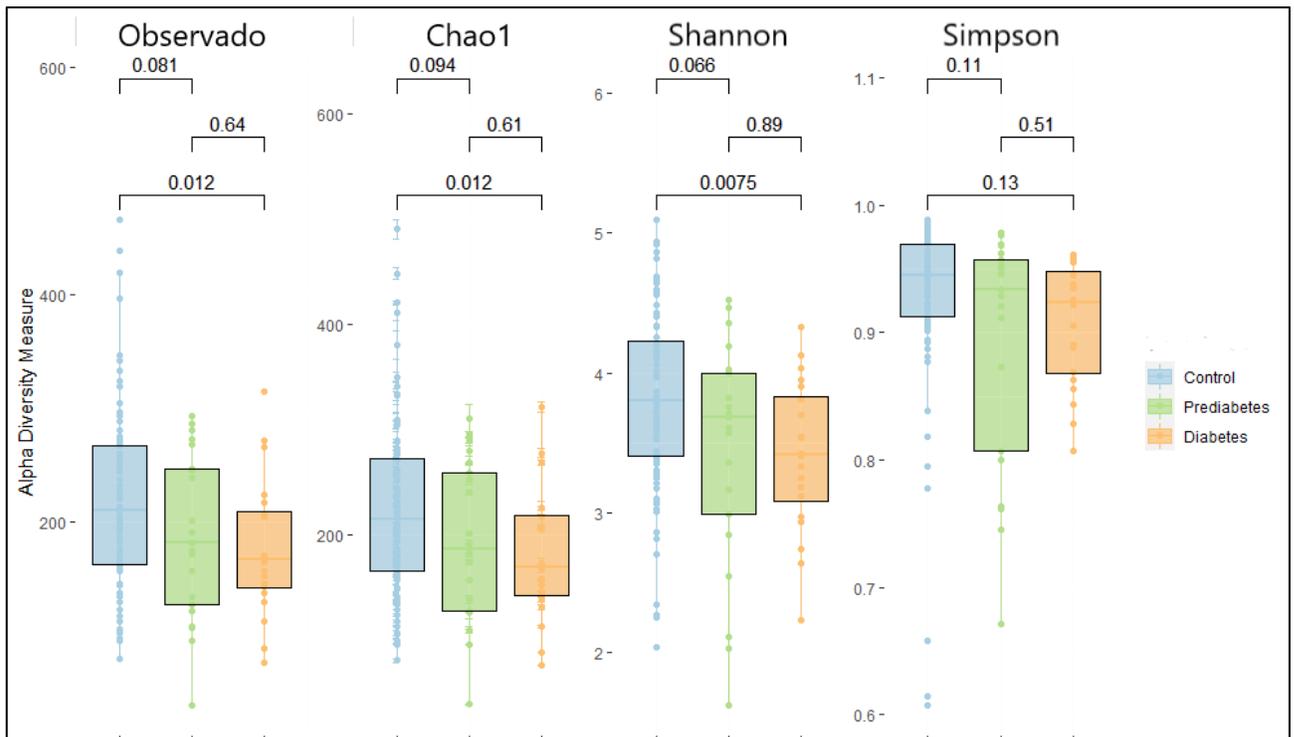
Parámetros	Total [n=133]	Control [n=92]	Prediabetes [n=21]	Diabetes tipo 2 [n=20]	p
Edad (años)	60.4 ± 10.9	59.7 ± 10.7	62 ± 11.9	61.8 ± 11	0.569
Peso (Kg)	62.6 (54 – 73.1)	59.1 (51.6 – 68.3) <sup>a</sup>	75.8 (63.9 – 86.5) <sup>b</sup>	70.4 (61.1 – 89.9) <sup>b</sup>	<0.001
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	26.6 (23.2 – 30.4)	25.4 (22.9 – 27.5) <sup>a</sup>	31.1 (28.2 – 36.8) <sup>b</sup>	32.5 (23.6 – 36.7) <sup>b</sup>	<0.001
Glucosa (mg/dL)	95 (88 – 110)	91.5 (86 – 96) <sup>a</sup>	117 (111 – 120) <sup>b</sup>	151 (104 – 211) <sup>b</sup>	<0.001
Colesterol total (mg/dL)	200 (174 – 225)	204 (178.5 – 224.8)	190 (153.5 – 251)	194 (167.8 – 221)	0.628
Triglicéridos (mg/dL)	138 (105 – 195)	133 (102.3 – 179) <sup>a</sup>	175 (126.5 – 209) <sup>b</sup>	166.5 (125 – 226.5) <sup>b</sup>	0.021
C-HDL (mg/dL)	51.2 (42.6 – 60.5)	52.1 (44.6 – 61)	48.7 (36.9 – 63)	48.1 (42.5 – 56.6)	0.275
Metformina n(%)	9 (6.8%)	0 (0%) <sup>a</sup>	0 (0%) <sup>a</sup>	9 (45%) <sup>b</sup>	<0.001
Kcal (kcal/día)	1539.8 (1211.1 – 1997.3)	1520 (1188.8 – 1873.6)	1607 (1034.1 – 2146.5)	1689 (1373 – 2128.3)	0.434
Carbohidratos (%/día)	64.3 (59.2 – 69.2)	64.9 (59.8 – 69.2)	62.3 (59.1 – 66.4)	63.3 (57.6 – 71.1)	0.495
Fibra dietaria (g/1000 kcal)	15.5 (12.6 – 19.3)	15.6 (12.7 – 19.1)	15.3 (11.9 – 17.7)	16.4 (13 – 22.1)	0.077
Proteína (%/día)	13.1 (11.4 – 14.7)	13.1 (11.4 – 14.8)	13.1 (11.6 – 14.9)	13 (10.4 – 14.5)	0.585
Grasa animal (%/día)	11.4 (8.9 – 15.6)	11.2 (8.9 – 15.6)	13.6 (10.9 – 18.0)	10.4 (5.7 – 15.1)	0.156
Grasa vegetal (%/día)	10.1 (7.8 – 12.6)	9.8 (7.7 – 12.4)	10 (7.3 – 13.8)	12 (9.2 – 13.3)	0.116

Los valores con distribución normal son presentados como la Media ± Desviación Estándar (DE), mientras que los que no presentan esta distribución se reportan como mediana (Rango intercuartil). Las letras compartidas de los superíndices o la ausencia de las mismas, indican que no hubo diferencias significativas entre pares de grupos.

## 2. Análisis de Diversidad de la Comunidad Bacteriana

La riqueza microbiana se estimó a través de la diversidad alfa, mediante el número de OTUs observado y los índices de Shannon, Chao1 y Simpson. De manera interesante, la diversidad microbiana disminuyó en presencia de prediabetes y DT2, aunque esta disminución solo fue significativa para las OTUs observadas y los índices de diversidad de Chao1 y Shannon, al comparar las mujeres con DT2 con el grupo control (Figura 6).

En contraste, el análisis ponderado y no ponderado para estimar la diversidad beta, no presentó diferencias significativas al comparar los tres grupos de estudio (Tabla 2).



**Figura 6. Estimaciones de la diversidad alfa bacteriana por grupos de estudio.** En la parte superior se presentan los índices de diversidad y los valores de  $p$  para las distintas comparaciones.

**Tabla 2. Comparaciones de la diversidad beta entre los grupos de estudio.**

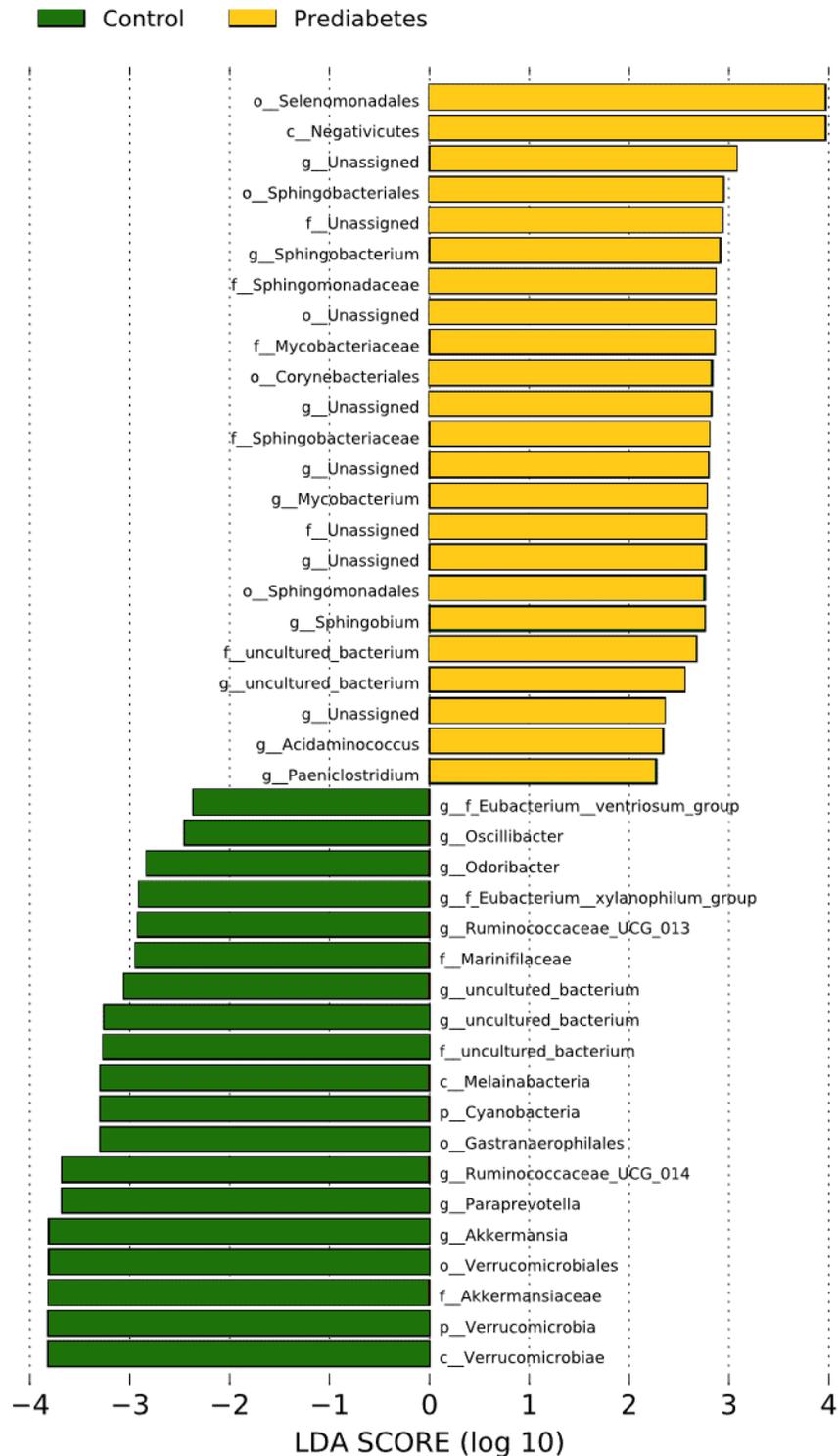
Comparación	Análisis	R <sup>2</sup>	p
Control- Prediabetes	Ponderado	0.1632	0.0631
	No Ponderado	0.1091	0.2660
Control- Diabetes	Ponderado	0.1920	0.0728
	No Ponderado	0.0970	0.3122
Prediabetes- Diabetes	Ponderado	0.1705	0.0699
	No Ponderado	0.0952	0.3671

Se consideró un resultado significativo cuando  $p < 0.05$  mediante un PERMANOVA.

### **3. Géneros de la microbiota intestinal enriquecidos en los distintos grupos de estudio**

#### **3.1 Comparación entre el grupo con prediabetes y controles**

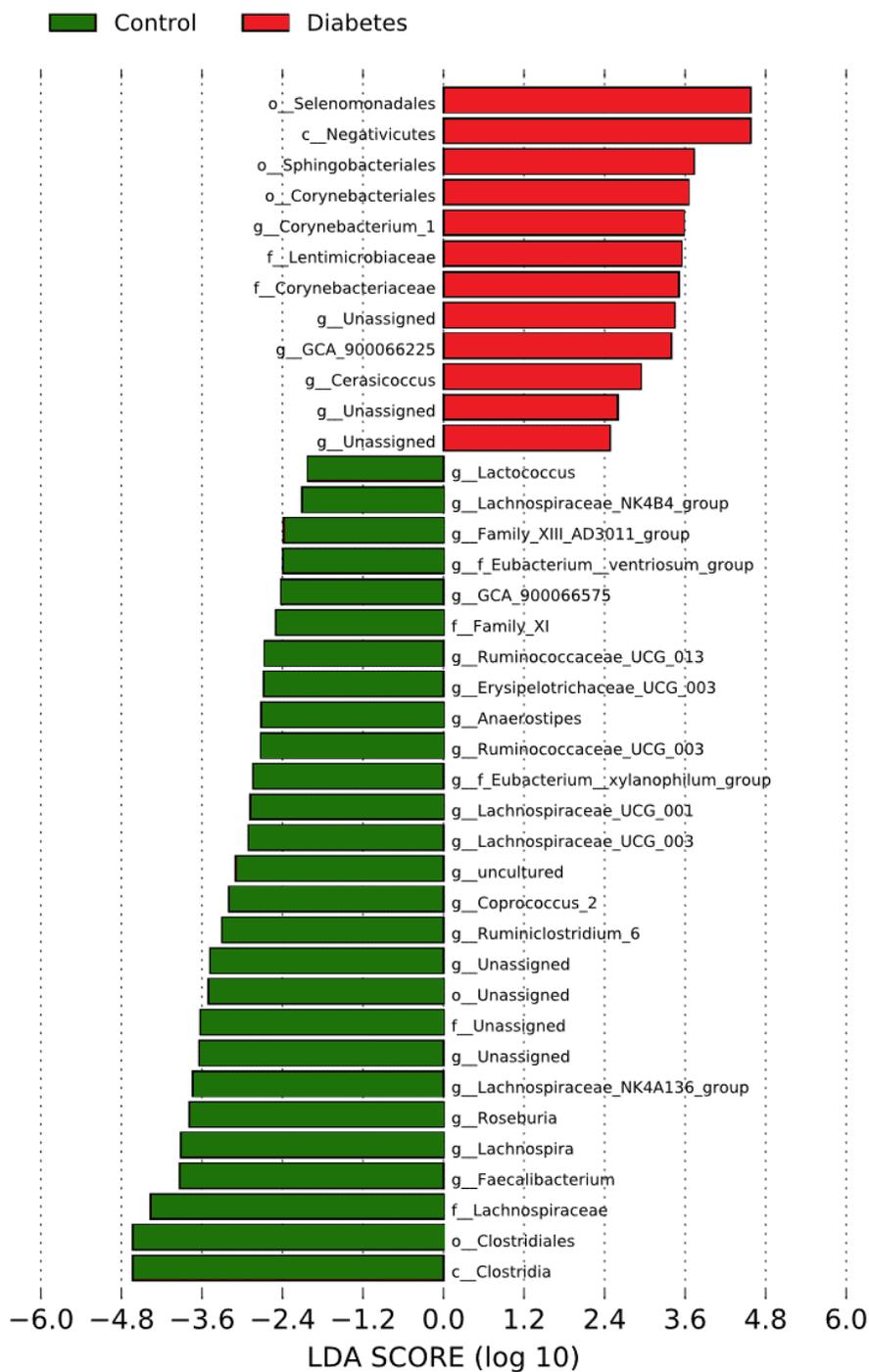
La comparación en el análisis de LEfSe entre los grupos control y prediabetes permitió identificar 13 géneros con un puntaje LDA  $\geq 2$ , de los cuales *Sphingobium*, *Sphingobacterium*, *Mycobacterium*, *Acidaminococcus* y *Paenoclostridium* se encontraron incrementados en las mujeres con prediabetes; mientras que los géneros aumentados en los controles fueron *Eubacterium ventriosum group*, *Oscillibacter*, *Odoribacter*, *Eubacterium xylanophilum group*, *Ruminococcaceae UCG 013*, *Paraprevotella*, *Ruminococcaceae UCG 014* y *Akkermansia* (Figura 7). Además, la abundancia de los distintos niveles taxonómicos a los que pertenece el género *Akkermansia* (phyla *Verrucromicrobia*), también presentaron un incremento en las mujeres con normoglucesmia (Figura suplementaria 1).



**Figura 7. Bacterias diferenciadas entre sujetos con prediabetes y el grupo control a distintos niveles taxonómicos.** Etiquetas de la clasificación taxonómica: p=phylum, c=clase, o=orden, f=familia, g=género. LDA=Análisis discriminante lineal.

### **3.2 Comparación entre el grupo con diabetes y controles**

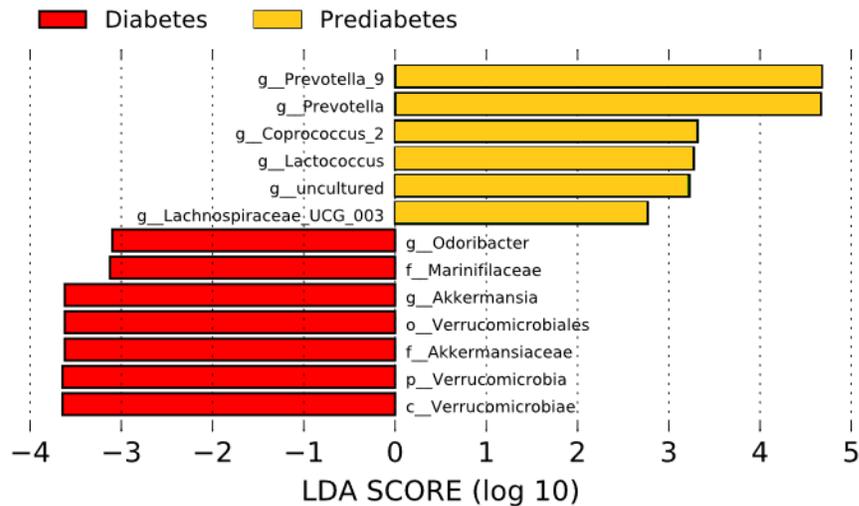
La comparación taxonómica entre el grupo de mujeres con DT2 y controles normoglucémicos identificó 20 géneros con una abundancia relativa incrementada ( $LDA \geq 2$ ). De estos, *GCA\_900066225* y *Corynebacterium 1*, del phylum *Corinebacteria*; así como *Cerasicoccus*, perteneciente al phylum *Verrucomicrobia*, fueron los únicos géneros que se encontraron aumentados en el grupo con DT2, mientras que en las mujeres del grupo control se observó un incremento en 17 géneros del phylum *Firmicutes*: *Lachnospiraceae NK4B4 group*, *Family XIII AD3011 group*, *Eubacterium ventriosum group*, *Ruminococaceae UCG 013*, *Anaerostipes*, *Ruminococaceae UCG 003*, *Eubacterium xylanophilum group*, *Lachnospiraceae UCG 001*, *Lachnospiraceae UCG 003*, *Coprococcus2*, *Ruminoclostridium 6*, *Lachnospiraceae NK4A136*, *Roseburia*, *Faecalibacterium*, *Lachnospira*, *Lactococcus* y *Erysipelotrichaceae UCG 003* (Figura 8). De manera interesante, estos dos últimos géneros fueron los únicos que no pertenecieron al orden *Clostridiales* (Figura suplementaria 2).



**Figura 8. Bacterias diferenciadas entre sujetos con diabetes y el grupo control a distintos niveles taxonómicos.** Etiquetas de la clasificación taxonómica: p=phylum, c=clase, o=orden, f=familia, g=género. LDA= Análisis discriminante lineal.

### 3.3 Comparación entre el grupo con prediabetes y DT2

La comparación de la microbiota entre mujeres con prediabetes y con DT2 identificó siete géneros diferenciados. En las mujeres con prediabetes se encontró un incremento en los géneros *Prevotella 9*, *Prevotella*, *Coprococcus 2*, *Lactococcus* y *Lachnospiraceae UCG 003*, mientras que las mujeres con DT2 presentaron aumentados *Odoribacter* y *Akkermansia*. De manera interesante, al igual que en la comparación del grupo control con prediabetes, se observó un aumento en los distintos niveles taxonómicos a los que pertenece *Akkermansia* (phylum *Verrucomicrobia*, clase *Verrucomicrobiae*, orden *Verrucomicrobiales* y familia *Akkermansiaceae*) (Figura 9).



**Figura 9. Bacterias diferenciadas entre sujetos con diabetes y el grupo con prediabetes a distintos niveles taxonómicos.** Etiquetas de la clasificación taxonómica: p=phylum, c=clase, o=orden, f=familia, g=género. LDA= Análisis discriminante lineal.

#### 4. Géneros bacterianos incrementados en al menos dos grupos de estudio

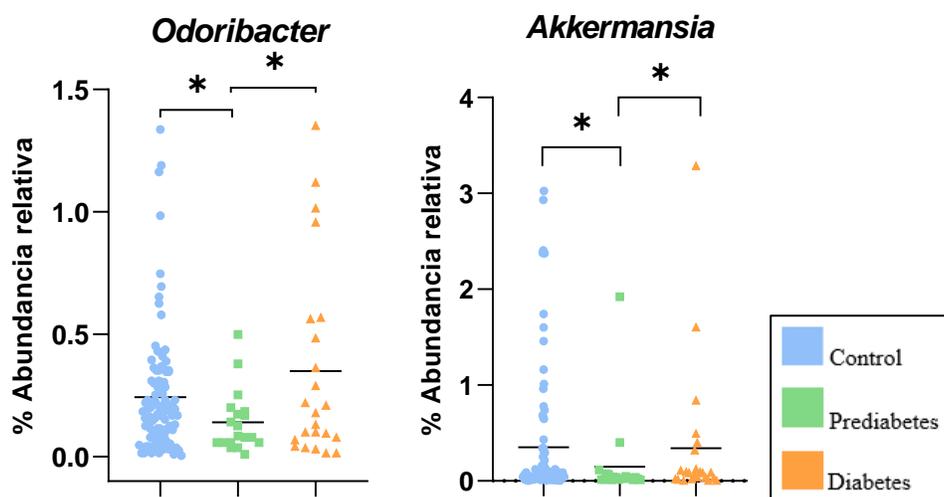
De los 32 géneros identificados en los comparativos entre los tres grupos de estudios (Tabla suplementaria A), 5 se encontraron significativamente diferenciados en más de una comparación en el análisis de LEfSe: *Lactococcus*, *Coprococcus2*, *Lachnospiraceae UCG 003*, *Akkermansia* y *Odoribacter* (Tabla 3).

**Tabla 3. Géneros bacterianos enriquecidos en dos comparaciones.**

GÉNERO	CONTROL	PREDIABETES	DIABETES
<i>Lactococcus</i>	↑ (vs. DT2)	↑ (vs. DT2)	
<i>Lachnospiraceae UCG 003</i>	↑ (vs. DT2)	↑ (vs. DT2)	
<i>Coprococcus 2</i>	↑ (vs. DT2)	↑ (vs. DT2)	
<i>Odoribacter</i>	↑ (vs. Prediabetes)		↑ (vs. Prediabetes)
<i>Akkermansia</i>	↑ (vs. Prediabetes)		↑ (vs. Prediabetes)

↑: La flecha indica el género incrementado y dentro del paréntesis se indica el grupo con el que se comparó.

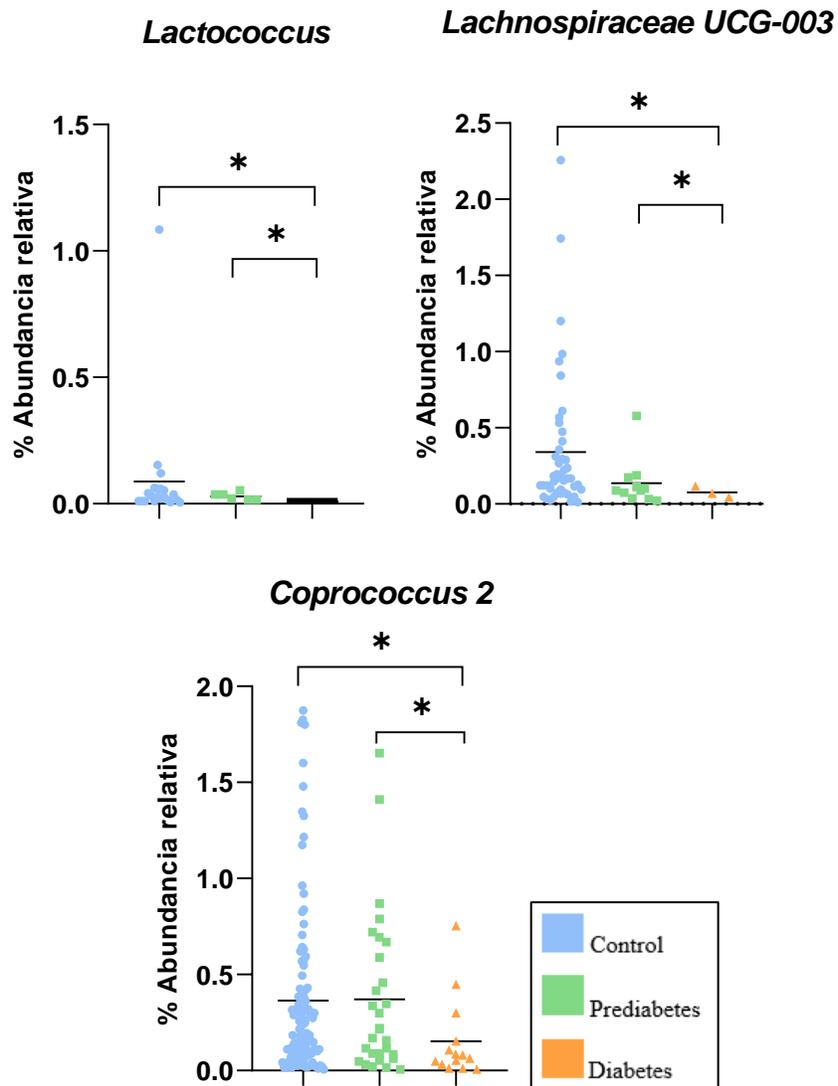
Los géneros *Akkermansia* y *Odoribacter* tuvieron un comportamiento similar, mostrando una abundancia relativa significativamente mayor en el grupo control y en el de mujeres con DT2, comparados con el grupo con prediabetes (Figura 10).



**Figura 10. Abundancia relativa de los géneros incrementados significativamente en los grupos Control y DT2 comparados con el grupo con prediabetes.** En el gráfico se presentan las medianas y los rangos intercuartiles de las abundancias relativas de los géneros bacterianos correspondientes.

(\*) = Diferencia significativa en la comparación entre dos grupos de estudio.

Por otro lado, los géneros *Lactococcus*, *Lachnospiraceae UCG 003* y *Coprococcus 2* fueron significativamente más abundantes en mujeres control y con prediabetes, en comparación con el grupo con DT2 (Figura 11).



**Figura 11. Comparación de géneros diferencialmente abundantes en los grupos Control y Prediabetes comparados con el grupo DT2.**

En el gráfico se presentan las medianas y los rangos intercuartiles de las abundancias relativas de los géneros bacterianos correspondientes.

(\*)= Diferencia significativa en la comparación entre dos grupos de estudio.

Debido a que el grupo control presentó un IMC significativamente menor respecto a los grupos con prediabetes y DT2, se decidió ajustar los resultados para esta variable. De manera notable, solo el enriquecimiento de *Odoribacter* y *Akkermansia* permaneció significativo después de ajustar para el IMC (comparación controles contra prediabetes,  $p < 0.05$ ), sugiriendo que la asociación de los otros géneros bacterianos con la prediabetes y/o la diabetes está mediada por el IMC.

Es de llamar la atención que, de los 5 géneros descritos anteriormente, *Lachnospiraceae UCG 003* y *Lactococcus* estuvieron presentes en menos del 50% del total de las mujeres incluidas en el estudio (39.8 y 18.8%, respectivamente). Debido a la baja frecuencia de estos géneros y a su enriquecimiento en los grupos control y prediabetes al compararlos con DT2, se evaluó si la ausencia de *Lachnospiraceae UCG 003* y *Lactococcus* estaba asociada con la DT2, encontrando que la presencia de estas bacterias fue significativamente menor en el grupo con diabetes. De manera interesante, *Lactococcus* estuvo ausente en el 100% de las mujeres con esta enfermedad (Tabla 4).

**Tabla 4. Prevalencia de géneros bacterianos asociados con diabetes.**

Género	Control (n=92)		Prediabetes (n=21)		Diabetes (n=20)		Valor-p		
	P/A	%P	P/A	%P	P/A	%P	Control-Prediabetes	Control-DT2	Prediabetes-DT2
<i>Lactococcus</i>	20/72	21.7%	5/16	23.8%	0/20	0%	1	0.021	0.048
<i>Lachnospiraceae UCG 003</i>	41/51	44.6%	9/12	42.9%	3/17	15%	1	0.021	0.085

P=Presencia; A=Ausencia; (%P) Porcentaje de personas con presencia del género bacteriano.

## DISCUSIÓN

La DT2 es una enfermedad metabólica influenciada por diferentes factores genéticos y ambientales (DeFronzo et al., 2015). Dentro de estos últimos, el estudio de la microbiota intestinal ha cobrado relevancia en los últimos años. Por ello, diversos estudios realizados principalmente en poblaciones de origen europeo, han evaluado los cambios que se presentan en la composición microbiana en presencia de alteraciones en el metabolismo de carbohidratos (Ruuskanen et al., 2022; Wu et al., 2020; Pedersen et al., 2016). Aunque estos estudios no han reportado un perfil taxonómico compartido, sí han mostrado un alto grado de redundancia funcional (presencia de bacterias de diferentes géneros que realizan la misma función). Por ejemplo, diversos trabajos han reportado el incremento en bacterias patógenas oportunistas en personas con DT2 (Lambeth et al., 2015; Qin et al., 2012); así como la disminución de distintos géneros de bacterias productoras de butirato (Forslund et al. 2015; Zhang et al., 2018; Sedighi et al., 2017). Sin embargo, aún son pocos los trabajos que han evaluado la microbiota intestinal relacionada con la progresión de la DT2 en población mexicana (Chávez et al., 2020; Diener et al., 2021), por lo que estudios como el presentado en esta tesis podrían contribuir a evaluar si existe un perfil compartido de microbiota intestinal en mujeres mexicanas con DT2.

En el presente trabajo se encontraron diferencias significativas en el IMC y las concentraciones séricas de triglicéridos (TG), observando valores incrementados en estos parámetros en mujeres con prediabetes y DT2, respecto al grupo control. Existen reportes que establecen que el aumento en las concentraciones de triglicéridos, así como el sobrepeso y la obesidad son factores de riesgo para desarrollar DT2 (DeFronzo et al., 2015). El aumento en el tejido adiposo altera el metabolismo de la glucosa mediante la liberación de adipocinas, factores proinflamatorios, ROS y AGL (Klein et al., 2021; Ahmed et al., 2021). Asimismo, diversos estudios han reportado que el incremento en las concentraciones de TG está relacionado con el desarrollo de RI (Kang et al., 2017; Ahmad et al., 2017). Además, en nuestro estudio, ambos grupos (prediabetes y DT2) mostraron concentraciones de TG elevados y concentraciones bajas de c-HDL, comparados

con el grupo control, aunque sin alcanzar diferencias significativas. Estas alteraciones lipídicas son características de la dislipidemia aterogénica, descrita como un desorden en el que se presentan concentraciones anormales de lípidos y/o lipoproteínas en circulación (López, 2022).

En este estudio también se identificaron cambios en la microbiota asociados con la presencia de prediabetes y DT2. De manera interesante, los sujetos con DT2 presentaron una disminución en la diversidad alfa, comparados con los sujetos con prediabetes o con normoglucemia, aunque solo la comparación con este último fue significativa. Dicho comportamiento es consistente con estudios realizados en diversas poblaciones (Wu et al., 2020; Huang et al., 2022), incluyendo un estudio previo en población mexicana (Chávez et al., 2020). Es de llamar la atención, que en el presente estudio la disminución de la diversidad alfa se observó desde prediabetes, mientras que en el estudio de Chávez y cols, (2020) realizado también en población mexicana, los sujetos con prediabetes no presentaron disminución en la diversidad. Esta aparente inconsistencia podría deberse al uso de diferentes definiciones de prediabetes y diferencias en adiposidad. En nuestro trabajo se incluyeron sujetos con prediabetes que tuvieron concentraciones de glucosa entre 110 y 125 mg/dL (diagnóstico sugerido por la OMS) y una media de IMC de 31.1 kg/m<sup>2</sup>, mientras que en el estudio de Chávez y cols. (2020), la prediabetes fue definida por glucosa sérica en ayuno entre 100 y 125 mg/dL (diagnóstico de la Asociación Americana de Diabetes) y con un IMC menor al presentado por las participantes de este trabajo (28.4 kg/m<sup>2</sup>). La proximidad en las concentraciones de glucosa e IMC similares entre los grupos con prediabetes y controles del estudio de Chávez y cols. (2020), puede explicar al menos en parte, la falta de diferencias en la diversidad alfa observada entre estos dos grupos.

A diferencia de lo observado en diversos estudios, donde se presenta una mayor diversidad alfa en pacientes con DT2 tratados con metformina (Chávez et al., 2020; De la Cuesta et al., 2017), en el presente trabajo no se observaron diferencias en la diversidad alfa al estratificar por el uso de este fármaco, lo cual puede deberse al número reducido de sujetos con DT2 y tratamiento con metformina (n=9; Figura

suplementaria 3). Aunado a ello, los análisis de diversidad beta, no presentaron diferencias entre el grupo control y con prediabetes, esto es consistente con lo observado en otros trabajos que comparan los fenotipos mencionados (Gaike et al., 2020; Chávez et al., 2020). Además, en nuestro estudio tampoco se identificaron cambios al comparar el grupo control con los sujetos con DT2, incluso al estratificar por uso de metformina. En contraste, una menor diversidad beta ha sido presentada en sujetos con diabetes sin tratamiento hipoglucemiante (Gaike et al., 2020; Chávez et al., 2020).

Es de llamar la atención que los dos estudios para la microbiota intestinal en pacientes mexicanos con DT2 (Chávez et al., 2020; Diener et al., 2021), no identificaron ningún género compartido (Tabla suplementaria B). Particularmente, el estudio de Chávez y cols. (2020) identificó 13 géneros diferenciados entre los sujetos controles, prediabetes o DT2, de los cuales ninguno se compartió con los identificados en este estudio. En contraste, de los cuatro géneros relacionados con la progresión de la diabetes en el estudio de Diener y cols. (2021), solo la disminución del género *Anaerostipes* en sujetos con DT2, fue consistente con lo observado en la presente tesis. De manera notable, el género *Anaerostipes* ha sido asociado con un estado saludable del hospedero. Particularmente, sujetos sin DT2 de distintos grupos étnicos han mostrado una mayor abundancia de este género, comparado con pacientes con DT2 (Arumugam et al., 2011; Doumatey et al., 2020; Zeevi et al., 2019). El género *Anaerostipes* es uno de principales productores de butirato, el cual puede ser producido a través de diferentes sustratos como fibra, lactato y acetato (Nam et al., 2021). Debido a que el consumo de fibra no se observó incrementado en el grupo control con mayor abundancia de *Anaerostipes*, se requieren estudios para evaluar si las especies representativas de este género que utilizan sustratos distintos a la fibra, se encuentran incrementadas en los sujetos del grupo control. Otro de los géneros identificados en este estudio fue *Acidaminococcus*, el cual también se encontró incrementado en sujetos con prediabetes y en sujetos con DT2 de distintos grupos étnicos, particularmente de la India (Dutta et al., 2023). Esta bacteria produce además de butirato, ácido sulfhídrico (H<sub>2</sub>S), el cual es un gas con efectos deletéreos para la barrera intestinal,

relacionado con patologías como el síndrome de intestino irritable, enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa (Jumas et al., 2007; Singh et al., 2015). Además, concentraciones pancreáticas elevadas de H<sub>2</sub>S pueden desencadenar la muerte de las células beta, debido al aumento de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Zhao et al., 2021). Se requieren estudios adicionales para evaluar si la relación del género *Acidaminococcus* con la prediabetes/diabetes, es mediada por un aumento en la concentración de H<sub>2</sub>S.

Por otro lado, *Prevotella* presentó un incremento en su abundancia en mujeres con prediabetes respecto al grupo con DT2. Se encontraron reportes de dos estudios en población latinoamericana, incluyendo mexicanos, que observaron un incremento de la abundancia relativa de *Prevotella* en sujetos con prediabetes y/o en pacientes con diabetes; aunque el incremento de este género fue significativo solamente en población de Colombia (De la Cuesta et al., 2017; Chávez et al., 2020). *Prevotella* se ha asociado con la degradación de carbohidratos y polisacáridos complejos (Wu et al., 2011). Aunque en nuestro estudio la ingesta de carbohidratos no varió significativamente entre los grupos, se requiere evaluar si el género *Prevotella* correlaciona con la ingesta de carbohidratos. Además, este género se ha asociado con la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada (BCAA), los cuales participan en el desarrollo de RI y progresión a DT2 (Krogh et al., 2016; Newgard et al., 2009).

Uno de los objetivos de este estudio fue identificar géneros bacterianos que pudieran ser marcadores tempranos de la enfermedad, presentando modificaciones desde prediabetes y permaneciendo significativamente diferenciados en la DT2. Sin embargo, no se identificó ningún género que presentara dicho comportamiento. De manera interesante, se observó una menor abundancia de los géneros *Lactococcus*, *Lachnospiraceae UCG 003* y *Coprococcus 2* en el grupo de DT2, respecto al grupo control y prediabetes. En nuestro conocimiento, no se tienen reportes previos de una menor abundancia de *Lactococcus* en personas con DT2; aunque este género se reportó disminuido en un modelo de ratas con diabetes (Chen et al., 2020). La especie *L. lactis* ha sido usada como un probiótico intestinal;

particularmente estudios con subespecies específicas como *Lactis* KF145 señalan que esta bacteria está relacionada con la reducción del colesterol total, triglicéridos; así como con el incremento de c-HDL (Hassanein et al., 2013; Sroka et al., 2020). Sin embargo, no se ha evaluado su potencial benéfico para disminuir las alteraciones relacionadas con el metabolismo de carbohidratos.

*Lachnospiraceae* UCG 003 fue otro de los géneros disminuidos significativamente en el grupo con DT2. Sin embargo, no se ha reportado este comportamiento en otros estudios en humanos o modelos animales. No obstante, un estudio en un modelo murino con diabetes reportó disminución del género *Lachnospiraceae* UCG 001, el cual también pertenece a la familia *Lachnospiraceae* (Wei et al., 2018). Distintos géneros de esta familia, incluyendo *Lachnospiraceae* UCG 003, son conocidos como productores de AGCC (Wei et al., 2018; Ai et al., 2019). Se ha reportado que el aumento en la abundancia de *Lachnospiraceae* UCG 003 está relacionado con la ingesta de probióticos, específicamente bacterias productoras de ácido láctico, las cuales tienen efectos benéficos que incluyen la modulación del metabolismo de lípidos y el control de obesidad (Gryaznova et al., 2022).

*Coprococcus* presentó una menor abundancia en mujeres con DT2, el cual también se ha observado en pacientes de origen chino con DT2 (Huang et al., 2022). Además, la especie *Coprococcus eutactus* se identificó disminuida en sujetos con prediabetes (Wu et al., 2020). Aunado a ello, el género *Coprococcus* mostró una abundancia relativa baja en sujetos mexicanos con dislipidemia aterogénica, comúnmente observada en sujetos con DT2 (López et al., 2022). Este es otro género perteneciente a la familia *Lachnospiraceae*, la cual se caracteriza por su capacidad de producir butirato, un AGCC relacionado con beneficios para la salud, incluyendo menor riesgo de desarrollar DT2 (Kim et al., 2022).

Finalmente, los géneros *Akkermansia* y *Odoribacter* se encontraron disminuidos significativamente en el grupo con prediabetes, comparados con el grupo control y con DT2. Además, estos dos últimos grupos mostraron una abundancia similar en ambos géneros bacterianos. *Akkermansia* es una bacteria muy estudiada en las enfermedades metabólicas debido a su asociación con la salud del huésped (Gaike

et al., 2020). Por ello, es de llamar la atención que este género no se haya identificado en ninguno de los estudios previos en población mexicana con DT2 (Chávez et al., 2020; Diener et al., 2021). Diversos estudios han encontrado una asociación entre el uso del fármaco hipoglucemiante metformina, con el incremento en la abundancia de *Akkermansia* (Zhang et al., 2018; De la Cuesta et al., 2017). Además, en un estudio en ratones se observó que metformina restaura la barrera intestinal al incrementar la producción de mucinas y el número de células caliciformes. Las mucinas son glucoproteínas epiteliales involucradas en la protección de la integridad de la mucosa intestinal, lo cual está relacionado con el aumento en la abundancia de *Akkermansia* (Haoran et al., 2021). Aunque no ha sido completamente dilucidado el mecanismo a través del cual metformina puede desencadenar su efecto hipoglucemiante, se sugiere que modifica la microbiota intestinal, incrementando *Akkermansia*, lo cual puede favorecer la integridad y funcionalidad de la barrera intestinal, la reducción de los niveles de LPS, el aumento de AGCC y la regulación del metabolismo de los ácidos biliares (Zhang, 2018). Por ello, en estudios futuros se requiere incluir un número mayor de pacientes con DT2 tratados con este fármaco, lo que podría ayudar a definir si el incremento en la abundancia de *Akkermansia*, observado en los pacientes con DT2, se debe al uso de este medicamento. El género *Odoribacter* mostró un comportamiento similar al de *Akkermansia*. Además, de manera conjunta con *Akkermansia*, este género se ha asociado con beneficios metabólicos para la salud (Lim et al., 2017; Brahe et al., 2015). En un estudio de mujeres postmenopáusicas con obesidad se encontró que tanto *Akkermansia* como *Odoribacter* se asociaron con un perfil de lípidos saludable (Brahe et al., 2015). Estos dos géneros se han observado disminuidos en individuos sin síndrome metabólico (Lim et al., 2017).

En conclusión, este estudio identificó una menor diversidad en la composición de la microbiota intestinal y disminución de la abundancia de géneros bacterianos productores de AGCC, particularmente en mujeres con DT2. Estos géneros podrían estar relacionados con la salud metabólica, a través del mantenimiento de la integridad de la barrera intestinal y una menor resistencia a la insulina.

## PERSPECTIVAS

- Debido a que las posibles rutas metabólicas en las que se involucra la microbiota intestinal de este estudio no fueron evaluadas mediante el uso de herramientas bioinformáticas, es necesario realizar análisis de predicción funcional y la determinación de metabolitos de origen bacteriano, como los AGCC.
- Se requiere que en estudios futuros se incluya un número mayor de pacientes con DT2 tratados con metformina, para poder definir si el incremento en la abundancia de géneros como *Akkermansia* en pacientes con DT2, se debe al uso de este medicamento.
- Finalmente, se requiere evaluar la participación de la microbiota intestinal en una población de hombres con alteraciones en el metabolismo de carbohidratos.

## **ANEXO**

### **Anexo A. Procedimiento para "DNA stool mini kit (Qiagen)"**

1. Pesar 180 – 220 mg de materia fecal y colocar en tubo de 2 mL.  
NOTA: si se utilizan muestras congeladas, evitar descongelación hasta que el buffer ASL sea añadido, para evitar degradación de DNA. Resto de pasos, se realizan a temperatura ambiente.

2. Añadir 1.4 mL de amortiguador ASL y colocar en vórtex 1 minuto (o hasta que la muestra esté completamente homogeneizada).

NOTA: verificar que amortiguador ASL no tenga formación de cristales; si es así, calentar hasta homogeneizarlos.

3. Calentar en termoblock a 95°C por 5 minutos.

4. Homogeneizar en vórtex 15 segundos y centrifugar 1 minuto a máxima velocidad (24x4g).

5. Añadir tableta INHIBITEX y agitar 1 minuto en vórtex (o hasta que pastilla se haya desintegrado).

6. Transferir 1.2 mL de sobrenadante a nuevo tubo de 2 mL (desechar pellet).

NOTA: cortar individualmente el blister para evitar contaminación cruzada.

7. Incubar 1 minuto a temperatura ambiente.

8. Centrifugar 3 minutos a máxima velocidad.

9. Transferir todo el sobrenadante a nuevo tubo de 1.5 mL (desechar el pellet).

10. Centrifugar 3 minutos a máxima velocidad.

11. Pipetear 15 µL de proteinasa K en nuevo tubo de 1.5 mL.

12. Agregar a la proteinasa K, 200 µL del sobrenadante del paso 10.

13. Añadir 200 µL de amortiguador AL y agitar en vórtex por 15 segundos hasta formar solución homogénea.

NOTA: realizar la adición de los reactivos y la muestra en ese orden; de otra forma, se reduce el rendimiento de la extracción.

14. Incubar en termoblock a 70°C por 30 minutos.

15. Centrifugar un "push" (3000 rpm) para bajar gotas de la tapa.

16. Añadir 200 µL de etanol (96-100%) al lisado y mezclar en vórtex.

17. Centrifugar un "push" para bajar gotas de la tapa.

NOTA: si después de este paso se tiene un pellet, es necesario resuspenderlo.

18. Etiquetar tapa de columna y colocar en tubo de recolección de 2 mL.

19. Transferir contenido de paso 16 a la columna, sin humedecer el borde.

20. Centrifugar 1 minuto a máxima velocidad.

21. Colocar la columna en nuevo tubo de recolección de 2 mL y desechar tubo que contiene el filtrado.

NOTA: cerrar la columna para evitar la formación de aerosol durante la centrifugación. Si después de la centrifugación el lisado no ha pasado completamente, volver a centrifugar hasta que la columna quede vacía.

22. Abrir cuidadosamente la columna y añadir 500 µL de amortiguador AW1.

23. Cerrar tapa y centrifugar 1 minuto a máxima velocidad.

24. Colocar la columna en nuevo tubo de recolección de 2 mL y desechar tubo que contiene el filtrado.

25. Abrir cuidadosamente la columna y añadir 500 µl de buffer AW2.

26. Cerrar tapa y centrifugar 3 minutos a máxima velocidad.

27. Colocar la columna en nuevo tubo de recolección de 2 mL y desechar tubo que contiene el filtrado.

28. Cerrar tapa y centrifugar 1 minuto a máxima velocidad.

29. Colocar la columna en nuevo tubo de 1.5 mL etiquetado.
30. Abrir cuidadosamente la columna y añadir 200  $\mu$ L de amortiguador AE directamente en la membrana.
31. Cerrar la tapa e incubar minuto a temperatura ambiente.
32. Centrifugar a máxima velocidad 1 minuto para eluir el DNA.

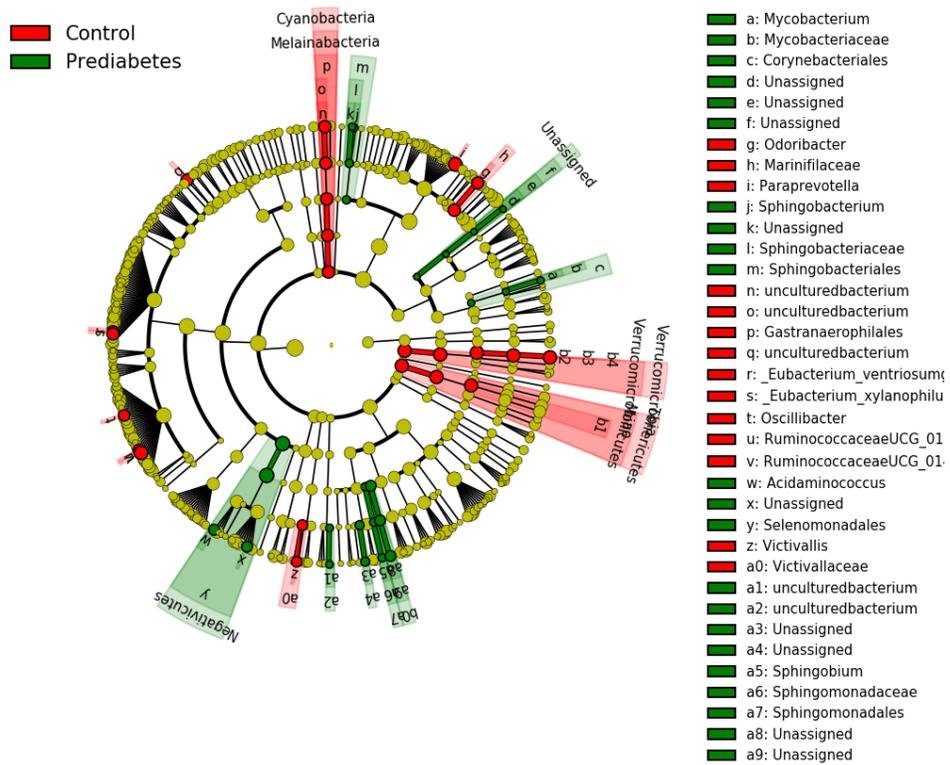


Figura suplementaria 1. Cladograma de la microbiota representativa en la comparación Control contra Prediabetes.

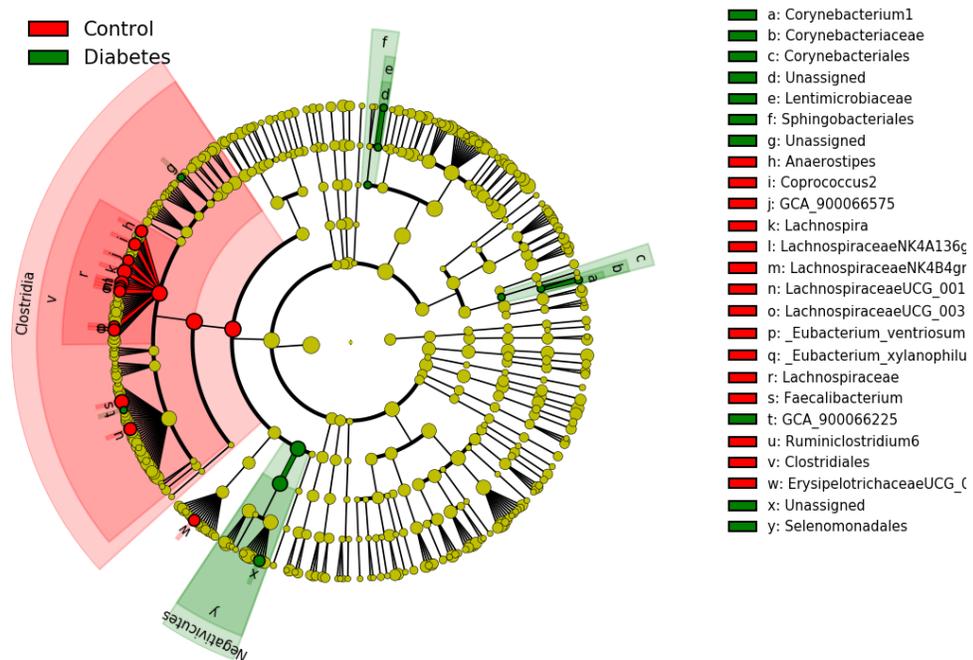


Figura suplementaria 2. Cladograma de la microbiota representativa de la comparación Control vs DT2.

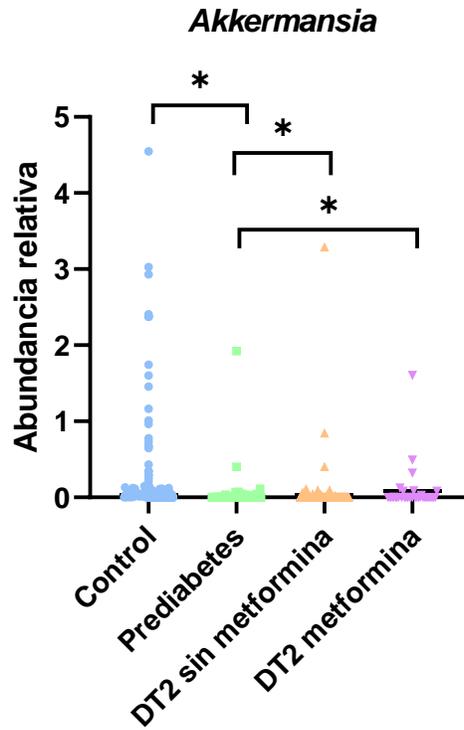


Figura suplementaria 3. Abundancia relativa del género *Akkermansia* estratificando por uso de metformina.

**Tabla suplementaria A. Géneros bacterianos que mostraron incremento diferencial en la abundancia relativa al compararse entre los grupos de estudio.**

↑: género incrementado en el grupo de la columna correspondiente.

( ): Grupo contra el que se encontró aumentado; a=control, b=prediabetes, c=diabetes.

<b>GÉNERO</b>	<b>CONTROL</b>	<b>PREDIABETES</b>	<b>DIABETES</b>
<i>Eubacterium ventriosum group</i>	↑ (b, c)		
<i>Oscillibacter</i>	↑ (b)		
<i>Odoribacter</i>	↑ (b)		↑ (b)
<i>Eubacterium xylanophilum group</i>	↑ (b, c)		
<i>Ruminococcaceae UCG 013</i>	↑ (b, c)		
<i>Paraprevotella</i>	↑ (b)		
<i>Ruminococcaceae UCG 014</i>	↑ (b)		
<i>Akkermansia</i>	↑ (b)		↑ (b)
<i>Sphingobium</i>		↑ (a)	
<i>Sphingobacterium</i>		↑ (a)	
<i>Mycobacterium</i>		↑ (a)	
<i>Acidaminococcus</i>		↑ (a)	
<i>Paenoclostridium</i>		↑ (a)	
<i>Corynebacterium 1</i>			↑ (a)
<i>Cerasicoccus</i>			↑ (a)
<i>GCA_900066225</i>			↑ (a)
<i>Lachnospiraceae NK4B4 group</i>	↑ (c)		
<i>Family XIII AD3011 group</i>	↑ (c)		
<i>Ruminococcaceae UCG 003</i>	↑ (c)		
<i>Lactococcus</i>	↑ (c)	↑ (c)	
<i>Erysipelotrichaceae UCG003</i>	↑ (c)		
<i>Anaerostipes</i>	↑ (c)		
<i>Lachnospiraceae UCG 001</i>	↑ (c)		
<i>Lachnospiraceae UCG 003</i>	↑ (c)	↑ (c)	
<i>Coprococcus 2</i>	↑ (c)	↑ (c)	
<i>Ruminoclostridium 6</i>	↑ (c)		
<i>Lachnospiraceae NK4A136</i>	↑ (c)		
<i>Roseburia</i>	↑ (c)		
<i>Faecalibacterium</i>	↑ (c)		
<i>Lachnospira</i>	↑ (c)		
<i>Prevotella 9</i>		↑ (c)	
<i>Prevotella</i>		↑ (c)	

**Tabla suplementaria B. Comparación entre estudios previos en la progresión de DT2 en población mexicana.**

<b>Características</b>	<b>Chávez et al., 2020</b>	<b>Diener et al., 2021</b>	<b>Presente estudio</b>
<b>Lugar de origen de los participantes</b>	Ciudad de México	Guanajuato	Ciudad de México
<b>Población (n, %M)</b>	n= 217, 65.9%	n=430, 71.6%	n=133, 100%
<b>Definición del diagnóstico de prediabetes</b>	%HbA1c: 5.7 – 6.4% Concentración sérica de glucosa en ayuno: 100-125 mg/dL	Concentración de glucosa en ayuno: 100-125 mg/dL; o alteración en la prueba de tolerancia oral a la glucosa.	Concentración de glucosa en ayuno: 110-125 mg/dL
<b>Diversidad alfa</b>	↓ Grupo DT2 sin Metformina	No se reporta por grupos	↓ Grupo DT2
<b>Diversidad beta</b>	Diferencias entre distintos comparativos entre grupo control, prediabetes y DT2.	No se reporta este análisis.	Sin diferencias significativas entre los grupos.
<b>Bacterias incrementadas en el grupo control</b>	<i>Betaproteobacteria, Burkholderiales, Alcaligenaceae.</i>	<i>Anaerostipes, Blautia, Intestinibacter, Romboutsia</i>	<i>Eubacterium ventriosum group, Ocillibacter, Odoribacter, Eubacterium xylanophilum group, Ruminococcaceae UCG 013, Paraprevotella, Ruminococcaceae UCG 014, Akkermansia, Lachnospiraceae NK4B4 group, Family XIII AD3011 group, Ruminococcaceae UCG 003, Lactococcus, Erysipelotrichaceae UCG003, Anaerostipes, Lachnospiraceae UCG 001, Lachnospiraceae UCG 003, Coprococcus 2, Ruminoclostridium 6, Lachnospiraceae NK4A136, Roseburia, Faecalibacterium, Lachnospira.</i>
<b>Bacterias incrementadas en prediabetes</b>	<i>Suterella, Comamonadaceae</i>	<i>Escherichia/Shigella, Veillonella</i>	<i>Sphingobium Sphingobacterium Mycobacterium Acidaminococcus Paenclostridium, Lactococcus, Lachnospiraceae UCG 003, Coprococcus 2, Prevotella 9, Prevotella.</i>
<b>Bacterias incrementadas en DT2</b>	<i>Suterella, Acidobacteria, Pelomonas, Acidobacteriales, Koribacteraceae, Bacteroidia, Bacteroidales, Roseburia, Oscillospira.</i>	<i>Escherichia/Shigella, Veillonella</i>	<i>Odoribacter, Akkermansia, Corynebacterium 1, Cerasicoccus, GCA_900066225.</i>

## **REFERENCIAS**

- ADA. (2014). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 37, 81-90.
- ADA. (2019). American Diabetes Association Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in diabetes 2019. *Diabetes Care*, 42 , 13-28.
- ADA. (10 de Febrero de 2023). *Understanding A1C*. Obtenido de American Diabetes Association: <https://diabetes.org/diabetes/a1c/diagnosis>
- Ahmad, N., Jalaludin, M., Zin, R., & et al. (2017). Triglyceride to HDL-C Ratio is Associated with Insulin Resistance in Overweight and Obese Children. *Scientific Reports*, 7, 1-7.
- Ahmed, B., Sultana, R., & Greene, M. (2021). Adipose tissue and insulin resistance in obese. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 137, 1-13.
- Ai, D., Pan, H., Li, X., & et al. (2019). Identifying Gut Microbiota Associated With Colorectal Cancer Using a Zero-Inflated Lognormal Model. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1-8.
- Alotaibi, A., Perry, L., Gholizadeh, L., & Al-Ganmi, A. (2017). Incidence and prevalence rates of diabetes mellitus in Saudi Arabia: an overview. *Epidemiology and Global Health*, 4, 211-2118.
- Amiri, P., Jalali, S., Karimi, M., & et al. (2017). Factors associated with pre-diabetes in Tehranian men and women: a structural equations modeling. *Plos One*, 12, 1-14.
- Aronoff, S., Berkowitz, K., Shreiner, B., & et al. (2004). Glucose Metabolism and Regulation: Beyond Insulin and Glucagon. *Diabetes Spectrum*, 17, 183-190.
- Arumugan, M., Raes, J., Pelletier, R., & et al. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473, 174-180.
- Barbu, E., Popescu, M., Popescu, A., & Balanescu, S. (2021). Phenotyping the Prediabetic Population—A Closer Look at Intermediate Glucose Status and Cardiovascular Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 22 , 22-35.
- Basto, A., López , N., Rojas, R., & et al. (2023). Prevalencia de prediabetes y diabetes en México: Ensanut 2022. *Salud Pública de México*, 65, 163-168.

- Bolyen, E., Rideout, J., Dillon, M., & et al. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, *37*, 852-857.
- Brahe, L., Le Chatelier, E., Pifti, E., & et al. (2015). Specific gut microbiota features and metabolic markers in postmenopausal women with obesity. *Nutrition & Diabetes*, *5*, 1-7.
- Brandt, A., Hernández, A., Kehm, R., & et al. (2019). Metformin attenuates the onset of non-alcoholic fatty liver disease and affects intestinal microbiota and barrier in small intestine. *Scientific Reports*, *9*, 1-14.
- Callahan, B., McMurdie, P., Rosen, M., & et al. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, *13*, 581-588.
- Cani, P., Amar, J., Iglesias, M. Á., & et al. (2007). Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*, *56*, 1761-1772.
- Cani, P., Bibiloni, R., Knauf, C., & et al. (2008). Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice. *Diabetes*, *57*, 1470-1481.
- CDC. (24 de Agosto de 2022). *La prediabetes: su oportunidad de prevenir la diabetes tipo 2*. Obtenido de Centros para el Control y la Prveneción de Enfermedades:  
<https://www.cdc.gov/diabetes/spanish/basics/prediabetes.html>
- Cerf, M. (2013). Beta cell dysfunction and insuline resistance. *Frontiers in Endocrinology*, *4*, 1-12.
- Chávez, A., Pizano, M. L., Hernández, F., & et al. (2020). Characterization of the Gut Microbiota of Individuals at Different T2D Stages Reveals a Complex Relationship with the Host. *Microorganisms*, *8*, 94-110.
- Chen, M., Xiao, D., Liu, W., & et al. (2020). Intake of Ganoderma lucidum polysaccharides reverses the disturbed gut microbiota and metabolism in type 2 diabetic rats. *International Journal of Biological Sciences*, *155*, 890-902.
- Corp., I. (2016). BM SPSS Statistics for Windows, Version 24.0. NY.
- De la Cuesta, J., Mueller, N., Corrales, V., & et al. (2017). 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*, *40*, 54-62.
- DeFronzo, R., Ferrannini, E., Groop, L., & et al. (2015). Type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers*, *1*, 1-12.

- Denova, E., Flores, Y., Gallegos, K., & et al. (2016). Health workers cohort study: methods and study design. *Salud Pública de México*, 58, 708-716.
- Diener, C., Reyes, M., Jiménez, L., & et al. (2021). Progressive Shifts in the Gut Microbiome Reflect Prediabetes and Diabetes Development in a Treatment-Naive Mexican Cohort. *Frontiers in Endocrinology*, 11, 1-13.
- Doumatey, A., Adeyemo, A., Zhou, J., & et al. (2020). Gut Microbiome Profiles Are Associated With Type 2 Diabetes in Urban Africans. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 1-13.
- Dutta, A., Kumar, A., & Mande, S. (2023). Gut Microbiota of the Asian Indian Type 2 Diabetes Phenotype: How Different It Is from the Rest of the World? *Journal of the Indian Institute of Science*, 11, 1-12.
- Ferriol, M., & Merle, H. (2012). *Los componentes alfa, beta y gamma de la biodiversidad. Aplicación al estudio de comunidades vegetales*. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia.
- FMD. (5 de Abril de 2023). *Prediabetes en números*. Obtenido de Federación Mexicana de Diabetes: <https://fmdiabetes.org/pre-diabetes-numeros/>
- Forslund, K., Hildebrand, F., Nielsen, T., & et al. (2015). Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota. *Nature*, 528, 262–266.
- Gaike, A., Paul, D., Bhute, S., & et al. (2020). The Gut Microbial Diversity of Newly Diagnosed Diabetics but Not of Prediabetics Is Significantly Different from That of Healthy Nondiabetics. *American Society of Microbiology*, 5, 19-36.
- Galicia, U., Benito, A., Jebari, S., & et al. (2020). Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 21- 55.
- Gao, A., Su, J., Liu, R., & et al. (2021). Sexual dimorphism in glucose metabolism is shaped by androgen-driven gut microbiome. *Nature communications*, 12, 1-14.
- Goyal, R., Nguyen, M., & Jialal, L. (2022). Glucose Intolerance. En *StatPearls*. StatPearls.
- Gryaznova, M., Dvoretzkaya, Y., Burakova, I., & et al. (2022). Dynamics of Changes in the Gut Microbiota of Healthy Mice Fed with Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. *Microorganisms*, 10, 1-21.
- Gutiérrez, C., Roura, A., & Olivares, J. (2017). Mecanismos Moleculares de la Resistencia a la Insulina: Una actualización. *Gaceta Médica de México*, 153, 214-228.

- Hantzidiamantis, P., & Lappin, S. (06 de Mayo de 2023). *Fisiología Glucosa*.  
Obtenido de StatPearls: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545201/>
- Haoran, K., Fang, L., Wenlin, D., & et al. (2021). Metformin Exerts Anti-inflammatory and Mucus Barrier Protective Effects by Enriching Akkermansia muciniphila in Mice With Ulcerative Colitis. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 1-17.
- Hasani, A., Ebrahimzadeh, S., Hemmati, F., & et al. (2021). The role of Akkermansia muciniphila in obesity, diabetes and atherosclerosis. *Journal of Medical Microbiology*, 70, 1-12.
- Hassanein, W., Awany, N., & Ibraheim, S. (2013). Cholesterol reduction by Lactococcus lactis KF147. *Microbiology Research*, 7, 11-16.
- Hernández, M., Romieu, I., Parra, S., & et al. (1998). Validity and reproducibility of a food frequency questionnaire to assess dietary intake of women living in Mexico City. *Salud Pública de México*, 40, 133-140.
- Hernández, U. (2022). *Asociación de la microbiota intestinal con el nivel de consumo de vitamina B12 y su relación con la concentración sérica después de la cirugía bariátrica*. Ciudad de México: UNAM.
- Hong, J., Jia, Y., Pan, S., & et al. (2016). Butyrate alleviates high fat diet-induced obesity through activation of adiponectin-mediated pathway and stimulation of mitochondrial function in the skeletal muscle of mice. *Oncotarget*, 7, 56071–56082.
- Huang, X., Qiu, Y., Gao, Y., & et al. (2022). Gut microbiota mediate melatonin signalling in association with type 2 diabetes. *Diabetologia*, 65, 1627–1641.
- Huebschmann, A., Huxley, R., Kohrt, W., & et al. (2019). Sex differences in the burden of type 2 diabetes and cardiovascular risk across the life course. *Diabetology*, 62, 1761-1772.
- Hurre, S., & Hsu, W. (2017). The etiology of oxidative stress in insulin resistance. *Biomedical Journal*, 40, 257-262.
- IDF. (23 de Agosto de 2022). *Diabetes around the world in 2021*. Obtenido de IDF Diabetes Atlas: <https://diabetesatlas.org/>
- IDF. (20 de Mayo de 2023). *Diabetes Atlas 10th Edition*. Obtenido de International Diabetes Federation: [https://diabetesatlas.org/idfawp/resource-files/2021/07/IDF\\_Atlas\\_10th\\_Edition\\_2021.pdf](https://diabetesatlas.org/idfawp/resource-files/2021/07/IDF_Atlas_10th_Edition_2021.pdf)
- Illumina. (27 de Noviembre de 2013). *16S Metagenomic Sequencing Library*. Obtenido de Support Illumina: <https://support.illumina.com/content/dam/illumina->

support/documents/documentation/chemistry\_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf

- Jumas, E., Carlier, J., H el ene, J., & et al. (2007). Acidaminococcus intestini sp. nov. isolated. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *57*, 2314–2319.
- Kang, B., Yang, L., Lee, E., & et al. (2017). The triglyceride/glucose ratio is a useful surrogate marker of insulin resistance among adolescents. *International Journal of Obesity*, *41*, 1-15.
- Kautzky, A., Harreiter, H., & Pacini, J. (2016). Sex and Gender Differences in Risk, Pathophysiology and Complications of Type 2 Diabetes Mellitus. *Endocrine Society*, *37*, 278-316.
- Kawata, M., Oliveira, L., Costa, G., & et al. (2019). Relationship between gut microbiota, probiotics, and type 2 diabetes mellitus. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *103*, 9229–9238.
- Khan, M., Hashim, M., King, J., & et al. (2020). Epidemiology of Type 2 Diabetes - Global Burden of Disease and Forecasted Trends. *Epidemiology Global Health*, *10*, 107-111.
- Kim, B.-R., Shin, J., Guevarra, R., & et al. (2017). Deciphering Diversity Indices for a Better Understanding of Microbial. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *27*, 2089-2093.
- Kim, K., Lee, S., Park, S., & et al. (2022). Role of an unclassified Lachnospiraceae in the pathogenesis of type 2 diabetes: a longitudinal study of the urine microbiome and metabolites. *Experimental & molecular medicine*, *54*, 1125-1132.
- Kitten, A., Ryan, L., Lee, G., & et al. (2021). Gut microbiome differences among Mexican Americans with and without type 2 diabetes mellitus. *Plos One*, *16*, 1-10.
- Klein, S., Gastaldelli, A., Yki-Jarvinen, H., & et al. (2021). Why does obesity cause diabetes? *Cell Metabolism*, *34*, 11-20.
- Krogh, P., Gudmundsdottir, V., Bjorn, H., & et al. (2016). Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity. *Nature*, *535*, 376–381.
- Lambeth, S., Carson, T., Lowen, J., & et al. (2015). Composition, diversity and abundance of gut microbiome in prediabetes and type 2 diabetes. *Journal of diabetes and obesity*, *2*, 1-7.

- Lankatillake, C., Huynh, T., & Dias, D. (2019). Understanding glycaemic control and current approaches for screening antidiabetic natural products from evidence-based medicinal plants. *Plant Methods*, *15*, 105-140.
- Larsen, N., Vogensen, F., Van Den Berg, F., & Nielsen, D. (2010). Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS One*, *5*, 1-10.
- Li, Q., Wang, X., Ni, Y., & et al. (2019). Epidemiological characteristics and risk factors of T2DM in Chinese premenopausal and postmenopausal women. *Lipids in Health and Disease*, *18*, 155-163.
- Li, W., Stirling, K., & Yang, J. (2020). Gut microbiota and diabetes: From correlation to causality and mechanism. *World Journal of Diabetes*, *11*, 293-308.
- Li, X., Watanabe, K., & Kimura, I. (2017). Gut Microbiota Dysbiosis Drives and Implies Novel Therapeutic Strategies for Diabetes Mellitus and Related Metabolic Diseases. *Frontiers in Immunology*, *8*, 1882.
- Lim, M., You, H., Yoon, H., & et al. (2017). The effect of heritability and host genetics on the gut microbiota and metabolic syndrome. *Gut*, *66*, 1031-1038.
- Lin, R., Hoang, X., Qiu, Y., & et al. (2022). Gut Microbiota Mediate Melatonin Signaling in Association With Type 2 Diabetes. *Current Developments in Nutrition*, *65*, 1019-125.
- Liu, H., Wang, J., He, T., & et al. (2018). Butyrate: A Double-Edged Sword for Health? *Advances in Nutrition*, *9*, 21-29.
- Lohman, T., Roche, A., & Martorell, R. (1988). *Anthropometric standardization reference manual*. Human Kinetics Books.
- López, P. (2022). *Caracterización de la microbiota intestinal asociada con dislipidemia y su relación con cambios en parámetros lipídicos después de cirugía bariátrica*. Ciudad de México: UNAM.
- Macotela, Y., Boucher, J., Tran, T., & Kahn, C. (2009). Sex and depot differences in adipocyte insulin sensitivity and glucose metabolism. *Diabetes*, *58*, 803-812.
- Mahanta, T., Joshi, R., Mahanta, B., & Xavier, D. (2015). Prevalence of modifiable cardiovascular risk factors among tea garden and general population in Dibrugarh, Assam, India. *Epidemiology Global Health*, *3*, 147-156.
- Mather, K., Kim, C., Christophi, C., & et al. (2015). Diabetes Prevention Program. Steroid Sex Hormones, Sex Hormone-Binding Globulin, and Diabetes

- Incidence in the Diabetes Prevention Program. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 100, 1-10.
- McMurdie, P., & Holmes, S. (2013). phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *Plos One*, 8, 1-11.
- Mcnaughton, S., Dunstan, D., Ball, K., & Shaw, J. (2009). Dietary quality is associated with diabetes and cardio-metabolic risk factors. *The Journal of Nutrition*, 139, 734-742.
- Modhumi, R., Yu, Z., Chi, J., & et al. (2019). From Pre-Diabetes to Diabetes: Diagnosis, Treatments and Translational Research. *Medicina*, 55, 55-64.
- Morán, S., Ocampo, E., Gutiérrez, R., & et al. (2017). An Amino Acid Signature Associated with Obesity Predicts 2-Year Risk of Hypertriglyceridemia in School-Age Children. *Scientific Reports*, 7, 1-7.
- Nam, T., Mannerås, L., Puschmann, R., & et al. (2021). Conversion of dietary inositol into propionate and acetate by commensal Anaerostipes associates with host health. *Nature Communications*, 12, 1-16.
- Newgard, C., An, J., Bain, J., & et al. (2009). A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance. *Cell Metabolism*, 9, 311–326.
- Oksanen, J. (26 de Mayo de 2023). *Analysis and Graphics of Microbiome Census Data*. Obtenido de Vegan: Community Ecology Package: <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/index.html>
- OMS. (1975). *Manual sobre necesidades nutricionales del hombre*. Ginebra.
- OMS. (28 de Agosto de 2022). *Diabetes*. Obtenido de Organización Mundial de la Salud: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>
- OMS. (10 de Abril de 2023). *Definition and Diagnosis of Diabetes Mellitus and Intermediate Hyperglycemia Report of a WHO/IDF Consultation*. Obtenido de Organización Mundial de la Salud: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/43588>
- OMS. (9 de Mayo de 2023). *Obesidad y Sobrepeso*. Obtenido de Organización Mundial de la Salud: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight#:~:text=El%20%C3%ADndice%20de%20masa%20corporal,\(kg%2Fm2\).](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight#:~:text=El%20%C3%ADndice%20de%20masa%20corporal,(kg%2Fm2).)
- Pal, V., Bandyopadhyay, P., & Singh, A. (2018). Hydrogen sulfide in physiology and pathogenesis of bacteria and viruses. *IUBMB Life*, 70, 393-410.

- Pedersen, H., Gudmundsdottir, V., & Nielsen, H. (2016). Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity. *Nature*, *535*, 376-396.
- Petersen, M., & Shulman, G. (2018). Mechanisms of insulin action and insuline resistance. *Physiological Review*, *98*, 2133–2223.
- Qin , J., Li, Y., Cai, Z., & et al. (2012). A metagenomewide wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*, *490*, 55-60.
- Rahnavard, A., Mallick, H., Mclver, L., & et al. (2021). Multivariable Association Discovery in Population-scale Meta-omics Studies. *PLoS Computational Biology*, *17*, 17-28.
- Robertson, P., Harmon, J., Tran, P., & Poitout, V. (2004).  $\beta$ -Cell Glucose Toxicity, Lipotoxicity, and Chronic Oxidative Stress in Type 2 Diabetes. *Diabetes*, *53*, 119-124.
- Ruuskanen, M., Erawijantari, P., Havulinna, A., & et al. (2022). Gut Microbiome Composition Is Predictive of Incident Type 2 Diabetes in a Population Cohort of 5,572 Finnish Adults. *Diabetes Care*, *45*, 811 - 818.
- Samuel, V., & Shulman, G. (2016). The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling. *Journal of Clinical Investigation*, *126*, 12-22.
- Santos, J., Mora, M., Tena, M., & et al. (2023). Interaction between gut microbiota and sex hormones and their relation to sexual dimorphism in metabolic diseases. *Biology of Sex Differences*, *14*, 1-24.
- Santos, J., Rangel, O., Jimenez, R., & et al. (2018). Influence of gender and menopausal status on gut microbiota. *Maturitas*, *116*, 43-53.
- Satoh, T. (2014). Rho GTPases in insulin-stimulated glucose uptake. *Small GTPases*, *5*, 1-9.
- Scarpellini, E., & Tack, J. (2012). Obesity and metabolic syndrome: An inflammatory condition. *Digestive Diseases*, *30*, 148–153.
- Scheithauer, T., Rampanelli, E., Nieuwdorp, M., & et al. (2020). Gut Microbiota as a Trigger for Metabolic Inflammation in Obesity and Type 2 Diabetes. *Frontiers in Immunology*, *11*, 1-29.
- Sedighi, M., Razavi, S., Navab-Moghadam, F., & et al. (2017). Comparison of gut microbiota in adult patients with type 2 diabetes and healthy individuals. *Microbial Pathogenesis*, *111*, 362-371.
- Segata, N., Izard, J., Walron, L., & et al. (2011). Metagenomic Biomarker Discovery and Explanation. *Genome Biology*, *12*, 6-12.

- Siddiqui, S., Zainal, H., Harun, S., & et al. (2020). Gender differences in the modifiable risk factors associated with the presence of prediabetes: A systematic review. *Diabetes & Metabolic Syndrome*, 14, 1243-1252.
- Singh, S., & Lin, H. (2015). Hydrogen Sulfide in Physiology and Diseases of the Digestive Tract. *Microorganisms*, 3, 1-24.
- Sircana, A., Framarin, L., Leone, N., & et al. (2018). Altered Gut Microbiota in Type 2 Diabetes: Just a Coincidence? *Current Diabetes Reports*, 18, 98-107.
- Solares, I., Jericó, D., Córdoba, K., & et al. (2023). Understanding Carbohydrate Metabolism and Insulin Resistance in Acute Intermittent Porphyria. *International Journal of Molecular Sciences*, 24, 1-9.
- Sroka, A., Mlodzinska, A., Bulanda, M., & et al. (2020). Metagenomic Analysis of Duodenal Microbiota Reveals a Potential Biomarker of Dysbiosis in the Course of Obesity and Type 2 Diabetes: A Pilot Study. *Journal of Clinical Medicine*, 9, 369-375.
- Stumvoll, M., Goldstein, B., & van Haeften, T. (2005). Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *The lancet*, 15, 1333-1346.
- Tan, J., McKenzie, C., Potamitis, M., & et al. (2014). The role of short-chain fatty acids in health and disease. *Advances in Immunology*, 121, 91-119.
- Thursby, E., & Juge, N. (2017). Introduction to the human gut microbiota. *Biochemical Journal*, 474, 1823–1836.
- Vega, M. (06 de 05 de 2023). *Intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina ¿Son lo mismo? Para profesionales de la salud*. Obtenido de Asociación Mexicana de Diabetes: <https://www.amdiabetes.org/post/intolerancia-a-la-glucosa-y-resistencia-a-la-insulina-son-lo-mismo-para-profesionales-de-la-salud>
- Vijay, M., Aitken, J., Carvalho, F., & et al. (2010). Metabolic Syndrome and Altered Gut Microbiota in Mice Lacking Toll-Like Receptor 5. *Science*, 328, 228–231.
- Wang, N., Kuang, L., & Han, B. (2016). Follicle-stimulating hormone associates with prediabetes and diabetes in postmenopausal women. *Acta Diabetologica*, 227-236.
- Wang, T., Larson, M., Vasan, R., & et al. (2011). Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. *Nature Medicine*, 17, 448-453.
- Wei, X., Tao, J., Xiao, S., & et al. (2018). Xiexin Tang improves the symptom of type 2 diabetic rats by modulation of the gut microbiota. *Scientific Reports*, 8, 1-12.

- White, M. (2012). *Atlas of diabetes*. Boston: Springer.
- Wiebe, J., Wägner, A., & Mogollón, F. (2011). Genetics of diabetes mellitus. *Nefrogenética*, 2, 1-119.
- Wu, G., Chen, J., Hoffmann, C., & et al. (2011). Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes. *Science*, 334, 105-108.
- Wu, H., Tremaroli, V., Schmidt, C., & et al. (2020). The Gut Microbiota in Prediabetes and Diabetes: A Population-Based Cross-Sectional Study. *Cell Metabolism*, 32, 379-390.
- Wu, Y., Ding, Y., Tanaka, Y., & Zhang, W. (2014). Risk Factors Contributing to Type 2 Diabetes and Recent Advances in the Treatment and Prevention. *International Journal of Medical Sciences*, 11, 1185-1200.
- Yaramoto, W., Bone, R., Sohn, P., & et al. (2018). Endoplasmic reticulum stress alters ryanodine receptor function in the murine pancreatic beta cell. *Journal of Biological Chemistry*, 294, 168-181.
- Yeribeygi, H., Farrokhi, F., Butler, A., & Sahebkar, A. (2018). Insulin resistance: Review of the underlying molecular mechanisms. *Journal of Cellular Physiology*, 234, 1-11.
- Zeevi, D., Korem, T., Godneva, A., & et al. (2019). Structural variation in the gut microbiome associates with host health. *Nature*, 568, 43-48.
- Zhang, L., Qin, Q., & Liu, M. (2018). Akkermansia muciniphila can reduce the damage of gluco/lipotoxicity, oxidative stress and inflammation, and normalize intestine microbiota in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pathogens and Disease*, 76, 1-15.
- Zhao, S., Li, X., Li, X., & et al. (2021). Hydrogen Sulfide Plays an Important Role in Diabetic Cardiomyopathy. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 1-9.