



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
MEDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Análisis de cambios en la microbiota intestinal en pacientes con diabetes tipo 2 tratados con metformina.

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN INVESTIGACION CLINICA EXPERIMENTAL EN SALUD

PRESENTA:
BIOL. DULCE KARINA RICO AMADOR

TUTOR:
DRA. MARIA TERESA VILLARREAL
PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
MEDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

CIUDAD UNIVERSITARIA CD MX MAYO 2018



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.

Indice

I.	RESUMEN	1
II.	INTRODUCCIÓN	2
III.	MARCO TEORICO	2
3.1	Definición y diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2 (DT2)	2
3.2	Tipos de diabetes mellitus	3
a)	Diabetes tipo mellitus 1 (DT1).	3
b)	Diabetes tipo 2 mellitus (DT2)	4
c)	Diabetes gestacional.	5
3.3	Epidemiología de la diabetes mellitus tipo 2.	5
3.4	Fisiopatología de la diabetes mellitus tipo 2.	6
•	Secreción de insulina	7
•	Acción periférica de la insulina	8
3.5	Hiperinsulinemia y resistencia a la insulina	8
3.6	Etiología de la diabetes mellitus tipo 2	9
a)	Factores genético	9
b)	Ambiente (estilo de vida):	10
3.7	Microbiota intestinal	11
3.8	Función de la microbiota	12
3.9	Funciones metabólicas de la MI	12
a)	Microbiota intestinal y su función en el metabolismo de los carbohidratos.	12
b)	Microbiota intestinal y su función en el metabolismo de ácidos grasos.	13
c)	Microbiota intestinal y metabolismo de aminoácidos	13
3.10	Funciones protectoras de la MI	14
3.11	Funciones tróficas de la MI	15
3.12	Factores que influyen sobre la composición de la microbiota intestinal	15
3.13	Microbiota y obesidad	16
3.14	Microbiota y diabetes tipo 2	17
3.15	Metformina en el tratamiento de la diabetes tipo 2	19
3.16	Metformina y microbiota intestinal	19
IV.	JUSTIFICACIÓN	22
V.	OBJETIVO GENERAL	22
VI.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
VII.	MATERIAL Y MÉTODOS	23

7.1 Cuestiones éticas	23
7.2 Población de estudio	23
a) Criterios de inclusión	23
b) Criterios de exclusión	23
c) Criterios de eliminación	24
7.3 Diagnostico de diabetes tipo 2	24
7.4 Visitas	25
7.5 Visita1	25
7.5.1 Variables antropométricas	25
7.5.2 Variables bioquímicas	25
7.6 Muestra fecal para análisis de microbiota	26
7.7 Intervención	26
a) Dieta	26
b) Tratamiento con metformina	27
c) Cuestionario de adherencia al tratamiento	27
7.11 Visitas de seguimiento	27
7.12 Valoración de respuesta al tratamiento con metformina.	28
7.13 Análisis de microbiota intestinal amplificación y secuenciación de los genes 16s RNA	28
7.14 Análisis bioinformático	29
7.15 Análisis estadístico	30
VIII. RESULTADOS	32
8.1 Cambios en datos antropométricos, bioquímicos y de microbiota intestinal antes y 4 meses después del tratamiento con metformina.	32
8.2 Adherencia al tratamiento con metformina	34
8.3 Respuesta al tratamiento	35
8.4 Cambios en la microbiota intestinal	36
8.5 Alfa diversidad análisis de rarefacción	37
8.6 Beta diversidad	38
8.7 Abundancia relativa a nivel phylum	39
8.8 Relación <i>Firmicutes/Bacteroidetes</i> en T0 y T2	41

8.9 Cambios en géneros <i>Akkermansia</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Escherichia</i> e <i>Intestinibacter</i>	42
8.10 Análisis de varianza multivariado permutacional	42
8.11 Relación de los cambios de la microbiota intestinal con la respuesta al tratamiento (Δ HbA1c relativa)	43
IX. DISCUSIÓN	45
9.1 Tasa de respuesta y adherencia al tratamiento con metformina	45
9.2 Cambios en la microbiota intestinal después del tratamiento con Metformina (4 meses)	46
• Generalidades sobre la microbiota Intestinal en la población de estudio	47
• Alpha diversidad	48
• Beta diversidad, cambios a nivel género	48
• Beta diversidad, cambios a nivel phylum	50
9.3 Correlación de la abundancia relativa de <i>Firmicutes</i> (Δ HbA1c relativa)	51
9.4 Análisis de varianza multivariado permutacional (ADONIS).	51
9.5 Efecto de la dieta en la microbiota intestinal	52
9.6 Limitaciones del estudio	52
X. CONCLUSIONES	53
XI. REFERENCIAS	55
ANEXO 1. Tecnología, seguimiento y respuesta a metformina de diabéticos con datos genómicos y metagenómicos	64
ANEXO 2. Protocolo de extracción de ADN de muestras fecales	73
ANEXO 3. Protocolo de preparación de muestras de ADN microbiano para secuenciación	76
ANEXO 4. Protocolo de purificación con las perlas magnéticas ampure XP	79
ANEXO 5. Diseño de primers	80
ANEXO 6. Abundancia relativa de géneros bacterianos encontrados antes y después	81
ANEXO 7 Parámetros bioquímicos y antropométricos antes y 4 meses después del tratamiento con metformina de todos los pacientes	84

Índice Tablas

Tabla 1. Primeros estudios reportando alteraciones en la microbiota intestinal en diabetes mellitus tipo 2	18
Tabla 2. Comparación de parámetros antropométricos antes y después del tratamiento con metformina	33
Tabla 3. Comparación de parámetros antropométricos antes y después del tratamiento con metformina de acuerdo al género.	34
Tabla 4. Comparación de parámetros bioquímicos antes y después del tratamiento con metformina.	34
Tabla 5 Comparación de parámetros bioquímicos antes y después del tratamiento con metformina de acuerdo al género	35
Tabla 6. Abundancias Relativas de <i>Akkermansia</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Escherichia</i> e <i>Intestinibacter</i> Antes y Después del Tratamiento con Metformina.	43

Índice Figuras

Figura 1. Prevalencia de diagnóstico médico previo de diabetes por sexo	6
Figura 2. Mecanismos de secreción de la insulina	8
Figura 3. Descripción de Disbiosis	18
Figura 4. Flujo de trabajo del análisis	30
Figura 5. Distribución de los pacientes de acuerdo a la adherencia al tratamiento	36
Figura 6. Porcentaje de pacientes con respuesta adecuada de acuerdo a la adherencia al tratamiento	37
Figura 7. Graficas de calidad de las lecturas de las muestras	37
Figura 8. Número de especies observadas por cada secuencia	38
Figura 9. Promedio del número de especies observadas	39
Figura 10. Grafico de componentes principales sin ponderar	39
Figura 11. Grafico de componentes principales con ponderación	40
Figura 12. Abundancia relativa de Phyla en muestras de microbiota intestinal.	40
Figura 13. Porcentaje de cambio en la abundancia relativa de los 3 principales filotipos.	41
Figura 14. Cambios en el promedio de las abundancias relativas de los 3 filotipos	42
Figura 15. Razón <i>Firmicutes/Bacteroidetes</i> en T0 y T2	42
Figura 16. Análisis de varianza multivariado permutacional ADONIS	44
Figura 17. Correlación de la abundancia relativa de <i>Bacteroidetes</i> con hemoglobina glucosilada antes y 4 meses después de tratamiento con metormina.	44
Figura 18. Correlación de la abundancia relativa de los <i>Firmicutes</i> con el porcentaje de hemoglobina glucosilada	45

I. RESUMEN

Estudios tanto en modelos animales como en seres humanos han aportado evidencia de que la composición de la microbiota intestinal (MI) puede contribuir al desarrollo de trastornos metabólicos como la obesidad y la diabetes tipo 2 (DT2). Se ha propuesto que algunos de los cambios descritos en la MI en individuos con DT2 podrían no estar asociados a la diabetes como tal, sino al efecto del tratamiento farmacológico. De manera reciente, se reportó que la metformina induce cambios en la MI que pudieran estar relacionados con su efecto terapéutico. El objetivo de este estudio fue analizar los cambios en la MI en respuesta al tratamiento con metformina en pacientes con diabetes tipo 2 sin tratamiento previo en población de origen maya, y buscar correlaciones entre los cambios en la MI e indicadores de control metabólico. El estudio incluyó 41 pacientes con DT2 de recién diagnóstico. En todos los pacientes se analizaron parámetros antropométricos, hemoglobina glucosilada, perfil de lípidos y microbiota intestinal, antes y 4 meses después de recibir tratamiento con metformina. La MI fue analizada por secuenciación de la región V4 del gen ribosomal 16S utilizando el programa QIIME. El 82.9% de los pacientes tuvieron adecuada adherencia al tratamiento ($\geq 70\%$), y el 44.1% se consideraron no respondedores. Previo al tratamiento, se observó una abundancia relativamente alta de *Protobacteria* (6%), y una abundancia relativa muy baja de *Akkermansia* y *Bifidobacterium*, así como de *E. Coli* e *Intestinibacter*. Un análisis permutacional multivariado reveló que el género del individuo explica el 4.25% de la varianza de la microbiota ($P=0.045$). Las abundancias relativas de *Akkermansia* y *Bifidobacterium* aumentaron después del tratamiento con metformina, sin embargo las diferencias no fueron estadísticamente significativas. De manera interesante, la abundancia de *Firmicutes* previa al tratamiento correlacionó de manera negativa y marginalmente significativa con el cambio en la hemoglobina glucosilada después del tratamiento ($P=0.08$). Estos hallazgos sugieren que la MI presente antes de iniciar el tratamiento puede afectar la respuesta a la metformina. Es necesario realizar más estudios para confirmar estos hallazgos y entender mejor el papel de la MI en la respuesta a la metformina.

II. INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus representa un grave problema de salud pública a nivel mundial, ya que su prevalencia ha incrementado notablemente en las últimas décadas. Por esta razón, es motivo de numerosas investigaciones en distintos campos, que buscan entender la etiología de la enfermedad y mejorar la atención del paciente. Se conoce que factores genéticos y ambientales influyen en el desarrollo de esta patología, y actualmente ha surgido el interés del papel que puede tener la microbiota intestinal en esta enfermedad y en trastornos metabólicos relacionados. Recientemente se reportó que la metformina induce cambios en la microbiota intestinal, que pudieran estar relacionados con su efecto terapéutico. Sin embargo, la relación entre el tratamiento con metformina y la microbiota intestinal sigue siendo poco clara, y los estudios en humanos son escasos.

III. MARCO TEÓRICO

3.1 Definición y diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2 (DT2)

La diabetes es un desorden metabólico de múltiples etiologías, caracterizado por hiperglucemia crónica con alteraciones en el metabolismo de los hidratos de carbono, grasas y proteínas, relacionado con dos eventos: defectos en la secreción de la insulina, defectos en la acción de la insulina o una combinación de ambos (Asociación Latinoamericana de Diabetes ALAD, 2013). La Federación Internacional de Diabetes (IDF por sus siglas en inglés), define el término diabetes mellitus (DM) como una enfermedad crónica degenerativa que se presenta cuando el páncreas no produce suficiente insulina, o bien, la insulina que se produce no es utilizada de manera eficiente por el organismo. La insulina es la hormona responsable de que la glucosa circulante pueda ser transportada hacia el interior de las células y dotar de energía al organismo (IDF, 2013).

La DT2 es un síndrome heterogéneo en el que existe una alteración común que la define: la elevación de la glucemia. Para hacer el diagnóstico, debe medirse la glucemia en ayuno (glucemia basal) en plasma venoso. Puede hacerse una determinación de glucemia en sangre capilar mediante tira reactiva y lectura en reflectómetro, el paciente debe estar en ayunas al

menos 3 horas. Sin embargo, por su variabilidad y menor precisión, se debe confirmar el diagnóstico mediante determinaciones en un laboratorio clínico.

Los criterios diagnósticos propuestos por la Asociación Americana de Diabetes (ADA) en 2014 y aceptados por el comité asesor de la OMS son los siguientes:

- Glucemia basal en plasma venoso ≥ 126 mg/dl (7 mmol/l). Debe realizarse una segunda determinación en un día diferente para confirmar el diagnóstico.
- Síntomas típicos de diabetes y glucemia al azar ≥ 200 mg/dl (11,1 mmol/l). No es necesaria una segunda determinación.
- Glucemia plasmática ≥ 200 mg/dl 2 horas después de la prueba de tolerancia oral a la glucosa (75 g).
- Hemoglobina glucosilada $\geq 6.5\%$ siempre y cuando la prueba sea realizada en laboratorios con metodología y estandarización avalada por la National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP).

3.2 Tipos de Diabetes Mellitus

Los diferentes tipos de diabetes se clasifican de acuerdo a su etiología y características fisiopatológicas. La clasificación de la diabetes contempla tres grupos: 1) Diabetes tipo 1, 2) Diabetes tipo 2 y 3) Diabetes gestacional (Harris & Zimmet, 1997).

- a) Diabetes mellitus tipo 1 (DT1).** La diabetes tipo 1, también conocida como diabetes insulino dependiente, inicia comúnmente desde la infancia y se considera una enfermedad inflamatoria crónica causada por la destrucción específica de las células β en los islotes del páncreas. Estas células tienen como función principal la secreción de insulina hacia el torrente sanguíneo en respuesta al incremento en la glucemia. Es mucho menos frecuente que la DT2, con una incidencia mundial calculada entre 1 y 11 casos por 100,000 habitantes por año. Aunque la predisposición genética es un factor muy importante en la etiología de la DT1, no es suficiente para que se presente la enfermedad, y se conoce poco sobre los factores ambientales que pueden causar autoinmunidad que conllevan a la destrucción de los islotes pancreáticos (Achenbach et al., 2005).

Durante la etapa previa al inicio de la diabetes tipo I, en el 80% de los individuos se detectan anticuerpos contra antígenos citoplasmáticos o membranales de las células β pancreáticas como la descarboxilasa del ácido glutámico 65 y 67 (GAD65 y 67), la proteína de choque térmico 65 (Hsp-65), y contra la insulina (Davis, 2006). Sin embargo, la mayor susceptibilidad para desarrollar diabetes tipo I es conferida por los genes del antígeno leucocitario humano (HLA clase II) del cromosoma 6. Mediante la identificación de estos anticuerpos en personas sanas, se establece el riesgo de desarrollar la enfermedad; por ejemplo, la presencia de anticuerpos contra insulina confiere un riesgo pequeño, mientras que la combinación de anticuerpos contra células de los islotes y contra GAD o contra insulina representa un riesgo alto para desarrollar diabetes tipo I (Davis, 2006).

b) Diabetes mellitus tipo 2 (DT2). La diabetes tipo 2 es el tipo de diabetes más común y por lo general ocurre en adultos, aunque puede iniciar en la adolescencia y en raras ocasiones durante la niñez. En las últimas décadas, su incidencia ha incrementado notablemente a nivel mundial, representando un grave problema de salud pública. Las causas que desencadenan la diabetes tipo 2 son múltiples. Al parecer, influyen diversos factores como la herencia poligénica (en la que participa un número indeterminado de genes), junto con factores de riesgo que incluyen la obesidad, dislipidemia, historia familiar de diabetes, dieta rica en hidratos de carbono, factores hormonales y una vida sedentaria (Sharabi, 2012). Los pacientes presentan niveles elevados de glucosa y resistencia a la acción de la insulina en los tejidos periféricos. Del 80 al 90% de las personas tienen células β sanas con capacidad de adaptarse a altas demandas de insulina mediante el incremento en su función secretora y en la masa celular (Donath et al., 2005). Sin embargo, en el 10 al 20% de las personas se presenta una deficiencia de las células β en adaptarse, lo cual produce un agotamiento celular, con reducción en la liberación y almacenamiento de insulina (Maedler, 2008).

c) Diabetes gestacional. La diabetes gestacional se presenta durante el embarazo, generalmente a partir de las 24-28 semanas de gestación. El embarazo normal se considera un estado diabetogénico o de resistencia progresiva a la insulina debido a los cambios en el patrón de secreción de la insulina y a las modificaciones en la sensibilidad a la acción de la misma. El aumento de estrógenos y progesterona produce hiperplasia

de las células β del páncreas y, por consiguiente afecta el metabolismo de los hidratos de carbono, aumentando la producción de somatostatina coriónica humana placentaria, prolactina, cortisol y glucagón, lo que contribuye a una disminución de la tolerancia a la glucosa y mayor resistencia a la insulina (Guzmán & Madrigal, 2003). La falta de control metabólico en la diabetes gestacional tiene riesgos potenciales tanto para el feto como para la madre. La elevación de la glucemia durante el embarazo puede causar macrosomía fetal y aumenta el riesgo de preeclampsia, que se caracteriza por elevación de la presión arterial, proteinuria y edema en la madre, representando un peligro para la salud de la madre y su hijo (ALAD, 2013).

La diabetes gestacional normalmente desaparece después del nacimiento. Sin embargo, las mujeres que han tenido diabetes gestacional tienen un mayor riesgo de desarrollar diabetes gestacional en embarazos posteriores y de desarrollar diabetes tipo 2. Se ha observado que los bebés que nacen de madres con diabetes gestacional también tienen un mayor riesgo de obesidad y diabetes tipo 2 en la adolescencia o en la edad adulta temprana (ALAD, 2013).

3.3 Epidemiología de la Diabetes Mellitus Tipo 2.

La IDF estimó que en 2013 aproximadamente 8,3% de los adultos o 382 millones de personas padecían DT2 a nivel mundial, y la prevalencia de la enfermedad está aumentando en todos los países. Se calcula que 471 millones de personas padecerán DT2 en 2035. La IDF estimó que 1 de cada 12 personas adultas tiene diabetes, 1 de cada 2 personas con DT2 no sabe que tiene la enfermedad y cada 7 segundos muere una persona por complicaciones de este padecimiento. En América Central y del Sur hay aproximadamente 25 millones de personas con diabetes, con una prevalencia de 9.1%; mientras que en América del Norte y el Caribe hay una prevalencia de 11.4%. Las últimas cifras del Atlas de la Diabetes de la IDF causan preocupación sobre el impacto futuro de la diabetes como una de las principales amenazas para el desarrollo mundial (IDF, 2015).

México tiene condiciones de alto riesgo debido a los estilos de vida poco saludables, y la alta prevalencia de obesidad y sobrepeso, principal factor de riesgo modificable de la diabetes. De acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud de Medio Camino 2016, la prevalencia de

diabetes en México ha ido en aumento, 6.5 millones de personas (9.4% de la población) habían sido diagnosticadas con la enfermedad (ENSANUTMC, 2016) (Figura 1). En el estado de Yucatán, la prevalencia de diabetes fue de 9.2% en 2012, mayor a la reportada en la ENSANUT 2006 (5.4%). En México la diabetes afecta principalmente a la población de bajos recursos económicos, asentada en las áreas urbanas, en donde el estilo de vida determina las conductas alimentarias. La OMS considera al estilo de vida como “la manera general de vivir que se basa en la interacción entre las condiciones de vida y los patrones individuales de conducta, los cuales están determinados por factores socioculturales y por características personales de los individuos” (ALAD, 2013).

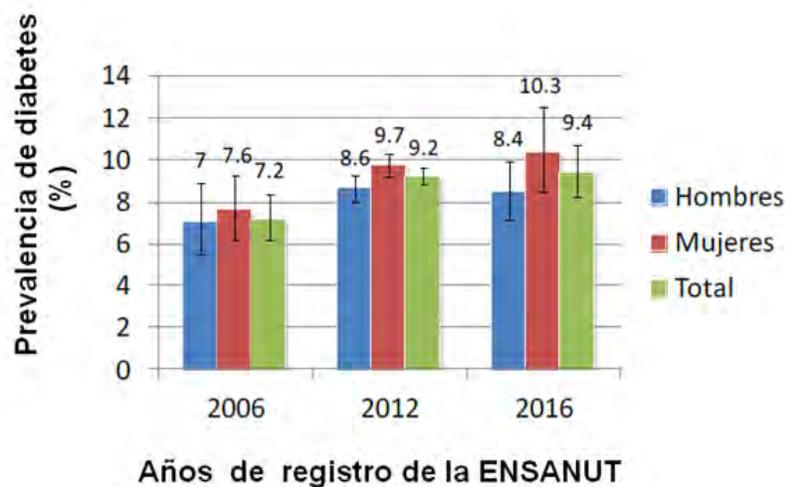


Figura 1. Prevalencia de diagnóstico médico previo de diabetes por sexo

3.4 Fisiopatología de la Diabetes Mellitus Tipo 2.

La homeostasis de la glucosa está controlada por tres mecanismos coordinados: la secreción de insulina, la captación de glucosa por músculo e hígado y la supresión de la producción de glucosa en el hígado (Briceño et al., 2007). La insulina es la hormona responsable de que la glucosa circulante pueda ser transportada hacia el interior de las células y dotar de energía al organismo (IDF, 2013). Como se había mencionado anteriormente, la diabetes es causada por defectos en la secreción de la insulina, defectos en la acción de la insulina o una combinación de ambos (ALAD, 2013).

Secreción de Insulina: La insulina es secretada por las células β de los islotes de Langerhans del páncreas, y es regulada por nutrientes, neurotransmisores y hormonas. Entre estos tres factores, los nutrientes, particularmente la glucosa, son la señal estimulante más dominante para la secreción de insulina. La secreción de insulina es bifásica con una primera fase aguda que ocurre dentro de los primeros 10 minutos después de una carga de glucosa y una segunda fase más sostenida que alcanza una meseta muy rápidamente (Gerich, 1998). Los nutrientes, la glucosa, los aminoácidos, los ácidos grasos y los cuerpos cetónicos favorecen la secreción de insulina, al igual que la activación del receptor β_2 -adrenérgico y la estimulación del nervio vago, mientras que los receptores α_2 -adrenérgicos inhiben la liberación de insulina (Santulli et al., 2012).

La liberación de insulina en respuesta a la glucosa es proporcional a la glucemia, que a su vez es regulada por la absorción intestinal, la producción y liberación hepática de glucosa y el metabolismo de los tejidos periféricos. Un modelo reciente para explicar el mecanismo de secreción de la insulina estimulada por la glucosa sustenta que la glucosa entra en las células beta a través del transportador de glucosa de alta capacidad 2 (GLUT2). A través de la acción de la glucocinasa, se convierte en glucosa 6 fosfato (G6P), que es el paso limitante de la glucólisis. La G6P entra a la vía de glucólisis para producir piruvato. Esta molécula entra al ciclo de Krebs donde produce ATP. El aumento en relación ATP/ADP en el citosol promueve el cierre de los canales de potasio sensibles al ATP (canales K_{ATP}), y el aumento de potasio intracelular causa la despolarización de la membrana de las células beta y la activación de los canales de Ca^{2+} dependientes del voltaje. La apertura de estos canales de calcio facilita la afluencia de Ca^{2+} extracelular, lo que conduce a un aumento en niveles de Ca^{2+} citosólico en la célula beta, lo que desencadena la exocitosis de la insulina contenida en vesículas (Zhuo et al., 2013).

Este mecanismo denominado "dependiente del canal K_{ATP} " parece ser particularmente importante para la primera fase aguda de la liberación de insulina. Sin embargo, en la segunda fase más sostenida de la secreción de insulina, una vía "independiente del canal K_{ATP} " parece desempeñar un papel clave en la regulación de la secreción de insulina en conjunción con la vía dependiente del canal K_{ATP} (Ravier et al., 2009) (Figura 2).

Acción Periférica de la Insulina: La insulina circulante, a través de la unión a su receptor, aumenta la captación de glucosa en el músculo y el tejido adiposo, inhibe la producción hepática de glucosa, estimula la glucólisis, la lipogénesis, la glucogénesis y la síntesis de proteínas e inhibe la β -oxidación de ácidos grasos, la glucogenólisis y la proteólisis (Cline et al., 1999).

Cuando la insulina se une a su receptor en células del músculo, inicia una serie de vías de señalización complejas que permiten la translocación del transportador GLUT4 localizado en vesículas hacia la membrana plasmática para llevar a cabo su función de transportar la glucosa hacia el interior de la célula (Chen et al., 2012). La señalización del receptor termina cuando es fosforilado en los residuos de serina/treonina en la región intracelular para su desensibilización, y finalmente esto permite la internalización del receptor (Stöckli, 2009).

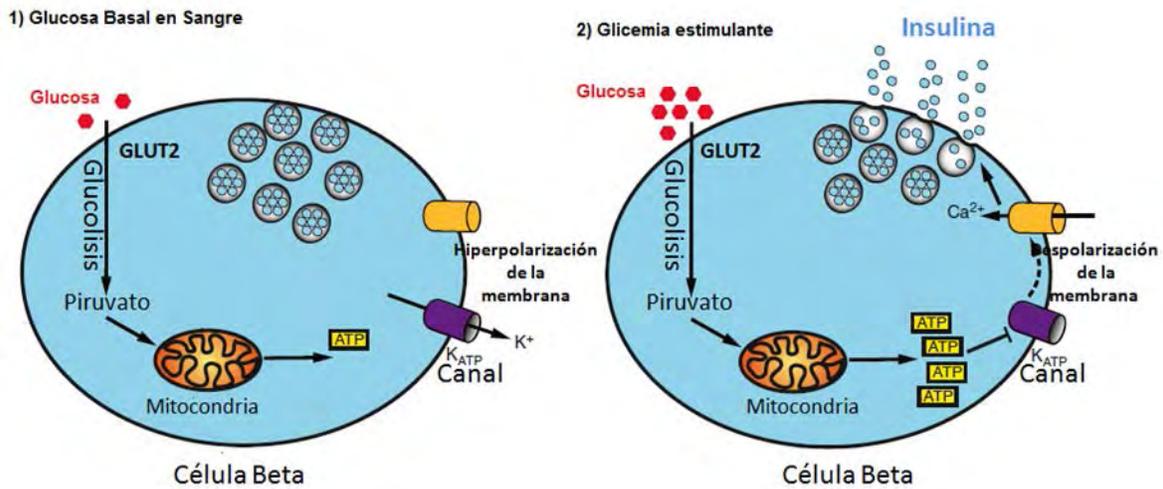


Figura 2. Mecanismos de secreción de la insulina modificado de Cantley and Ashcroft (2015).

3.5 Hiperinsulinemia y resistencia a la insulina

La resistencia a la insulina se define como la incapacidad genética o adquirida de los tejidos periféricos de responder normalmente a la acción de la hormona circulante. La resistencia a la insulina conlleva primero a la hiperinsulinemia compensatoria con euglucemia, que posteriormente puede ser insuficiente para mantener la euglucemia, apareciendo la hiperglicemia. La insulino-resistencia puede inferirse por la presencia de concentraciones elevadas de insulina en ayunas, sin hipoglucemia concomitante (Serrano et al., 2005).

La resistencia a la insulina, considerada como la plataforma más constante para el síndrome metabólico y el desarrollo de DT2, resulta de un mecanismo complejo y multifactorial que se asocia con múltiples alteraciones en diferentes niveles de la señalización de la insulina. Procesos como la inflamación, el estrés del retículo endoplásmico y la disfunción mitocondrial constituyen mecanismos clave asociados al desarrollo de la resistencia a la insulina. A nivel molecular, esta deficiente señalización puede ser causada por diferentes alteraciones, incluyendo mutaciones y/o modificaciones postraduccionales del receptor de insulina, de sustratos del receptor de la insulina (IRS) o de otras moléculas efectoras río abajo. Entre las alteraciones más comunes se encuentran la disminución en el número de receptores de insulina y de su actividad catalítica, el aumento en el estado de fosforilación en residuos de Ser/Thr del receptor de insulina y del IRS, el aumento en la actividad de fosfatasa de residuos de Tyr, la disminución de la actividad de cinasas y defectos en la expresión y función del receptor GLUT-4 (Gutiérrez-Rodelo et al., 2017).

3.6 Etiología de la diabetes mellitus tipo 2

La diabetes mellitus tipo 2 es una enfermedad de etiología compleja, donde intervienen factores tanto genéticos como ambientales.

a) Factores genéticos Una gran cantidad de estudios han demostrado que factores genéticos y ambientales contribuyen al desarrollo de la diabetes, se calcula de manera global la heredabilidad de la DT2 es alrededor del 50% (Das et al. 2006). Los esfuerzos iniciales para identificar genes de susceptibilidad para la DT2 se basaron en análisis de ligamiento en familias y estudios de genes candidatos, con resultados modestos. Los estudios de asociación de genoma completo (GWAS por sus siglas en inglés) han identificado más de 78 loci de riesgo para desarrollar DT2, y aunque esto representa un gran avance en el área de la medicina, solo explican una pequeña parte de la heredabilidad estimada para la DT2 . La utilización de esta información genética aún se encuentra en etapas tempranas (Esparza-Castro et al., 2015).

La mayoría de los loci de susceptibilidad confieren riesgo a través de la función de las células beta del páncreas como lo son: KCNJ11, TCF7L2, WFS1, HNF1B, IGF2BP2, CDKN2A-

CDKN2B, CDKAL1, SLC30A8, HHEX/IDE, KCNQ1, THADA, TSPAN8/ LGR5, CDC123/CAMK1D, JAZF1, MTNR1B, DGKB/TMEM195, GCK, PROX1, ADCY5, SRR, CENTD2, ST6GAL1, HNF4A, KCNK16, FITM2- R3HDML-HNF4A, GLIS3, GRB14, ANK1, BCAR1, RASGRP1 y TMEM163 (Steinthorsdottir et al., 2007; Saxena et al. 2012), o aquellos relacionados directamente con la acción de la insulina como PPAR γ , ADAMTS9, IRS1, GCKR, RBMS1/ ITGB6, PTPRD, DUSP9, HMGA2, KLF14, GRB14, ANKRD55 y GRK536-39. Aunque el FTO y el MC4R se han asociado más a obesidad, se conoce también su influencia para el desarrollo de (Binh et al., 2013).

Cabe mencionar que la mayoría de los GWAS en pacientes con DT2 se han realizado en poblaciones de ancestría europea. La mayoría de los polimorfismos descritos en estas poblaciones también se asocian a DT2 en la población mexicana. Sin embargo, se han identificado algunos genes nuevos de susceptibilidad en nuestra población como la variante R230C del gen ABCA1 (Villarreal-Molina et al., 2008), SLC16A11 (SIGMA Diabetes Type 2 Consortium, 2014) y el polimorfismo Gly972Arg del gen IRS1 asociado a DT2 en individuos delgados (Burguete-García et al., 2010).

b) Ambiente (Estilo de Vida): En las últimas décadas las enfermedades metabólicas como el sobrepeso, la obesidad y el síndrome metabólico se han convertido en un gran problema mundial por su magnitud. La obesidad es uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de la DT2. Este aumento en la prevalencia de obesidad coincide con cambios importantes en el estilo de vida durante las últimas décadas, principalmente en el estilo de vida sedentario y hábitos dietéticos inadecuados, así como el consumo de sustancias tóxicas como el alcohol y el tabaco, que influyen en gran manera en el desarrollo de la enfermedad y la aparición temprana de complicaciones que perjudican gravemente el bienestar físico y emocional del individuo (Ramírez Ordoñez et al., 2011; Salas-Salvado et al., 2011).

3.7 Microbiota Intestinal

El cuerpo humano está habitado por una gran diversidad de bacterias y arqueas, así como hongos, protozoos y virus. Estos microorganismos habitan en varios nichos dentro de las diferentes partes del cuerpo humano y son colectivamente conocidos como la microbiota

humana, mientras que sus genomas colectivos forman el metagenoma humano (Hooper & Gordon, 2001). El término microbioma lo acuñó en 2001 Joshua Lederberg, biólogo molecular que realizaba estudios genéticos en bacterias. Originalmente, el término “microbioma” se refiere al conjunto de genes de nuestros microorganismos comensales que forman la microbiota, pero hoy en día ambos términos se usan como sinónimos (Lederberg & McCray, 2001).

Se define como microbiota intestinal (MI) al conjunto de microorganismos que están en el intestino humano y que establecen relaciones simbióticas entre ellos y el huésped. Este ecosistema es parcialmente responsable del mantenimiento de la salud del huésped. La densidad microbiana en las zonas proximal y media del intestino delgado es relativamente baja, pero aumenta en gran medida en la parte distal de éste y en el colon. El número de bacterias alcanza valores diez veces superiores al de células del organismo, lo que constituye colectivamente un órgano activo, cuyo metabolismo influye de forma decisiva en el mantenimiento de la homeostasis del individuo (Hooper et al, 2002).

La microbiota intestinal humana está representada por varios phyla o filotipos: los *Firmicutes* y *Bacteroidetes* con una abundancia media del 38.8% y 27.8% respectivamente, seguidos de los phyla *Actinobacteria* 8.2%, *Proteobacteria* 2.1%, *Verrucomicrobia* 1.3% y *Euryarchaeota* 0.9% (Arumugam et al., 2011). El phylum *Firmicutes* comprende alrededor de 274 géneros donde predominan los gram-positivos. Está dividido en tres clases: *Clostridia* (anaerobios), Bacilli (facultativos: *Lactobacillus* y *Enterococcus*) y *Mollicutes*. El phylum *Bacteroidetes* está compuesto por tres grandes clases de bacterias gram-negativas: *Cytophaga*, *Flavobacterium* y *Bacteroidetes*. Dentro de la clase *Bacteroidetes*, el género *Bacteroides* es el que tiene mayor representación de este phylum en el intestino humano. En tercer lugar, el phylum *Actinobacteria* comprende bacterias gram-positivas e incluye el género *Bifidobacterium*, que es ampliamente utilizado como probiótico. Cada uno de estos phyla está representado en la microbiota intestinal por una serie de géneros bacterianos específicos (Greiner & Bäckhed, 2011)

La composición y actividad de la microbiota intestinal se codesarrolla en el huésped desde el nacimiento y está sujeta a una interrelación compleja que depende del genoma del huésped, de la nutrición y del estilo de vida. La microbiota intestinal está involucrada en la regulación de

múltiples vías metabólicas del huésped, dando lugar a interacciones con el huésped en procesos metabólicos, de señalización y de inmunidad, lo que conecta al intestino fisiológicamente con el hígado, el músculo y el cerebro (Qin et al., 2010).

3.8 Función de la microbiota

La microbiota interviene en gran cantidad de procesos que afectan a la salud del huésped por lo que conocer su funcionamiento puede ser de utilidad para conocer y/o evitar ciertas enfermedades. La microbiota intestinal tiene una relación de simbiosis con su huésped y en él desempeña tres importantes funciones que son: funciones metabólicas, funciones protectoras y funciones tróficas (Prakash et al., 2011).

3.9 Funciones metabólicas de la MI

La microbiota intestinal participa en la adquisición de nutrientes, almacenamiento de energía, y también participa en un gran número de vías metabólicas del huésped (Nicholson et al., 2012). También puede afectar al metabolismo de todo el organismo y alterar los parámetros fisiológicos en múltiples compartimentos corporales (Zhao et al., 2010). Así, la microbiota intestinal es importante para el mantenimiento de la homeostasis.

a) Microbiota intestinal y su función en el metabolismo de los hidratos de carbono.

Los hidratos de carbono son un componente alimentario fundamental para los humanos. El organismo humano absorbe azúcares simples como la glucosa y galactosa en el yeyuno proximal, a través de transportadores glucídicos específicos con ayuda de enzimas que hidrolizan disacáridos (sacarosa, lactosa, maltosa) y los almidones a sus monosacáridos constituyentes. Sin embargo, la capacidad para hidrolizar otros polisacáridos es limitada. Un ejemplo son gran parte de los polisacáridos de plantas como la celulosa, xilano, pectina y almidón. Estos polisacáridos llegan a las comunidades microbianas en el intestino distal, que contienen genes que codifican para una variedad de enzimas que permiten la degradación de una

gran variedad de polisacáridos de la dieta, sin tener que desarrollar enzimas complejas para este fin (Cantarel et al., 2012).

Los géneros de bacterias intestinales se pueden clasificar con respecto a su capacidad para utilizar los hidratos de carbono, derivados tanto de la dieta como del huésped (Calvani et al., 2010). Se ha demostrado que el género *Bacteroidetes* asimila fácilmente hidratos de carbono de la dieta. Sin embargo, en situaciones de inanición de hidratos de carbono, estas bacterias intestinales pueden catabolizar mucinas en el tracto gastrointestinal como fuente de hidratos de carbono, lo cual podría comprometer la capa de mucosa adyacente al epitelio (Sonnenburg et al., 2005). Además de los *Bacteroides*, las cepas del género *Bifidobacterium* contienen genes que codifican enzimas que pueden degradar glicanos derivados del huésped que les permiten adquirir nutrientes. Además, las bacterias intestinales han desarrollado la capacidad de degradar numerosos glucoconjugados como glucosaminoglucanos de plantas incluyendo celulosa, sulfato de condroitina, ácido hialurónico, mucinas y heparina (Turroni et al., 2010).

b) Microbiota intestinal y su función en el metabolismo de ácidos grasos. Las bacterias intestinales producen una amplia gama de ácidos grasos que pueden tener efectos benéficos para la salud. Las bifidobacterias intestinales producen ácido linoleico conjugado (CLA), que en modelos murinos parece modular la composición de ácidos grasos en el hígado y el tejido adiposo (O'Shea et al., 2012). Además de los ácidos grasos conjugados y libres, las bacterias intestinales generan ácidos grasos libres de cadena corta (AGCC) es decir, acetato, butirato y propionato mediante la fermentación de hidratos de carbono de la dieta (fibra), que los seres humanos no pueden digerir por sí mismos. En el modelo murino, se demostró que los ratones libres de gérmenes están desprovistos de AGCC, lo que indica la importancia de la flora intestinal en la producción de AGCC en el intestino (Martin et al., 2008). El acetato es el tipo dominante de ácido graso de cadena corta en seres humanos, que tiene un papel interesante en la modulación de la actividad de la proteína cinasa activada por AMP y la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo. Los AGCC tales como el propionato

se pueden utilizar para la síntesis de novo de glucosa o lípidos y servir como fuente energética para el huésped (Cho et al., 2012).

c) Microbiota intestinal y metabolismo de aminoácidos. Algunos microorganismos como las bifidobacterias y los lactobacilos producen compuestos biológicamente activos derivados de aminoácidos, que incluyen una variedad de aminas biogénicas mediante diferentes enzimas microbianas. Las descarboxilasas de aminoácidos son muy abundantes, y al combinarse con el sistema de transporte de aminoácidos, enlaza a los compuestos dietarios con el metabolismo microbiano y con la señalización de la mucosa intestinal. Por ejemplo, *L. reuteri*, es capaz de convertir la L-histidina de la dieta en histamina mediante la histidina descarboxilasa, que está presente en algunas bacterias fermentativas incluyendo los lactobacilos probióticos. La señal inmunorreguladora de la histamina puede suprimir la producción de la citoquina proinflamatoria TNF a través de receptores de histamina tipo 2 en el epitelio intestinal (Thomas et al., 2012). La identificación de estos metabolitos bacterianos bioactivos y sus correspondientes mecanismos de acción con respecto a la inmunomodulación puede conducir a mejores estrategias antiinflamatorias para enfermedades crónicas mediadas por el sistema inmune.

3.10 Funciones protectoras de la MI

Se han descrito múltiples mecanismos por los que la MI protege al huésped de infecciones oportunistas, como la competencia por sitios de adhesión, la competencia por nutrientes, la producción de condiciones ambientales hostiles para el crecimiento de patógenos que involucran cambios en el pH, la producción de compuestos antimicrobianos (desde metabolitos tóxicos hasta sustancias bactericidas) y la generación de señales que intervienen en la expresión génica (Ouwehand et al., 2006). El epitelio intestinal tiene una barrera secretora que evita que las bacterias patógenas entren en contacto con la superficie de los enterocitos, y representa una barrera física por medio de una capa de moco epitelial, regula la tasa de recambio de los enterocitos, promueve el desarrollo y diferenciación de las células epiteliales, fortifica la barrera intestinal y mantiene el buen funcionamiento de la inmunidad de la mucosa intestinal mediante la inducción de la secreción de IgA (Mahida et al., 2004). Desde

el punto de vista del huésped, la unión física, química e inmunitaria de la barrera intestinal es un pilar en el mantenimiento de las poblaciones microbianas y de los efectos benéficos en la salud que ello conlleva (Yu et al., 2012).

Las bacterias también desempeñan un papel esencial en el desarrollo del sistema inmune. Los animales criados en condiciones de asepsia estricta muestran baja concentración de células linfoides en la mucosa del intestino delgado, la estructura de los folículos linfoides está atrofiada y la concentración de inmunoglobulinas circulantes es muy baja. Inmediatamente después de la exposición a la microbiota convencional, aumenta el número de linfocitos de la mucosa, los centros germinales crecen en número y tamaño, apareciendo rápidamente en los folículos linfoides y células productoras de inmunoglobulinas, y observándose un aumento en las concentraciones séricas de inmunoglobulinas (Yu et al., 2012).

3.11 Funciones tróficas de la MI

Las bacterias intestinales pueden controlar la proliferación y la diferenciación de las células epiteliales (Falk et al., 1998). En animales criados con estrictas condiciones de asepsia se observa una disminución del recambio de células epiteliales en comparación con animales control colonizados por microbiota convencional. La diferenciación celular en el epitelio es regulada en gran medida por la interacción con los microorganismos residentes como se demuestra por la expresión de una diversidad de genes en los animales asociados a cepas bacterianas específicas (Hooper & Gordon,, 2001) .

3.12 Factores que influyen sobre la composición de la microbiota intestinal

El primer factor que influye sobre la composición y diversidad de la microbiota intestinal es la forma de nacimiento (parto o cesárea), ya que al nacer el tracto gastrointestinal se coloniza inmediatamente. Además el tipo de alimentación del lactante (seno materno o fórmula) determina diferencias en la microbiota intestinal (Penders et al., 2006). Los perfiles fecales microbianos del lactante muestran semejanzas con los perfiles bacterianos del canal de parto y de la leche materna. Durante la infancia y a lo largo de la vida, la composición microbiana

también cambia de acuerdo con la edad y la dieta. En los primeros 2 años de vida, la microbiota está dominada por las bifidobacterias. Posteriormente, la composición microbiana se diversifica y alcanza su máxima complejidad en el adulto, con cientos de filotipos dominados por *Bacteroidetes* y *Firmicutes* (Rajilic-Stojanovic et al., 2009). Una vez establecida la microbiota en un individuo, suele permanecer estable en el tiempo. Las características de la dieta también son importantes para el mantenimiento de la composición microbiana del intestino, los hábitos alimenticios de una persona pueden explicar hasta el 57% de la variación en la microbiota intestinal esto indica que la dieta juega un papel importante en el cambio de poblaciones clave de la microbiota intestinal pudiendo transformar el fenotipo saludable en una entidad inductora de enfermedad o viceversa (Brown et al., 2012).

3.13 Microbiota y obesidad

Ya se ha mencionado que la prevalencia de la obesidad ha ido en constante aumento en las últimas décadas. Aunque la obesidad resulta de un desbalance entre el consumo y gasto de energía, de manera más reciente se ha propuesto que la microbiota intestinal puede ser otro factor que contribuye a que se desarrolle esta condición. Algunos estudios han encontrado un aumento en la razón *Firmicutes/Bacteroidetes* en la microbiota intestinal de humanos y ratones obesos (Ley et al., 2006), pero otros estudios no han podido confirmar esta observación (Duncan et al., 2008). Sin embargo, más consistentemente, la mayoría de los estudios informan que la microbiota intestinal de individuos obesos tiene menor diversidad filogenética y un número reducido de genes bacterianos en comparación con los sujetos no obesos (Turnbaugh et al., 2009). Además, la baja riqueza microbiana también se ha correlacionado con otros parámetros metabólicos tales como los niveles de insulina sérica, resistencia a la insulina (HOMA-IR) y niveles de ácidos grasos libres y triglicéridos en el plasma (Le Chatelier 2013). Aunque no se entiende del todo cómo la microbiota intestinal puede influir en la obesidad, su papel en el desarrollo de esta enfermedad se puede deducir de los experimentos de trasplante fecal. El trasplante de microbiota fecal de ratones obesos a ratones no obesos libres de gérmenes resultó en un fenotipo obeso de los ratones receptores, mientras que los ratones que recibieron la microbiota intestinal de ratones delgados permanecieron delgados (Turnbaugh et al., 2006; Turnbaugh et al., 2009).

3.14 Microbiota y diabetes tipo 2

La microbiota y sus alteraciones también parecen estar implicados en la patogénesis de diversas enfermedades como las enfermedades gastrointestinales, cáncer y algunos trastornos metabólicos como la diabetes mellitus (Hooper, 2002). Desde el punto de vista metabólico, la microbiota intestinal puede modular la acumulación de lípidos, el contenido de lipopolisacáridos y la producción de ácidos grasos de cadena corta, que afectan la señalización de la insulina.

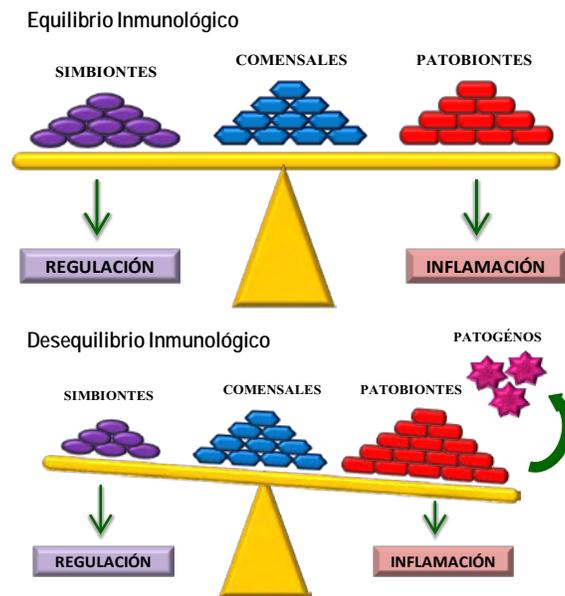


Figura 3. Descripción de disbiosis, (Modificada de Round & Mazmanian, 2009)

Los primeros estudios que reportan cambios en la microbiota intestinal asociados a la DT2 no tomaron en cuenta la posibilidad del efecto del tratamiento farmacológico en la microbiota. Sus hallazgos se resumen en la Tabla 1. Estos estudios se realizaron en diferentes tipos de poblaciones y utilizaron diferentes métodos para el análisis de la microbiota intestinal, lo cual podría explicar algunas de las diferencias en sus resultados. Larsen et. al. (2010) observaron que los pacientes con diabetes presentaban un aumento en la abundancia relativa de *Firmicutes* y *Betaproteobacterias*, y una disminución en la abundancia relativa de la clase *Clostridiales*. Qin et al. (2012) reporta que existe una disbiosis moderada en pacientes chinos con diabetes y registraron un aumento en la abundancia de bacterias productoras de butirato y bacterias oportunistas como *Clostridium* y *Akkermansia muciniphila*. Además, un análisis

de las funciones de genes bacterianos mostró un aumento de las funciones en el intestino en respuesta al estrés oxidativo. En mujeres europeas mayores de 70 años, Karlsson et al. (2013) encontraron una mayor abundancia relativa de *Lactobacillus* en DT2, que correlacionó positivamente con glucosa y hemoglobina glucosilada; además de una menor abundancia relativa de *Clostridium* que correlacionó negativamente con la glucemia, hemoglobina glucosilada, insulina, péptido C y triglicéridos. Por último Sato et al. (2014) en pacientes japoneses con DT2 observó un aumento en la abundancia relativa de *Lactobacillus* y observaron la presencia de bacteremia, por lo que sugieren una translocación de bacterias del intestino al torrente sanguíneo. Estos resultados sugieren que hay un cierto grado de disbiosis en el intestino de los pacientes con diabetes, aunque hay diferencias en las especies alteradas (Figura 3). Estas diferencias podrían ser atribuibles a las diferencias en localizaciones geográficas, edad, género, población, hábitos alimenticios, e incluso en cuestiones metodológicas o experimentales.

Tabla 1.

Primeros Estudios Reportando Alteraciones en la Microbiota Intestinal en Diabetes Mellitus Tipo 2

POBLACIÓN	MÉTODO	CAMBIOS EN LA MICROBIOTA EN DT2	OTROS HALLAZGOS	REFERENCIA
18 hombres con diagnóstico de DT2 18 controles	qPCR Pirosecuenciación del gen 16s rRNA	↓% <i>Phylum Firmicutes</i> ↓% <i>Clase Clostridia</i> ↑ <i>Betaproteobacteria</i> en diabéticos	<ul style="list-style-type: none"> Bacteroidetes/Firmicutes correlaciona con glicemia. Bacteroidetes Prevotella/ C coccoides correlaciona con Glicemia. 	Larsen et. al., 2010
145 mujeres europeas mayores de 70 años: <ul style="list-style-type: none"> 53 con DT2 49 con Intolerancia Glucosa 43 con tolerancia glucosa normal 	Metagenoma	↑ <i>Lactobacillus</i> ↓ <i>Clostridium</i> en el grupo DT2.	<ul style="list-style-type: none"> Abundancia de <i>Lactobacillus</i> correlaciona (+) con glucosa y HbA1c. Abundancia de <i>Clostridium</i> correlaciona (-) con glucosa, HbA1c, insulina, péptido C, TG. Modelo matemático para MI identifica en mujeres Europeas, pero no en chinos. 	Karlsson et. al., 2013
345 Chinos (ambos sexos): <ul style="list-style-type: none"> 71 con DT2 74 Controles 100 con (MetaHit) 100 controles (MetaHit) 	Estudio de Asociación de Metagenoma (casos vs controles, 2 etapas)	Disbiosis Moderada ↑ Bacterias productoras de Butirato ↑ Bacterias oportunistas (<i>Bacteroides caccae</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Akkermansia muciniphila</i> , <i>Desulfovibrio sp. 3_1_syn3</i>)	El análisis de las funciones de genes bacterianos indica que hay un aumento de las funciones relativas en el intestino en respuesta al estrés oxidativo.	Qin et. al., 2012
100 japoneses (ambos sexos). 50 50 controles	PCR (RT-qPCR) Analizan bacterias en heces y sangre	↑ <i>Lactobacillus</i> en los diabéticos	Se detectaron bacterias en sangre en una proporción más alta de casos (gram +). Sugiere una translocación de bacterias del intestino al torrente sanguíneo.	Sato et al., 2014

3.15 Metformina en el tratamiento de la diabetes tipo 2

La metformina se usa comúnmente como la primera línea de medicamentos para el tratamiento del síndrome metabólico y la DT2. La metformina es un agente antidiabético común de la clase biguanida y es conocido por disminuir la producción de glucosa en el hígado, aumentar la sensibilidad a la insulina, y mejorar la captación periférica de glucosa en el músculo esquelético y hepático (Rotella et al., 2006). Se ha descrito que la metformina también reduce los niveles de triglicéridos y de colesterol LDL en diabéticos y que tiene efectos favorables en el peso corporal y en los niveles plasmáticos de lípidos (Nathan et al., 2009).

El mecanismo de acción mejor estudiado de la metformina en el organismo humano es el aumento de la actividad de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK). Esta enzima juega un papel importante en el equilibrio de energía y el metabolismo de la glucosa, porque regula positivamente la oxidación de ácidos grasos y la absorción de glucosa en el músculo, inhibe la síntesis de ácidos grasos y la gluconeogénesis en el hígado. Además, mantiene la relación AMP / ATP en la célula mediante el aumento de consumo de ATP y la disminución de la producción de ATP, que se asocia con la activación de AMPK (Hardie et al., 2012), y regula la gluconeogénesis hepática (Kim et al., 2008).

3.16 Metformina y microbiota intestinal

Algunos estudios han evaluado si la metformina podría ejercer un efecto metabólico favorable a través de la modificación de la microbiota intestinal. Shin et al., (2014) observaron que el tratamiento con metformina en ratones con obesidad inducida por dieta dio como resultado modificaciones en la abundancia de 29 géneros de la MI y también observaron un aumento marcado en la abundancia de la bacteria *Akkermansia muciniphila*, que a su vez se asoció con un incremento de células caliciformes productoras de mucina en el epitelio intestinal. Además, la administración oral de *Akkermansia* a ratones con dieta alta en grasa, aún en ausencia de metformina, mejoró significativamente la tolerancia a la glucosa.

Lee y Ko (2014) estudiaron cambios en el perfil metabólico y en la MI inducidos por el tratamiento con metformina en ratones con obesidad por una dieta alta en grasas. En los ratones con obesidad se observó un perfil metabólico favorable después del tratamiento con metformina, mientras que los ratones con dieta normal no presentaron cambios significativos en los parámetros metabólicos. En lo que se refiere a la MI, la metofmina causó una disminución en la diversidad alfa y en la diversidad beta en los ratones con obesidad. Además, la metformina modificó la relación Firmicutes/Bacteroidetes, indujo un aumento en la abundancia relativa de los phyla *Bacteroidetes* y *Verrucomicrobia*, y causó un aumento significativo en las abundancias relativas de *Akkermansia* y *Clostridium coleatum*. También observaron que en cultivos bacterianos la metformina induce el crecimiento acelerado de *Akkermansia muciniphila*. Estos autores sugieren que es importante seguir estudiando el papel que juega esta bacteria en la MI debido a que los cambios en la microbiota intestinal correlacionaron con un mejor perfil metabólico.

Napolitano et al. (2014) administraron metformina por dos vías a personas con diabetes tipo 2 y demostraron que los efectos de la metformina para bajar los niveles de glucosa no son exclusivamente por la activación de la enzima AMPK. Reportaron que la metformina tiene efectos sobre el metabolismo de ácidos biliares, debido a que inhibe su reabsorción mediante la alteración de la función del transportador intestinal. También reportaron que la metformina tiene efecto sobre la secreción de hormonas entero-endócrinas y activa los receptores FXRs y TGR5 que actúan en el intestino y el hígado por la secreción de ácidos biliares. La metformina también indujo cambios en la microbiota intestinal, principalmente afectó la razón *Firmicutes/Bacteroidetes* que correlacionó favorablemente con los niveles de glucosa y HDL en suero de los pacientes. Estos cambios en la microbiota intestinal podrían ser el resultado de fluctuaciones en las concentraciones de ácidos biliares primarios, que no excluye la posibilidad de un ciclo de retroalimentación entre el ácido cólico y la relación de *Bacteroidetes* y *Firmicutes*.

Más recientemente, Forslund et al., (2015) presentó datos de un meta análisis en humanos que sugiere que los medicamentos antidiabéticos podría estar confundiendo los cambios en microbiota intestinal previamente reportados en DT2, por lo que propusieron analizar con detalle los efectos de la metformina sobre la microbiota. En este estudio transversal, tomando

el tratamiento como una variable confusora, los autores reportan que los pacientes con diabetes tienen una depleción de taxa que producen butirato como *Roseburia* spp., *Subdoligranulum* spp. y *Clostridiales* spp. además de cambios en la abundancia de varios *Firmicutes* no clasificados. El tratamiento con metformina se asoció con un aumento significativo de *Escherichia* spp. y una disminución en la abundancia de *Intestinibacter* spp., además de cambios en *Firmicutes*. Los cambios en la composición y funcionalidad de la microbiota intestinal en los pacientes con tratamiento podrían estar relacionados a efectos secundarios gastrointestinales de la metformina. Los resultados indican la mediación parcial de ambos efectos: terapéuticos y adversos del antidiabético.

De la Cuesta-Zuluaga y colaboradores (2017) compararon la microbiota intestinal en 28 pacientes con diabetes mellitus (14 con y 14 sin tratamiento con metformina), y 84 controles pareados por edad, género e índice de masa corporal, y reportaron una asociación entre la diabetes y la microbiota intestinal modificada por el uso de metformina. Los participantes diabéticos tratados con metformina tuvieron mayor abundancia relativa de *Akkermansia muciniphila* en comparación con los controles sanos, así como mayor abundancia de varios géneros productores de AGCC, como *Butyrivibrio*, *Bifidobacterium bifidum*, *Megasphaera* y una unidad taxonómica operativa de *Prevotella*. En contraste, los pacientes con diabetes sin tratamiento con metformina tenían mayor abundancia relativa de *Clostridiaceae* y una unidad taxonómica operativa distinta de *Prevotella*, así como menor abundancia de *Enterococcus casseliflavus* en comparación con los pacientes con diabetes sin tratamiento con metformina.

Wu et al. (2017) fueron los primeros en hacer un estudio doble ciego, donde analizaron pacientes diabéticos sin tratamiento previo, haciendo una intervención con metformina en un grupo, y placebo en otro grupo. Encontraron que el tratamiento con metformina cambió significativamente la abundancia relativa de 86 cepas bacterianas, la mayoría de las cuales pertenecían a las gamma-proteobacterias y a los *Firmicutes*. Encontraron además un aumento de *Escherichia* y una disminución de la abundancia relativa de *Intestinibacter*. Realizaron además transferencia de muestras fecales de donantes tratados con metformina (obtenidas antes y 4 meses después del tratamiento) a ratones libres de gérmenes y se demostró que la tolerancia a la glucosa mejoró en ratones que recibieron la microbiota alterada con metformina. Además investigaron directamente las interacciones metformina-

microbiota en un simulador de intestino, y demostraron que la metformina afectó las vías con funciones biológicas comunes en especies de dos phyla diferentes, y muchos de los genes regulados por metformina en estas especies codificaban metaloproteínas o transportadores de metales.

En su conjunto, estos hallazgos apoyan la idea de que la microbiota intestinal puede mediar algunos de los efectos antidiabéticos de la metformina.

IV. JUSTIFICACIÓN

Varios estudios indican que la composición de la microbiota intestinal puede contribuir al desarrollo de trastornos metabólicos. También se ha reportado que la metformina induce cambios en la microbiota intestinal, que pudieran estar relacionados con su efecto terapéutico. Se ha propuesto que algunos de los cambios reportados en la microbiota intestinal en individuos con DT2 podrían no estar asociados a la diabetes como tal, sino al efecto del tratamiento farmacológico. Sin embargo, la relación entre el tratamiento con metformina y la microbiota intestinal sigue siendo poco clara, y los estudios en humanos son escasos.

V. OBJETIVO GENERAL

Analizar cambios en la microbiota intestinal en individuos con diagnóstico reciente de diabetes mellitus tipo 2, antes de iniciar el tratamiento y 4 meses después de recibir tratamiento con metformina.

VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Describir la composición de la microbiota intestinal en individuos con diagnóstico reciente de diabetes tipo 2, sin tratamiento previo.
- Analizar los cambios en la microbiota intestinal después de 4 meses de tratamiento con metformina.
- Buscar correlaciones entre los cambios en la composición de la microbiota e indicadores de control metabólico (IMC, HbA1c, perfil de lípidos).

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Cuestiones éticas

Este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Medicina Genómica, Dictamen número CEI 2015/26. Todos los participantes firmaron una carta de consentimiento informado (Anexo 1).

7.2 Población de estudio

Los pacientes con diagnóstico de DT2 se reclutaron por personal del Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi, a través el Seguro Popular del Ayuntamiento de Mérida, Yucatán, y en Ferias Regionales de Salud organizadas por el Gobierno del Estado de Yucatán. A los pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión se les invitó a participar en el estudio y se solicitó que firmaran el consentimiento informado (Anexo 1)

a. Criterios de Inclusión:

- Individuos que sin tener conocimiento previo de padecer DT2, al ser estudiados en las Ferias Regionales y en visitas médicas cumplieron con los criterios diagnósticos de esta enfermedad (ADA 2014).
- Sin tratamiento previo
- No emparentados
- Mujeres y Hombres
- Edad 30 a 60 años
- Ascendencia Maya (que tengan al menos un apellido maya y que hablen la lengua)
- No haber utilizado antibióticos en al menos 3 meses antes de la toma de muestra.

b. Criterios de Exclusión:

- Embarazo
- Enfermedades gastrointestinales (gastritis, gastroenteritis, hepatitis, colitis, síndrome de mal absorción intestinal, infecciones bacterianas, virales o parasitarias, etc.)
- Presencia de enfermedades sistémicas (cáncer, autoinmunes, endocrinológicas, infecciosas, etc.)

- Infección reciente (4 semanas) (respiratoria, gastrointestinal o sistémica)
- Uso de medicamentos que pueden modificar o alterar la mucosa gastrointestinal

c. Criterios de Eliminación

- Falla al acudir a visitas de seguimiento
- Presencia de efectos adversos severos después del tratamiento con metformina (diarrea, vómito, mareo, acidosis láctica)
- Deseo del paciente de retirarse del estudio

7.3 Diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2

Ante sospecha clínica de DT2 puede medirse la concentración de glucosa en sangre capilar mediante tira reactiva y lectura en reflectómetro. El paciente debe estar en ayunas al menos 3 hrs. Sin embargo, por su variabilidad y menor precisión, siempre se debe confirmar el diagnóstico mediante determinaciones de laboratorio de análisis clínico.

Los criterios diagnósticos fueron los propuestos por la Asociación Americana de Diabetes (ADA) en 1997 y que han sido aceptados por la OMS.

- Glucemia basal en plasma venoso ≥ 126 mg/dl (7 mmol/l). Debe realizarse una segunda determinación en un día diferente para confirmar el diagnóstico.
- Síntomas típicos de diabetes y glucemia al azar ≥ 200 mg/dl (11,1 mmol/l). No es necesaria una segunda determinación.
- La hemoglobina glucosilada es $\geq 6.5\%$ siempre y cuando la prueba sea realizada en laboratorios con metodología y estandarización avalada por la National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP).

En los potenciales participantes de este estudio, inicialmente se midió la glucemia en ayunas en sangre capilar con el sistema ACCUCHECK (Roche). Posteriormente se pidió al paciente una muestra de sangre para confirmar el diagnóstico y para hacer medición de hemoglobina glucosilada. El criterio para confirmar el diagnóstico de DT2 fue un nivel sérico de hemoglobina glucosilada $\geq 6.5\%$.

7.4 Visitas

Para poder llevar un control adecuado de la información se hicieron tres visitas médicas de seguimiento. Para este proyecto se hizo una colaboración con la Universidad Autónoma de Yucatán en donde se hicieron todas las visitas, mediciones antropométricas y bioquímicas

7.5 Visita 1

7.5.1 Variables antropométricas:

En la primera visita médica, personal médico calificado tomó mediciones antropométricas basales (peso, talla, IMC). Con cinta métrica se midió la circunferencia de cintura en el punto medio entre el borde inferior de la última costilla palpable y la parte superior de la cresta ilíaca, al final de una espiración normal, con los brazos relajados a cada lado. Se midió además la circunferencia de la cadera de forma horizontal a nivel de la protrusión de máximo tamaño a nivel de los glúteos. La tensión arterial se midió en posición sedente, después de por lo menos cinco minutos de reposo, con esfigmomanómetro, en 3 ocasiones tomando el promedio de las tres mediciones para el análisis de resultados. A las mujeres en edad reproductiva se les realizó una prueba de embarazo en orina.

7.5.2 Variables bioquímicas:

Se tomó una muestra de sangre para hacer pruebas bioquímicas basales en suero (glucosa, urea, creatinina, hemoglobina glucosilada y perfil de lípidos) en el **Laboratorio de Análisis Clínicos de Servicio a la Comunidad** de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Yucatán (**UADY**). Este laboratorio cuenta con una certificación otorgada por Control de Calidad de la empresa Quality System Consulting. La determinación de colesterol total, triglicéridos y glucosa en plasma, se realizaron en un autoanalizador, utilizando estuches enzimáticos comerciales (Roche Diagnostics, Mannheim Alemania y Wako Chemicals, USA). El colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (C- HDL) se determinó mediante un método enzimático homogéneo (Roche Diagnostics, Mannheim Alemania). El colesterol de las lipoproteínas de baja densidad (C-LDL) se calculó con la formula Friedewald modificada por De Long. También se pidió una muestra de sangre para extracción de ADN genómico.

7.6 Muestra fecal para análisis de microbiota:

A los pacientes se les proporciono un kit para coleccionar la muestra fecal, este kit contenía un frasco de coprocultivo estéril un abate lenguas de plástico estéril y un instructivo de cómo coleccionar las muestras en el frasco. La muestra fue transportada en menos de 1 hora a la UADY, se etiquetó y se congeló a -20°C, y fue transportada en hielo seco al INMEGEN.

El ADN total bacteriano se extrajo de la muestra fecal en el INMEGEN, usando el kit comercial (QIAamp DNA Stool Mini kit-Quiagen) de acuerdo a los protocolos de manufactura para la detección de patógenos. Para determinar la concentración y pureza del ADN, se realizó una cuantificación en un espectrofotómetro Nanodrop 2000c (Thermo Scientific®). La técnica se describe en el Anexo 2.

7.7 Intervención

d) Dieta

El requerimiento energético total (Valor Calórico Total) se determinó tomando en cuenta el Gasto Energético Basal (GEB), el Efecto Térmico de los Alimentos (ETA) y el Nivel de Actividad Física (AF) (ADA, 2008). El Gasto Energético Basal, se calculo a partir de la fórmula de Mifflin- StJeor, que considera factores como el sexo, el peso (kg), la estatura (cm) y la edad (años) (Mifflin et al., 1990).

Ecuaciones Mifflin-StJeor

Hombres: GEB (Kcal) = [10 x peso (kg)] + [6.25 x talla (cm)] – [5 x edad (años)] +5

Mujeres: GEB (Kcal) = [10 x peso (kg)] + [6.25 x talla (cm)] – [5 x edad (años)] - 161

Todas las dietas se generaron en modo de plantillas donde se plasmaron siete menús divididos en desayunos, almuerzos, cenas, colación de media mañana y colación de medio día.

e) Tratamiento con metformina

El tratamiento con metformina se estableció siguiendo la Norma oficial Mexicana para el manejo de la DT2 (<http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/m015ssa24.html>). El tratamiento farmacológico seleccionado es metformina, para lo cual la norma establece:

“11.9.4.3 Se utiliza preferentemente metformina; se recomienda iniciar el tratamiento con una dosis de 500 a 850 mg al día, ajustando la dosis de acuerdo con la respuesta sin exceder de 3 g al día.”

Se aplicaron cuestionarios estandarizados a todos los participantes, para obtener información demográfica, nivel de escolaridad, historia familiar, hábitos dietarios actividad física, uso de medicamento y suplementos.

f) Cuestionario de adherencia al tratamiento

Se aplicó un cuestionario para conocer el porcentaje de apego al tratamiento se hizo un conteo de pastillas que se tomaba el paciente. Los frascos que se les proporcionaron en cada visita contenían 30 pastillas. Al final se hizo un conteo de pastillas para determinar la adherencia al tratamiento, lo cual se estableció de la siguiente manera: quien tomó las 30 pastillas proporcionadas de cada frasco tuvo una adherencia de 100 %. También se aplicaron cuestionarios estandarizados a todos los participantes, para obtener información sobre apego a la dieta.

7.7 Visitas de seguimiento

Se hicieron 2 visitas de seguimiento: una a los 45 días de estar tomando el tratamiento con metformina y la última a los 4 meses de estar tomando el tratamiento con metformina. En estas visitas se hizo un registro de mediciones antropométricas (peso, talla, IMC, circunferencia de cintura, circunferencia de cadera), así como mediciones bioquímicas en suero [glucosa, urea, creatinina, insulina, colesterol total (CT), lipoproteínas de alta densidad (HDL-C), lipoproteínas de baja densidad (LDL-C), triglicéridos (TG), y hemoglobina glucosilada], y se valoró el apego a la dieta y al tratamiento médico mediante cuestionarios.

En la última visita de seguimiento se les solicitó otra muestra de materia fecal para analizar la microbiota intestinal después del tratamiento.

7.8 Valoración de respuesta al tratamiento con metformina.

Para evaluar la respuesta al tratamiento se calcularon 2 parámetros: el cambio absoluto de hemoglobina glicosilada después del tratamiento (ΔHbA1c), y el cambio relativo de hemoglobina glucosilada después de 4 meses de tratamiento con metformina [$\Delta\text{HbA1c}(\%) = (\text{HbA1c T0} - \text{HbA1c T2}) / \text{HbA1c T0}$]. De acuerdo con criterios previamente considerados para estudios farmacogenéticos en DT2 (Hossey-Talei et al, 2017; Shokri et al., 2016), los individuos con $\Delta\text{HbA1c} < 1.0$ fueron considerados como no respondedores.

7.9 Análisis de microbiota intestinal: amplificación y secuenciación de los genes 16s RNAr

Para secuenciar la microbiota intestinal, se amplificó la región V4 del gen 16s RNAr de las bacterias presentes en la materia fecal de los participantes en 2 pasos. Para la primera amplificación se usaron oligonucleótidos específicos para la región V4 (**515F**: GTG CCA GCM GGC GCG GTA A, **806R**: GGA CTA CHV GGG TWT CTA AT), incluyendo 24 diferentes secuencias código de barras en el primer reverso. En esta primera amplificación se usa el mismo primer “forward” y 24 diferentes primers “reverse” (Anexo 5). Las condiciones de ciclado se describen en el Anexo 3. Los amplificados se purificaron con perlas Ampure XP de acuerdo con la técnica descrita en el Anexo 4 siguiendo el protocolo de purificación de productos de PCR.

En la segunda amplificación se hizo un pool de los 24 amplicones y posteriormente una segunda PCR para agregar los adaptadores. Los amplicones purificaron nuevamente con perlas Ampure XP, y se hizo un pool equimolar de estos amplicones para hacer la secuenciación en la plataforma Miseq Illumina®, en la Unidad de Secuenciación del INMEGEN. Esta plataforma permite obtener lecturas de hasta 250 bases con una alta cobertura.

7.10 Análisis bioinformático

El proceso general de secuenciación de la microbiota intestinal y el análisis bioinformático se describe en la Figura 4.

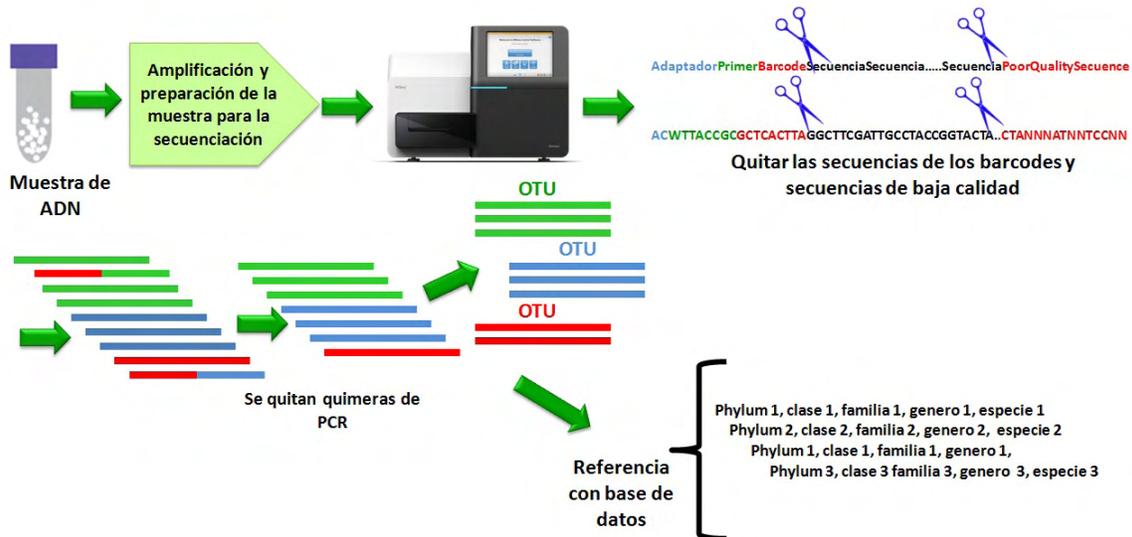


Figura 4. Flujo de trabajo del análisis bioinformático

El análisis de la microbiota intestinal se realizó a través de las secuencias de 16S rRNA usando el programa de QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology). QIIME es una herramienta bioinformática de código abierto diseñada para hacer el análisis de microbiomas a partir de datos crudos generados en Illumina u otras plataformas de secuenciación a través de gráficos y estadísticas de calidad. Este análisis incluye la remoción de los códigos de barras para separar las secuencias por individuo, el filtrado de calidad, remoción de quimeras, la alineación, la identificación y selección de Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs), asignación taxonómica, así como análisis y visualización de la diversidad. QIIME utiliza el estándar de la Matriz de Observación Biológica del Consorcio de Estándares Genómicos (BIOM) para representar las OTUs.

El análisis inició con los archivos en formato FASTQ que fueron proporcionados por la Unidad de Secuenciación del INMEGEN. Sobre los archivos en formato FASTQ, se separaron las

muestras por individuo y se filtraron las secuencias de baja calidad (`split_libraries_fastq.py`). El llamado de una base se consideró de baja calidad cuando el Phred score (Q) < 30. El Phred score se puede expresar con la fórmula $Q = -10 \log_{10} P$, donde un valor de Q = 30 indica que la probabilidad de que el llamado de la base sea incorrecto es de 1 en 1000.

Para el análisis general se creó un archivo llamado “mapping file” o archivo de mapeo, incluyendo todos los metadatos por muestra, como información técnica, primers y códigos de barras. Para este proyecto, los metadatos incluyeron un identificador del individuo, un punto de tiempo (tratamiento), así como los datos clínicos y bioquímicos, la respuesta al tratamiento y la adherencia al tratamiento.

El siguiente paso consistió en identificar y seleccionar las OTUs, que se hizo en la modalidad agrupación de referencia cerrada (`pick_closed_reference_otus.py`). Brevemente, se alinearon las secuencias contra la base de datos Greengenes con un porcentaje de similitud del 97%, y las secuencias no alineadas fueron descartadas. Posteriormente se asignó la taxonomía, y se generaron tablas OTU (`make_otu_table.py`), que indican el número de veces que cada unidad taxonómica operacional fue observada en cada muestra.

Por último se ejecutó un análisis de alpha y beta diversidad utilizando los comandos `alpha_rarefaction.py`, `beta_diversity_through_plots.py`, `summarize_taxa_through_plots.py`, `make_distance_boxplots.py`, `compare_alpha_diversity.py` y `group_significance.py`.

7.11 Análisis estadístico

Para todos los parámetros clínicos y bioquímicos se calcularon medidas de tendencia central. Se compararon estos parámetros antes y después del tratamiento con metformina utilizando la prueba de Wilcoxon. Para evaluar diferencias en la composición de la microbiota intestinal antes y después del tratamiento con metformina, se utilizaron pruebas no paramétricas como U de Mann-Whitney. Se buscaron correlaciones entre abundancias relativas a nivel phyla con distintos parámetros clínicos calculando la correlación de Spearman.

Se hizo un análisis de varianza multivariado permutacional usando matrices de distancia (ADONIS) para explicar el efecto de algunas covariables sobre la variación de la microbiota intestinal (género, localidad y tratamiento con metformina). El análisis de varianza multivariado permutacional usando matrices de distancia (ADONIS) realiza comparaciones de medias entre dos o más grupos (comunidades), es decir prueba la hipótesis de igualdad de medias multivariada entre grupos (Oksanen *et al.*, 2013) y su significancia es evaluada con permutaciones. Esta prueba es análoga al análisis de varianza multivariado basado en la distribución normal y al análisis de varianza multivariado (MANOVA). ADONIS analiza la suma de cuadrados usando matrices de distancia y disimilitudes basado en un ajuste de modelos lineales y utilizando prueba de permutaciones con pseudo-F. En este análisis se incluyeron únicamente OTUs con abundancia > 0.01% del total, y se hicieron 2000 permutaciones por prueba.

Para todas las pruebas estadísticas, la corrección del valor de P por comparaciones múltiples se hizo utilizando la prueba de FDR (false discovery rate).

VIII. RESULTADOS

Se reclutaron a 47 pacientes en 12 localidades diferentes de Yucatán, entre ellas destacan Merida, Kanasin, Motul y Uman. Seis pacientes fueron eliminados del análisis: 3 por no cumplir con los criterios diagnósticos de DT2 (Hemoglobina glucosilada <6.5%), y 3 decidieron salir del proyecto por no tolerar efectos secundarios gastrointestinales de la metformina (diarrea).

8.1 Cambios en datos antropométricos, bioquímicos y de microbiota intestinal antes y 4 meses después del tratamiento con metformina.

En la Tabla 2 se comparan los datos antropométricos de los 41 pacientes medidos en la consulta inicial y a los 4 meses de tratamiento con metformina. El único cambio significativo en estos parámetros fue una disminución en la circunferencia de cintura ($P=0.0006$).

En la Tabla 3 se comparan los datos antropométricos estratificando por género antes y a los 4 meses de recibir tratamiento con metformina. El único cambio significativo en estos parámetros fue una disminución en la circunferencia de cintura de las mujeres ($P=0.0015$).

Tabla 2. Comparación de parámetros antropométricos antes y después del tratamiento con metformina

	Tiempo 0 (n= 41)	Tiempo 2 (n= 41)	Valor de P
Edad	52 (\pm 10.3)		-
Peso (kg)	73.5 (\pm 2.8)	73.4 (\pm 2.6)	0.583
IMC	31.5 (\pm 0.7)	31.4 (\pm 0.7)	0.3402
Circunferencia de Cadera	106.2 (\pm 1.7)	105.8 (\pm 1.5)	0.5028
Circunferencia de Cintura	100.9 (\pm 2.0)	97.9 (\pm 1.8)	0.0006

Se reportan medias y error estándar.

Tabla 3. Comparación de parámetros antropométricos antes y después del tratamiento con metformina de acuerdo al género.

	Mujeres			Hombres		
	Tiempo 0 n= 30	Tiempo 2 n= 30	Valor de P	Tiempo 0 n= 11	Tiempo 2 n= 11	Valor de P
Edad	53.2 53.2 (± 1.9)			44.8 (± 2.4)		-
Peso (kg)	67.2 (± 2.0)	67.1 (± 1.9)	0.4199	91.5 (± 6.5)	90.8 (± 5.5)	0.9219
IMC	32.27 (± 0.7)	31.0 (± 0.8)	0.175	32.6 (± 1.9)	32.4 (1.6)	0.9043
Circunferencia de Cadera	105.2 (± 1.8)	104.4 (± 1.8)	0.2731	107.3 (± 5.0)	107.9 (±3.5)	0.7031
Circunferencia de Cintura	98.1 (± 2.0)	95.8 (± 1.7)	0.0015	109.0 (±3.4)	105.5(± 2.8)	0.3047

Se reportan medias y error estándar.

La Tabla 4 compara los datos bioquímicos de todos los pacientes antes y después del tratamiento. Disminuyeron de manera significativa el porcentaje de hemoglobina glucosilada, la glucosa en ayunas, el colesterol total, los niveles de LDL-C, y aumentaron significativamente los niveles de HDL-C. El único parámetro que no cambió de manera significativa fueron los niveles de triglicéridos.

Tabla 4. Comparación de parámetros bioquímicos antes y después del tratamiento con metformina.

Parámetro bioquímico	Tiempo 0 (n= 41)	Tiempo 2(n= 41)	Valor de P
Hemoglobina glucosilada HbA1c%	8.7 (± 0.3)	7.3 (± 0.2)	< 0.0001
Glucosa en ayunas mg/dL	169.8 (± 10.3)	150 (± 8.6)	0.04
Colesterol total mg/dL	220.5 (± 11)	200 (± 12.15)	0.0005
HDL mg/dL	43 (± 1.7)	46.1 (± 1.8)	0.0378
LDL mg/dL	122.9 (± 6.2)	111.4 (± 4.9)	0.0053
Triglicéridos mg/dL	200.6 (89.60-2637)	172.1(87.73-2923)	0.5023

Se reportan medias y error estándar excepto los triglicéridos que se reportan con medianas y rangos.

La Tabla 5 compara los datos bioquímicos antes y después del tratamiento estratificando por género. En ambos géneros disminuyó de manera significativa el porcentaje de hemoglobina glucosilada. Aunque los niveles de glucosa, colesterol total y LDL-C disminuyeron después del tratamiento en ambos géneros, la diferencia en los niveles de colesterol total alcanzó significancia estadística solo en mujeres (P=0.0006), mientras que la diferencia en los niveles de LDL-C solo alcanzó significancia en hombres. Los niveles de HDL-C aumentaron en ambos grupos, sin alcanzar significancia al analizar cada género por separado.

Tabla 5. Comparación de parámetros bioquímicos antes y después del tratamiento con metformina de acuerdo al género

Parámetro bioquímico	Mujeres			Hombres		
	Tiempo 0 n= 30	Tiempo 2 n= 30	Valor de P	Tiempo 0 n= 11	Tiempo 2 n= 11	Valor de P
Hemoglobina glucosilada HbA1c%	8.6 (± 0.4)	7.3 (±0.3)	< 0.0001	9.0 (± 0.7)	7.3 (± 0.4)	0.041
Glucosa en ayunas mg/dL	161.3 (±11.5)	153.6 (± 11.0)	0.139	192.9 (± 20.4)	142.4 (±11.8)	0.1016
Colesterol Total mg/dL	200.8 (± 8.0)	180.5 (± 6.6)	0.0006	274.5 (± 30.1)	256.4 (± 38.0)	0.2783
HDL mg/dL	44.3 (±2.1)	47.1 (±2.2)	0.1672	39.6 (± 2.4)	43.3 (± 2.4)	0.083
LDL mg/dL	115.4 (±6.6)	107.7 (±4.9)	0.1038	143.4 (± 13.1)	121.4 (± 12.9)	0.0137
Triglicéridos mg/dL	187.9 (94.2-545.9)	164.0 (87.73-350.3)	0.1756	314.7 (67.0- 223.0)	241.0 (34.1-208.2)	0.5195

Se reportan medias y error estándar excepto los triglicéridos que se reportan medianas y rangos.

8.2 Adherencia al tratamiento con metformina

Se calculó cuántos pacientes tuvieron una adecuada adherencia al tratamiento estableciendo como punto de corte una adherencia al tratamiento mayor o igual al 70%. En la figura 5 se puede observar que el 82.9% de los pacientes tuvieron una adherencia adecuada al tratamiento.

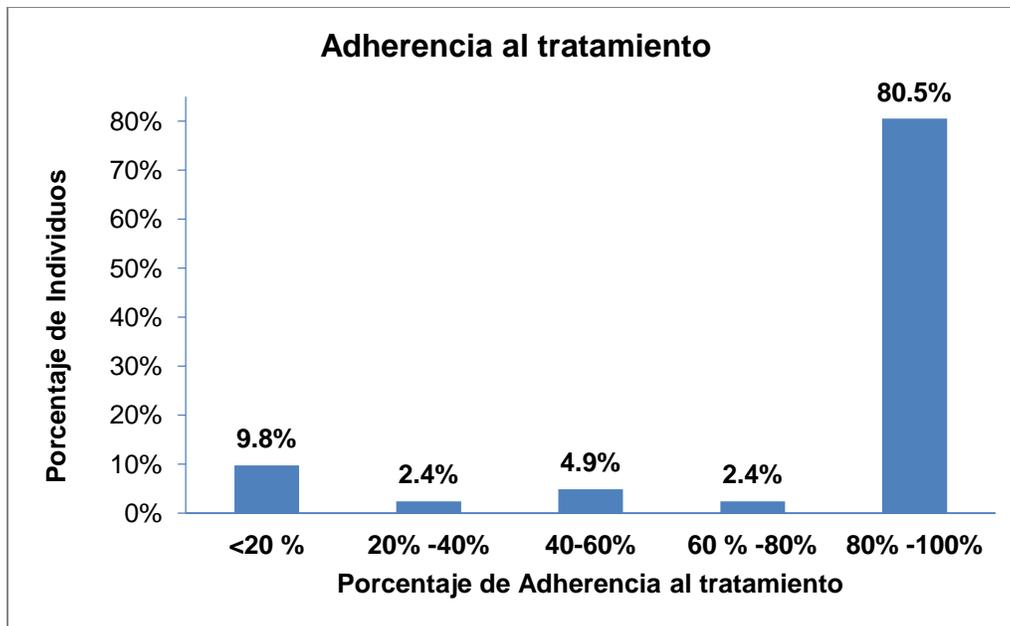


Figura 5. Distribución de los pacientes de acuerdo a la adherencia al tratamiento

8.3 Respuesta al tratamiento

La figura 6 muestra el porcentaje de individuos respondedores de acuerdo a su apego al tratamiento. De manera general, el 53.6% de los pacientes respondieron al tratamiento. Entre los pacientes que tuvieron una adherencia al tratamiento mayor o igual al 70%, el 44.1% fueron no respondedores, mientras que 4 de los 7 pacientes que no tuvieron una adherencia adecuada al tratamiento (57.1%) fueron no respondedores.

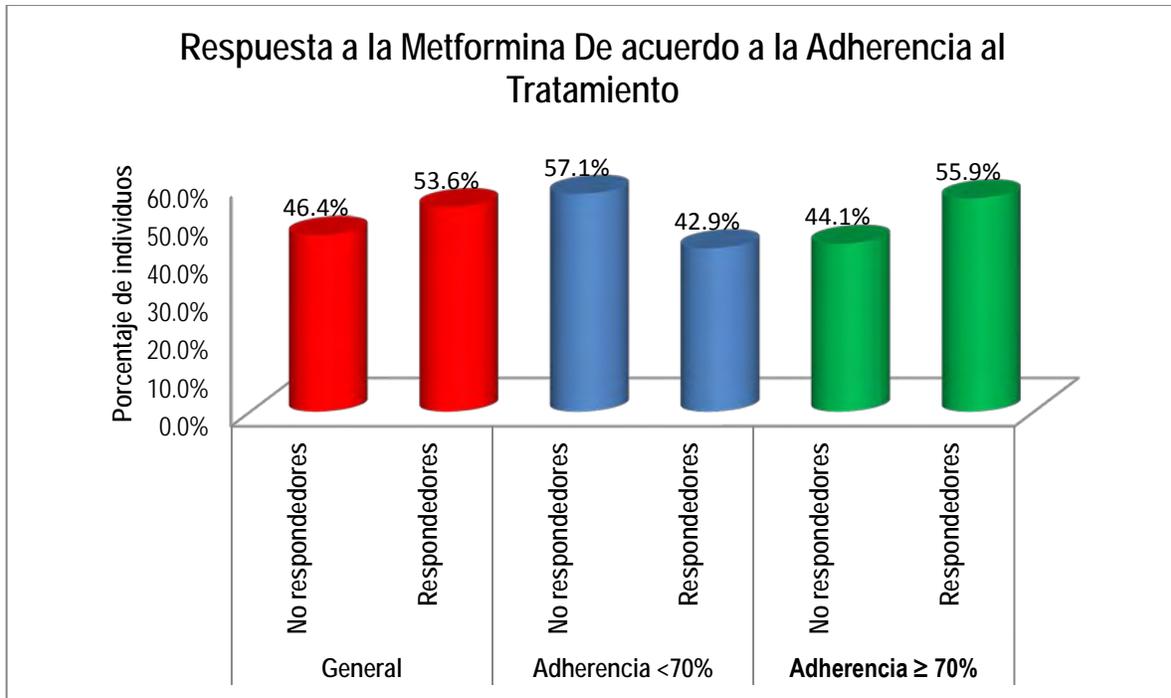


Figura 6. Porcentaje de pacientes con respuesta adecuada de acuerdo a la adherencia al tratamiento

8.4 Cambios en la microbiota intestinal

La figura 7 muestra las gráficas de calidad en donde se observa una distribución homogénea de la calidad en las lecturas en dirección “forward” y “reverse”. Como se observa en la figura en la mayor parte de la longitud de las lecturas, las calidades son superiores a valor phred score de 30, el cual estima un error en cada mil nucleótidos secuenciados.

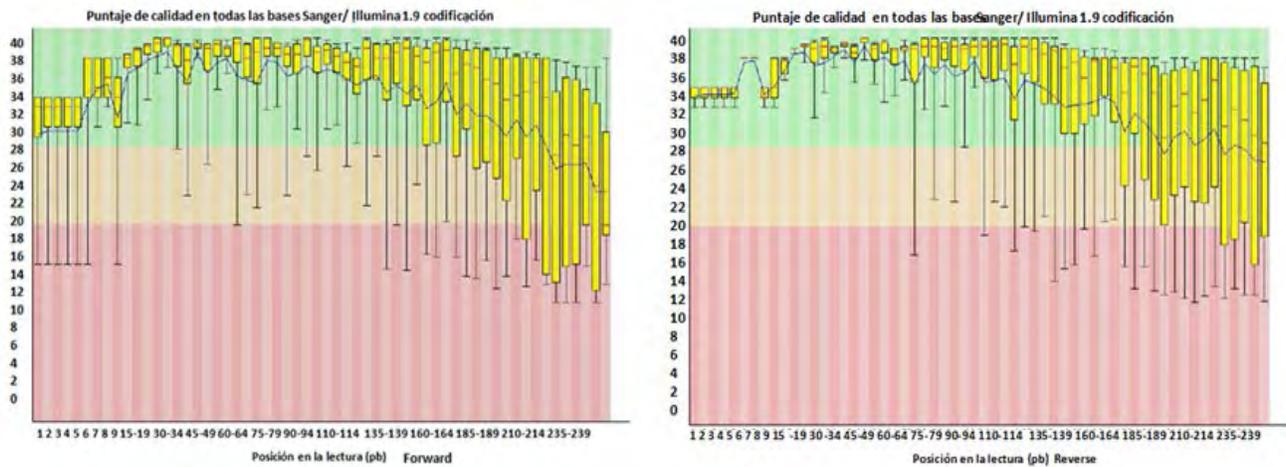


Figura 7. Graficas de calidad de las lecturas de las muestras.

Se obtuvieron un total de 9,375,710 lecturas a partir de la secuenciación de todas las muestras de microbiota intestinal. El promedio de número de lecturas por muestra fue de $105,345.056 \pm 30931.603$, rango 37,537 a 168,175. Después de eliminar las quimeras, la asignación taxonómica de OTUS se hizo usando como referencia la base de datos “Greengenes”, tomando en cuenta únicamente OTUS con más del 0.1% lecturas en referencia cerrada.

8.5 Alfa diversidad análisis de rarefacción

El análisis de rarefacción consiste en una comparación objetiva de la riqueza de las especies en un estudio, basado en un ajuste en el tamaño muestral tomado al azar. Este tipo de análisis es aplicado ampliamente en el estudio de poblaciones biológicas tales como las microbianas. Este análisis permite determinar si el muestreo realizado representa la diversidad del ambiente de donde fue tomado.

En este análisis se estableció un número mínimo 10 secuencias por muestra y un número máximo 36,992. En la figura 8 podemos ver el número de especies observadas de acuerdo al número de secuencias en cada muestra. La figura 9 muestra el promedio de especies observadas por muestra, que fueron muy similares en el tiempo inicial y a los 4 meses de tratamiento.

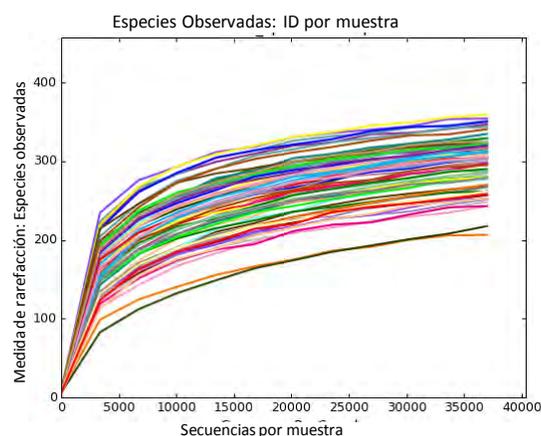


Figura 8. Número de especies observadas por cada secuencia. Cada línea representa una muestra.

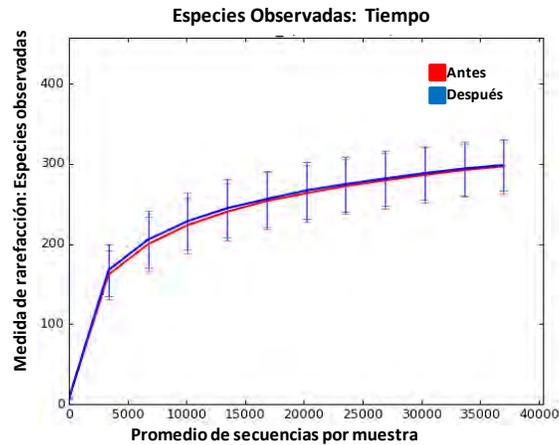


Figura 9. Promedio del número de especies observadas de acuerdo al número de secuencias antes del tratamiento (línea azul) y después de 4 meses de tratamiento (línea roja).

8.6 Beta Diversidad

La diversidad beta cuantifica la heterogeneidad de las especies entre cada par de muestras, antes y después del tratamiento con metformina. Para obtener la similitud y la distancia de los OTUs en los dos tiempos, se utilizó un análisis de componentes principales. Las figuras 10 y 11 muestran una distribución homogénea de los OTUs en los dos tiempos.

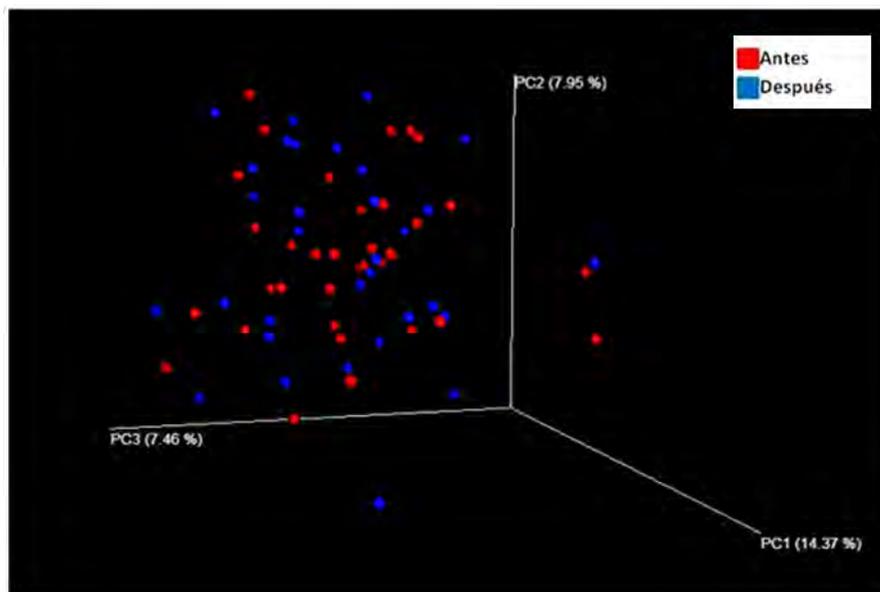


Figura 10. Gráfico de componentes principales sin ponderar, en color rojo se muestra el tiempo antes del tratamiento y en azul se muestra el tiempo después de 4 meses de tratamiento.

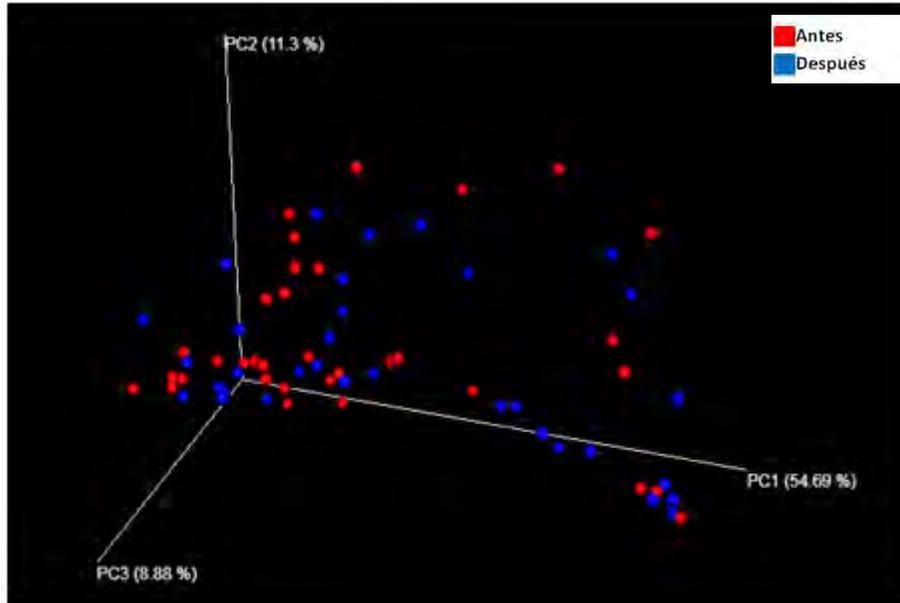


Figura 11. Gráfico de componentes principales con ponderación (rojo antes), (azul 4 meses después).

8.7 Abundancia Relativa a nivel Phylum

La figura 12 esquematiza la abundancia relativa de Phyla por muestra secuenciada. Los filotipos más abundantes en el tiempo 0 y tiempo 2 son los *Bacteroidetes* (barras de color verde), los *Firmicutes* (barras de color amarillo) y *Proteobacterias* (barras de color azul).

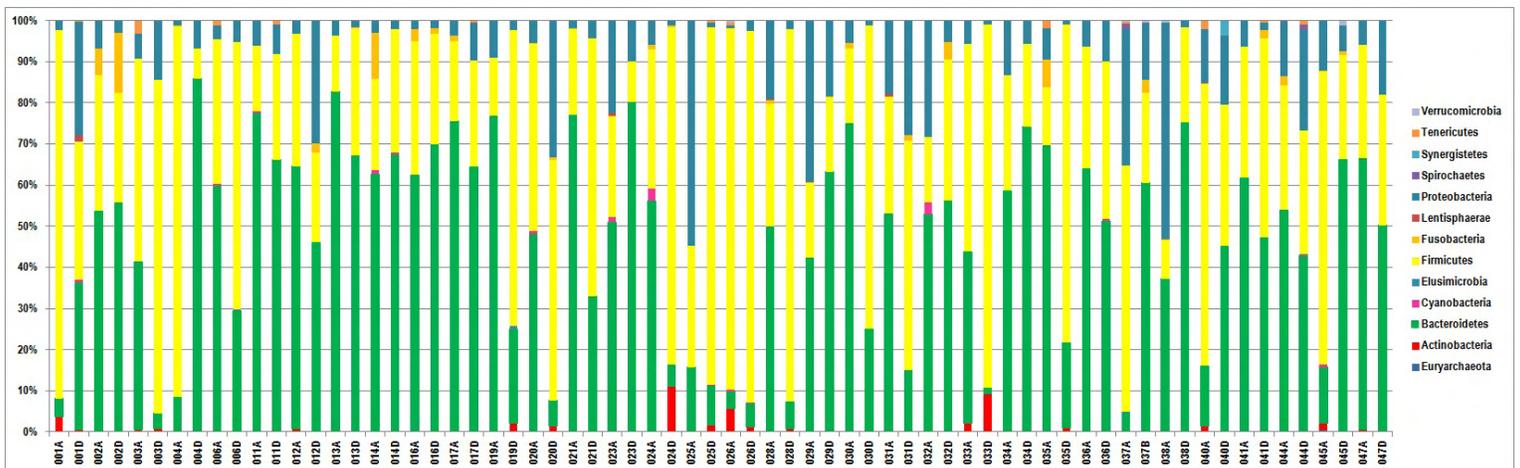


Figura 12. Abundancia relativa de Phyla en muestras de microbiota intestinal. Cada muestra está indicada con un número, la A representa el tiempo cero (antes de tratamiento) y la D representa el tiempo 2 (después de 4 meses de tratamiento con metformina).

Se comparó el promedio de la abundancia de filotipos más representativos antes y después del tratamiento con metformina. La abundancia media de *Bacteroidetes* disminuyó de 60% a un 54%, la abundancia media de *Firmicutes* aumentó de 33% a 40% y la de *Proteobacterias* se mantuvo muy similar (6% en tiempo 0 y 7% en tiempo 2) (Figura 13).

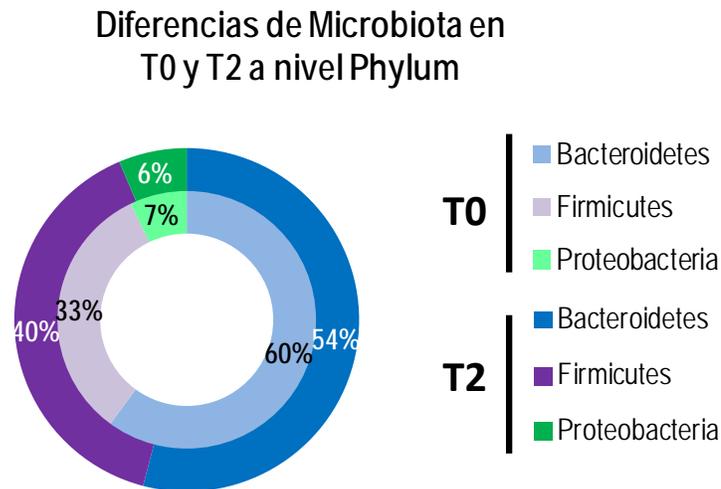


Figura 13. Porcentaje de cambio en la abundancia relativa de los 3 principales filotipos.

A pesar de haber cambios en la abundancia relativa de estos filotipos, los cambios no fueron estadísticamente significativos para los *Bacteroidetes* y las *Proteobacterias*. El cambio en la abundancia de *Firmicutes* después del tratamiento mostró una tendencia a la significancia estadística; sin embargo, esta significancia se perdió después de corregir por FDR (Figura 14).

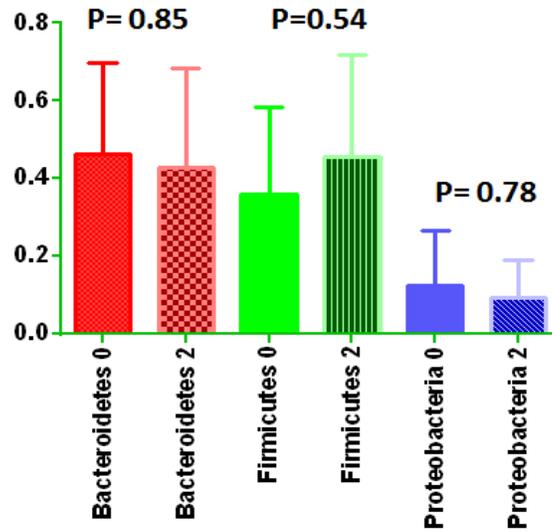


Figura 14. Cambios en el promedio de las abundancias relativas de los 3 filotipos. Los valores de P muestran la significancia corregida por FDR.

8.8 Relación Firmicutes/Bacteroidetes en T0 y T2

En la Figura 15 se observa que la relación *Firmicutes/Bacteroidetes* aumentó después de 4 meses de tratamiento con metformina, aunque la diferencia no alcanzó significancia estadística.

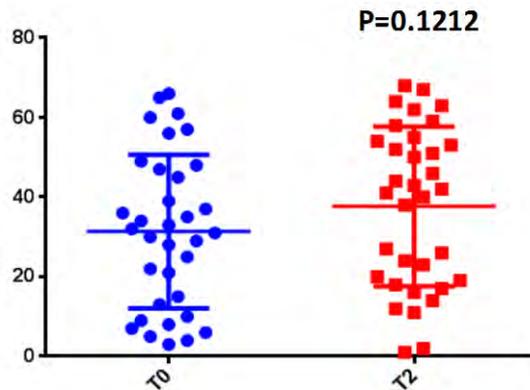


Figura 15. Razón *Firmicutes/Bacteroidetes* en T0 y T2.

8.9 Cambios en los géneros *Akkermansia*, *Bifidobacterium*, *Escherichia* e *Intestinibacter*

La tabla 4 muestra las abundancias relativas de 4 géneros bacterianos con cambios en respuesta a la metformina descritos previamente en la literatura (Shin et al., 2014; Forslund et al., 2015; Lee y GwangPyo, 2014). Se observaron secuencias de *Akkermansia muciniphila* y *Bifidobacterium adolescentis*, sin embargo éstas fueron muy escasas. A pesar del aumento en la abundancia relativa después del tratamiento, el cambio no fue significativo. No se encontraron secuencias correspondientes a *Escherichia* o *Intestinibacter* antes o después del tratamiento.

Tabla 6. Abundancias relativas de *Akkermansia*, *Bifidobacterium*, *Escherichia* e *Intestinibacter* antes y después del tratamiento con metformina.

	T0	T2	Valor P	FDR
<i>Akkermansia muciniphila</i>	0.00037	0.00068	0.842	0.995
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	0.00139	0.00177	0.544	0.995
<i>Escherichia</i>	ND	ND	ND	NA
<i>Intestinibacter</i>	ND	ND	NA	NA

8.10 Análisis de Varianza Multivariado Permutacional

El análisis ADONIS (Figura 16) mostró que el 4.25% de la varianza de la microbiota intestinal se debe al género ($P=0.045$). Aunque la covariable que mostró ser responsable del mayor porcentaje de varianza de la microbiota fue la localidad (16.6%), y en menor grado el tratamiento (2.1%), el papel de estas variables no alcanzó significancia estadística ($P=0.44$ y $P=0.19$, respectivamente).

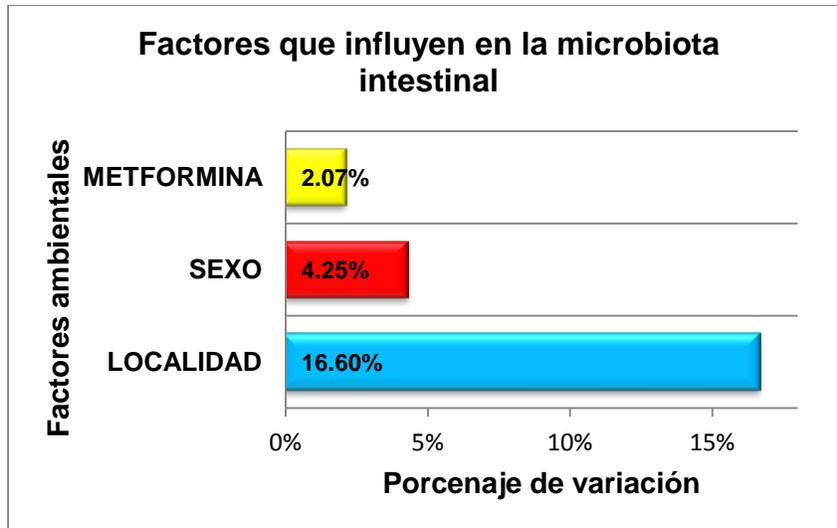


Figura 16. Análisis de varianza multivariado permutacional ADONIS

8.11 Relación de los cambios de la Microbiota intestinal con la Respuesta al Tratamiento (Δ HbA1c relativa)

Se buscaron correlaciones entre la abundancia relativa de *Firmicutes* y *Bacteroidetes* con distintos parámetros antropométricos y bioquímicos en ambos tiempos, y ninguna correlación mostró significancia o tendencia a la significancia estadística. Tampoco se encontraron correlaciones significativas entre la abundancia relativa de *Bacteroidetes* antes o después del tratamiento, con el porcentaje de cambio de hemoglobina glucosilada (Δ HbA1c relativa) como indicador de respuesta al tratamiento (Figura 17).

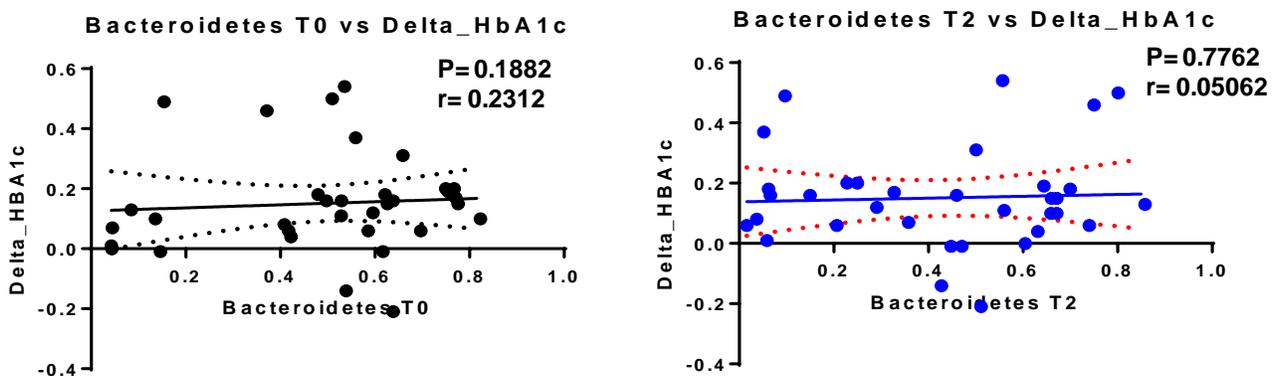


Figura 17. Correlación de la abundancia relativa de *Bacteroidetes* con el cambio del porcentaje de hemoglobina glucosilada antes y 4 meses después de tratamiento con metormina.

De manera interesante, la abundancia relativa de *Firmicutes* antes de iniciar el tratamiento (T0) mostró una correlación negativa con la respuesta al tratamiento expresada como cambio relativo de hemoglobina glicosilada (Δ HbA1c relativa); esta correlación mostró tendencia a la significancia estadística ($r=-0.3022$ $P=0.0824$). Sin embargo, no se observó correlación entre la abundancia relativa de *Firmicutes* después del tratamiento (T2) con la respuesta al tratamiento ($r=0.007$, $P=0.9692$) (Figura 18).

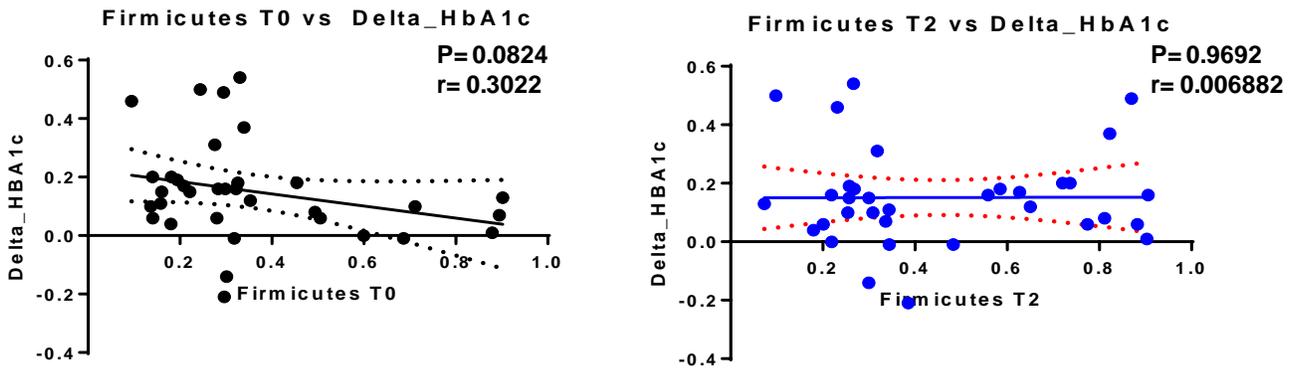


Figura 18. Correlación de la abundancia relativa de los *Firmicutes* con el cambio del porcentaje de hemoglobina glicosilada antes y 4 meses después del tratamiento con metformina.

IX. DISCUSIÓN

Este es el primer estudio en mexicanos con ascendencia Maya que analiza si el tratamiento con metformina induce cambios en la MI en pacientes diabéticos sin tratamiento previo, que pudieran estar relacionados con los cambios metabólicos favorables inducidos por este tratamiento.

9.1 Tasa de Respuesta y Adherencia al Tratamiento con Metformina

Tras el inicio del tratamiento, es necesario valorar una serie de aspectos, como el control metabólico, el control adecuado de la hiperglucemia mediante la determinación de HbA1c y perfiles de glucemia capilar. Aunque de manera global el promedio de glucosa en ayunas disminuyó significativamente de 169.8 mg/dL a 150 mg/dL ($P=0.04$) y la media de la HbA1c también disminuyó significativamente de 8.7 a 7.3% ($P<0.0001$), la tasa de respuesta al tratamiento global fue tan solo de 53.6%. Considerando únicamente los pacientes con apego al tratamiento mayor o igual al 70%, la tasa de respuesta incrementó a tan solo al 55.9%. Se sabe que la tasa de falta de respuesta al tratamiento con metformina como monoterapia es relativamente frecuente, y varía de acuerdo a diferentes ensayos clínicos. No se encontraron reportes de tasa de falta de respuesta al tratamiento en población mexicana en la literatura médica. Sin embargo, estudios en otras poblaciones reportan falta de respuesta a la metformina que varía entre 8% y 46.6%, (Khan et. al., 2006; Zeitler et. al., 2012; Mahrooz et al., 2015; Bankura et. al., 2016). En la población maya, la falta de respuesta en el grupo con adecuado apego al tratamiento fue alta. Las variaciones en la tasa de respuesta pueden deberse a diferencias étnicas, en el diseño del estudio, e incluso en la definición de respuesta o no respuesta al tratamiento. Sin embargo, es claro que existe una gran variabilidad en la respuesta individual a la monoterapia con metformina, por lo que es necesario indagar más en las causas de este fenómeno.

La variabilidad en la respuesta al tratamiento puede ser causada por factores biológicos o no biológicos, como la adherencia al tratamiento o el acceso a los servicios de salud.

Existen factores biológicos no genéticos, como la influencia de la función intestinal, hepática y renal del individuo. Sin embargo, es poco probable que estos factores hayan afectado la respuesta al tratamiento en nuestros pacientes ya que la presencia de enfermedades sistémicas fue un criterio de exclusión de este estudio. También se han estudiado los factores genéticos que pueden afectar el efecto terapéutico o la probabilidad de presentar efectos adversos de un fármaco, con el fin de lograr un tratamiento personalizado. Algunos estudios sugieren que la variabilidad en la respuesta al tratamiento con metformina se podría deber a la variación genética en los transportadores de metformina *SLC22A1* (codifica la proteína OCT1), *SLC29A4* (PMAT), , *SLC22A3* (OCT3), y *SLC47A1* (MATE1) (Shu et al., 2007). La proteína OCT1 se encarga de transportar la molécula de metformina desde el torrente sanguíneo hasta los hepatocitos. Shu y colaboradores (2007) también analizaron ratones knockout para Oct-1 (Oct-1 deficientes), observando que el efecto hipoglucemiante de la metformina fue nulo en estos ratones. Por este motivo, es importante estudiar la farmacogenética tanto en la respuesta al tratamiento con metformina, como en la presentación de efectos adversos que pueden llevar a la suspensión del tratamiento.

Los efectos secundarios gastrointestinales siguen siendo el principal factor limitante para la optimización de la terapia con metformina y afectan negativamente la calidad de vida y la adherencia en pacientes con diabetes mellitus, especialmente durante el inicio del tratamiento (Florez et al. 2012). La terapia con metformina, independientemente de la dosis, se asocia con efectos secundarios usualmente gastrointestinales en el 20-30% de todos los pacientes, lo que los lleva a la abandonar la terapia en hasta 6% de los casos (Hirst et al., 2012). En una revisión reciente, Bonnet y Scheen (2017) reportan que entre 1.2 y 5% de los pacientes abandonan el tratamiento por diarrea, aunque entre el 14 y 23% de los pacientes bajo tratamiento la presentan como síntoma. En nuestro estudio, 3 de 47 pacientes (6.3%) que iniciaron el tratamiento decidieron abandonarlo por efectos gastrointestinales, muy similar a lo reportado previamente en la literatura (Hirst et al., 2012).

En dos estudios previos de microbiota intestinal en humanos, se reportó que la metformina aumenta la abundancia relativa de *Escherichia* (Forslund et al., 2015; Wu et al., 2017), lo cual podría estar relacionado a este efecto secundario. Wu et al. (2017) reportaron que el crecimiento de *E. Coli* no fue afectado por la metformina *in vitro*, sugiriendo que sus efectos sobre la abundancia de *Escherichia* spp son probablemente indirectos, y posiblemente sean el resultado de la modificación de interacciones bacteria-bacteria, o bien de otros cambios fisiológicos y/o ambientales dentro del intestino al ser tratado con metformina. Puesto que en nuestro estudio no se observaron secuencias de *Escherichia* en ningún paciente, se descarta que éste haya sido el mecanismo desencadenante de este efecto secundario en nuestros pacientes. Es necesario hacer más estudios para entender qué otros factores participan para que la metformina afecte indirectamente la abundancia de *Escherichia* spp.

Así, se conoce poco sobre los factores tanto genómicos, metagenómicos como ambientales que pudieran desarrollar efectos adversos gastrointestinales por el tratamiento con metformina. Por esta razón, es necesario continuar con el estudio sobre las causas de este efecto secundario. En particular, tratándose de población maya, es importante hacer un estudio farmacogenómico buscando variantes genéticas asociadas tanto a falta de respuesta, como a los efectos gastrointestinales adversos por el tratamiento. Esto se buscará en una segunda etapa del proyecto donde se se secuenciarán los exomas de los individuos participantes.

9.2 Cambios en la microbiota intestinal después del tratamiento con metformina (4 meses)

Generalidades sobre la microbiota intestinal en la población de estudio. Los phyla más abundantes en nuestros pacientes antes y después del tratamiento con metformina fueron *Bacteroidetes* y *Firmicutes*, al igual que lo reportado en diversos estudios. Sin embargo, resalta que la abundancia relativa de Proteobacterias (6-7%) fue más alta que en reportes previos en otras poblaciones (Hall et al., 2017) y que en niños de la Ciudad de México (3.4%) (López-Contreras et al., 2017). Esto pudiera deberse a

factores geográficos, dietarios, o inclusive genéticos del mismo huésped (Brantely Hall et al., 2017). Es importante ampliar los estudios de microbiota intestinal en esta y otras poblaciones indígenas tanto en individuos sanos como en individuos con obesidad y diabetes para poder establecer un punto de comparación. También es de llamar la atención que en nuestros pacientes se encontraron abundancias relativas muy bajas de *Akkermansia muciniphila* (0.0004), que estuvieron presentes solamente en 8 de 34 pacientes. Además después de eliminar las secuencias microbianas con abundancia absoluta menor a 0.1%, no se encontraron cepas de *Escherichia coli* o *Intestinibacter*. En niños de la ciudad de México tampoco se encontraron estos últimos, aunque sí hubo mayor abundancia de *Akkermansia muciniphila* (0.261) (López-Contreras et al., 2017).

Alpha Diversidad. Si bien se ha reportado previamente que la diversidad de la microbiota intestinal es reducida en algunas enfermedades como la DT1, la enfermedad de Chron (Sohail et al., 2017), y en la DT2 (Qin et al., 2012), este estudio no fue diseñado para valorar diferencias entre casos y controles. Es importante mencionar que la diversidad intra-muestra no cambió de manera significativa después del tratamiento con metformina.

Beta Diversidad, Cambios a Nivel Género. El único estudio previo que analiza los cambios en la microbiota intestinal inducida por metformina en pacientes con DT2 sin tratamiento previo incluyó 22 pacientes tratados con metformina y 18 pacientes con DT2 tratados con placebo, ambos bajo una dieta con restricción calórica (Wu et al., 2017). Similar a lo observado en modelos de ratón (Shin et al., 2013; Lee & Ko., 2014) y al estudio transversal de Forslund et al. (2015) que comparó la microbiota de pacientes diabéticos tratados y no tratados con metformina, Wu y colaboradores (2017) reportaron un aumento de la abundancia relativa *Escherichia* y una reducción de *Intestinibacter*. Además, reportaron un aumento en la abundancia relativa de 86 cepas bacterianas, la mayoría de las cuales pertenecían a los phyla Gama-protobacteria y Firmicutes, así como un aumento en la abundancia relativa de *Bifidobacterium* y *Akkermansia*.

En el presente estudio no se encontraron diferencias significativas después de la corrección por FDR en la abundancia de ningún género bacteriano (Anexo 6). En lo que se refiere a la abundancia de *Akkermansia*, el número de pacientes con secuencias para

género fue reducido, y las abundancias relativas fueron tan bajas que, a pesar de aumentar de 0.0004 a 0.0007, el cambio no alcanzó significancia estadística ($P=0.84$). La abundancia relativa de *Bifidobacterium adolescentis* también fue baja (0.0014), y aumentó a 0.0017 después del tratamiento con metformina ($P=0.54$). Así, a pesar de la evidencia previa de que estas 2 bacterias aumentaron por el tratamiento con metformina, que la metformina induce el crecimiento de estas 2 bacterias *in vitro* (Lee & Ko, 2014; Wu et al., 2017) y que sus abundancias relativas aumentaron en nuestros pacientes después del tratamiento con metformina, esta diferencia no alcanzó significancia estadística, probablemente por su muy escasa abundancia antes de iniciar el tratamiento.

Esto es relevante porque existe evidencia de que ambas bacterias tienen efectos metabólicos benéficos, y podrían ser útiles como suplementos. En lo que se refiere a *Bifidobacterium adolescentis*, la metformina promovió su crecimiento tanto *in vivo* como *in vitro* y se observó una correlación negativa entre su crecimiento y el porcentaje de HbA1c (Wu et al., 2017). Además, un suplemento con *B. Adolescentis* aumentó la sensibilidad a la insulina y disminuyó la acumulación de grasa visceral en un modelo experimental de síndrome metabólico en el ratón (Chen et al., 2012).

Por otro lado, los efectos de la administración de células vivas de *Akkermansia muciniphila* en el modelo de ratón mostraron mejorar la función de barrera del intestino, prevenir la endotoxemia metabólica al restaurar el grosor de la capa mucosa, prevenir la obesidad y disminuir la grasa visceral y subcutánea (Everard et al., 2013; Cani et al. 2009; Dewolf et al., 2011); además de regular la producción endógena de péptidos intestinales involucrados en la regulación de la glucemia y de la función de barrera del intestino como los péptidos tipo glucagon 1 y 2 (GLP-1 y GLP2) (Cani et al., 2016). Por todo esto, se ha propuesto a la *Akkermansia* como un posible factor terapéutico en las enfermedades metabólicas (Cani et al., 2017), que quizá en combinación con metformina podría mejorar la barrera mucosa del intestino y ejercer efectos metabólicos benéficos en los pacientes.

Beta Diversidad, Cambios a Nivel Phylum. El phylum *Bacteroidetes* fue el que tuvo una mayor abundancia relativa tanto antes como 4 meses después del tratamiento con

metformina. Las bacterias de este phylum se caracterizan por ser gram negativas y porque el componente principal de su pared celular es el LPS (lipopolisacárido). Los géneros de este phylum son esenciales en la degradación de una variedad de glicanos complejos. Algunos estudios sugieren que la abundancia de este phylum aumenta durante la reducción de peso, lo que sugiere un posible papel en la ganancia de energía de la dieta (Tremaroli et al., 2012). Los *Firmicutes* fueron el segundo phylum con mayor abundancia relativa tanto antes como después del tratamiento con metformina. La mayoría de los *Firmicutes* pertenecen a las bacterias gram positivas y el componente principal de su pared celular es el ácido lipoteicoico (Pryde et. al., 2002). El tratamiento con metformina aumentó la abundancia media de *Bacteroidetes* de 33 a 40% y disminuyó la abundancia media de *Firmicutes* de de 60 a 54%, aunque las diferencias no alcanzaron significancia estadística aún sin corrección por FDR, probablemente por el número reducido de pacientes y por la gran variabilidad individual observada.

La relación de *Firmicutes/Bacteroidetes* se ha mencionado en muchos estudios como un marcador para la salud humana (Mariat et al., 2009). Se ha reportado que la razón *Firmicutes/Bacteroidetes* suele ser mayor en pacientes con DT2 que en controles sanos (Hall et al., 2017), y que correlaciona con la glucemia (Larsen et al., 2010). También se ha observado que las intervenciones dietarias y la pérdida de peso disminuyen esta relación (Turnbaugh et al., 2009) En nuestro estudio hubo un ligero incremento en la relación *Firmicutes/Bacteroidetes* después del tratamiento con metformina, aunque no alcanzó significancia estadística ($P=0.1212$). De manera más reciente se ha visto que, más que la abundancia de los microorganismos, para la salud humana es de primordial relevancia evaluar su funcionalidad analizando la presencia y niveles de expresión de genes relacionados con la extracción de energía por hidratos de carbono indigeribles para el huésped, o la producción de butirato, propionato y acetato (Duncan et al 2008; Lin et al., 2012). Aunque en este estudio no se analizó el metatranscriptoma para evaluar la expresión de estos genes, podrá hacerse un análisis de redes funcionales de acuerdo a los OTUS identificados en una etapa posterior.

9.3 Correlación de la Abundancia Relativa de *Firmicutes* Previa al Tratamiento (Δ HbA1c Relativa)

Se han reportado previamente correlaciones entre las abundancias relativas de algunos phyla o géneros de bacterias con parámetros bioquímicos como glucemia, % HbA1c, lípidos, etc., que no siempre son consistentes (Qin et. al., 2012, Karlsson et. al., 2013). Sin embargo, a la fecha, ningún estudio ha buscado correlaciones entre la microbiota intestinal antes del tratamiento con la respuesta a la metformina. La correlación negativa entre la abundancia de *Firmicutes* con la respuesta al tratamiento (Δ HbA1c relativa) observada en nuestro estudio es potencialmente relevante, y si se confirma en estudios posteriores, podría ser un factor que ayudara a predecir la respuesta al tratamiento. Sin embargo este hallazgo debe interpretarse con cautela, ya que solo mostró una tendencia estadística, y no ha sido replicado.

9.4 Análisis de varianza multivariado permutacional (ADONIS).

La variación cuantitativa de la composición de la MI puede estar afectada por un gran número de factores ambientales los cuales pueden tener sólo un pequeño efecto aditivo, lo que dificulta la identificación de la asociación de los cambios de la microbiota con algún parámetro específico. Estudios previos de análisis de varianza multivariado permutacional de la microbiota intestinal en más de 2000 individuos han revelado que, de manera general, los medicamentos explicaron la mayor proporción de la microbiota intestinal (10.4%) (Falony et al., 2016). De manera similar, Forslund y colaboradores (2017) analizaron 784 microbiomas intestinales humanos encontrando que el uso de metformina explicó el 3.2% de la variación de la microbiota intestinal, con una muy alta significancia ($P=2 \times 10^{-16}$). De manera similar a nuestro estudio, donde el tratamiento con metformina explicó el 2.07% de la varianza de la microbiota, aunque no alcanzó significancia estadística ($P=0.1984$),. Interesantemente, en nuestro estudio el género explicó un porcentaje de varianza pequeño (4.25%), pero estadísticamente significativo ($P=0.045$) a pesar del tamaño reducido de la muestra. Es importante buscar el efecto de esta covariable en otros estudios antes de poder concluir al respecto.

9.5 Efecto de la Dieta en la Microbiota Intestinal

Tanto estudios de corte transversal, como estudios de intervención previos han demostrado la importancia de la dieta en la composición de la microbiota intestinal en modelos animales y en humanos (Falony et al., 2016; Battson et al., 2017; Bishehsari et al., 2018; Requena et al., 2018; Cheng et al. 2018; Wang et al., 2018; Mardinoglu et al., 2018). Desafortunadamente el diseño del estudio no permitió evaluar su efecto, ya que aunque a todos los participantes se les recomendó la misma dieta, no hubo grupo sin tratamiento con metformina. Dado el número reducido de pacientes, y el bajo porcentaje de apego a la dieta, tampoco fue posible evaluar el apego a la dieta como covariable.

9.6 Limitaciones y Fortalezas del Estudio

Este es uno de los escasos estudios que analiza cambios en la microbiota intestinal por respuesta a la metformina en pacientes con DT2 sin tratamiento previo, y es el primer estudio de su tipo en población maya. Sin embargo, cuenta con algunas limitaciones. En primer lugar, está diseñado para comparar la microbiota intestinal en pacientes con DT2 antes y después del tratamiento con metformina. Por este motivo, no hay grupo control sin DT2. El estudio del grupo control podría analizar si la abundancia relativa de Protobacterias no observada en otras poblaciones se debe a factores geográficos o de otra índole. Por otro lado, el tamaño de muestra es reducido y se debe incrementar. Una limitación más es que se hizo el análisis de la composición de microbiota intestinal mediante secuenciación del gen 16s rRNA, y no se hizo análisis funcional de la microbiota. Por último, es importante correlacionar los hallazgos de microbiota intestinal con cambios metabólicos, lo cual podría hacerse en una etapa posterior del estudio.

X. CONCLUSIONES

Este es el primer estudio en población maya que analiza los cambios en la microbiota intestinal en pacientes con diabetes mellitus sin tratamiento previo, antes y después de 4 meses de iniciar tratamiento con metformina. La tasa de falta de respuesta fue alta, aún entre los individuos que mostraron adecuada adherencia al tratamiento, por lo que es necesario estudiar mejor este fenómeno, incluyendo la búsqueda de variantes genéticas con implicaciones farmacogenómicas. A pesar del tamaño reducido de la muestra y la gran variabilidad inter-individual en la microbiota intestinal, se observó una correlación significativa entre la abundancia relativa de Firmicutes antes de iniciar el tratamiento y el cambio en la hemoglobina glucosilada los niveles de hemoglobina glicosilada antes de iniciar el tratamiento. Es necesario aumentar el tamaño de la muestra para confirmar estos hallazgos y analizar los cambios a nivel género y especie.

XI. REFERENCIAS

Achenbach P, Bonifacio E, Koczwara K, Ziegler AG. Natural history of type 1 diabetes. *Diabetes* 2005; 54: S25-S31.

American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2014; 37 Suppl 1:S81-90.

Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, Fernandes GR, Tap J, Bruls T, Batto JM, Bertalan M, Borruel N, Casellas F, Fernandez L, Gautier L, Hansen T, Hattori M, Hayashi T, Kleerebezem M, Kurokawa K, Leclerc M, Levenez F, Manichanh C, Nielsen HB, Nielsen T, Pons N, Poulain J, Qin J, Sicheritz-Ponten T, Tims S, Torrents D, Ugarte E, Zoetendal EG, Wang J, Guarner F, Pedersen O, de Vos WM, Brunak S, Doré J; MetaHIT Consortium, Antolín M, Artiguenave F, Blottiere HM, Almeida M, Brechot C, Cara C, Chervaux C, Cultrone A, Delorme C, Denariáz G, Dervyn R, Foerstner KU, Friss C, van de Guchte M, Guedon E, Haimet F, Huber W, van Hylckama-Vlieg J, Jamet A, Juste C, Kaci G, Knol J, Lakhdari O, Layec S, Le Roux K, Maguin E, Mérieux A, Melo Minardi R, M'rini C, Muller J, Oozeer R, Parkhill J, Renault P, Rescigno M, Sanchez N, Sunagawa S, Torrejon A, Turner K, Vandemeulebrouck G, Varela E, Winogradsky Y, Zeller G, Weissenbach J, Ehrlich SD, Bork P. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 2011 May 12;473(7346):174-80.

Asociación Latinoamericana de Diabetes (ALAD), 2013
www.aladlatinoamerica.org/phocadownload/guias%20alad.pdf

Bankura B, Das M, Pattanayak AK, Adhikary B, Bhattacharjee R, Goswami S, Chowdhury S, Roy A. Inter-patient Variability in Clinical Efficacy of Metformin in Type 2 Diabetes Mellitus Patients in West Bengal, India. *J Metabolic Syndr* 2016; 5:198.

Battson ML, Lee DM, Weir TL, Gentile CL. The gut microbiota as a novel regulator of cardiovascular function and disease. *J Nutr Biochem* 2017; 27;56:1-15.

Binh TQ, Phuong PT, Nhung BT, Thoang DD, Lien HT, Thanh DV. Association of the common FTO-rs9939609 polymorphism with type 2 diabetes, independent of obesity-related traits in a Vietnamese population. *Gene* 2013; 513:31-5.

Bishehsari F, Engen PA, Preite NZ, Tuncil YE, Naqib A, Shaikh M, Rossi M, Wilber S, Green SJ, Hamaker BR, Khazaie K, Voigt RM, Forsyth CB, Keshavarzian A. Dietary Fiber Treatment Corrects the Composition of Gut Microbiota, Promotes SCFA Production, and Suppresses Colon Carcinogenesis. *Genes (Basel)* 2018;9(2) pii: E102.

Bonnet F, Scheen A. Understanding and overcoming metformin gastrointestinal intolerance. *Diabetes Obes Metab* 2017; 19:473-481.

Briceño SG, Silva E. Insulina, hipertension y diabetes. *Revista Latinoamericana de Hipertensión* 2007; 2:65-69.

Brown K, DeCoffe D, Molcan E, Gibson DL. Diet-induced dysbiosis of the intestinal microbiota and the effects on immunity and disease. *Nutrients* 2012; 4:1095-119.

Burguete-Garcia AI, Cruz-Lopez M, Madrid-Marina V, Lopez-Ridaura R, Hernández-Avila M, Cortina B, Gómez RE, Velasco-Mondragón E. Association of Gly972Arg polymorphism of IRS1 gene with type 2 diabetes mellitus in lean participants of a national health survey in Mexico: a candidate gene study. *Metabolism* 2010; 59:38-45.

Calvani R, Miccheli A, Capuani G, Tomassini Miccheli A, Puccetti C, Delfini M, Iaconelli A, Nanni G, Mingrone G. Gut microbiome-derived metabolites characterize a peculiar obese urinary metabolite. *Int J Obes (Lond)* 2010; 34:1095-8.

Cantarel BL, Lombard V, Henrissat B. Complex carbohydrate utilization by the healthy human microbiome. *PLoS One* 2012; 7:e28742.

Chen Y, Wang Y, Zhang J, Deng Y, Jiang L, Song E, Wu XS, Hammer JA, Xu T, Lippincott-Schwartz J. Rab10 and myosin-Va mediate insulin-stimulated GLUT4 storage vesicle translocation in adipocytes. *J Cell Biol* 2012; 198:545-60.

Cheng W, Lu J, Lin W, Wei X, Li H, Zhao X, Jiang A, Yuan J. Effects of a galacto-oligosaccharide-rich diet on fecal microbiota and metabolite profiles in mice. *Food Funct* 2018; 9:1612-1620.

Cho I, Yamanishi S, Cox L, Methé BA, Zavadil J, Li K, Gao Z, Mahana D, Raju K, Teitler I, Li H, Alekseyenko AV, Blaser MJ. Antibiotics in early life alter the murine colonic microbiome and adiposity. *Nature* 2012; 488:621-6.

Cline GW, Petersen KF, Krssak M, Shen J, Hundal RS, Trajanoski Z, Inzucchi S, Dresner A, Rothman DL, Shulman GI. Impaired glucose transport as a cause of decreased insulin-stimulated muscle glycogen synthesis in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 1999; 341:240-6.

Das SK, Elbein SC. The Genetic Basis of Type 2 Diabetes. *Cellscience* 2006; 30:2100-131.

Davis SN. Insulina, hipoglucemiantes orales y propiedades farmacológicas del páncreas endocrino. In: Brunton LL, Lazo JS, Parker KL et al. Goodman y Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 11th ed. McGraw-Hill; 2006. pp. 1613-1645.

De la Cuesta-Zuluaga J, Mueller NT, Corrales Agudelo V, Velásquez-Mejía EP, Carmona JA, Abad JM, Escobar JS. Metformin Is Associated With Higher Relative Abundance of Mucin-Degrading *Akkermansia muciniphila* and Several Short-Chain Fatty Acid Producing Microbiota in the Gut. *Diabetes Care* 2017, 40, 54–62.

Donath MY, Ehses JA, Maedler K, Schumann DM, Ellingsgaard H, Eppler E, Reinecke M. Mechanisms of β -cell death in type 2 diabetes. *Diabetes*.2005; 54: S108-S113.

Duncan SH, Lopley GE, Holtrop G, Ince J, Johnstone AM, Louis P, Flint HJ. Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *Int J Obes (Lond)* 2008; 32:1720-4.

Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006 – ENSANUT 2006
<http://www.insp.mx/ensanut/www.insp.mx/ensanut/>.

Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012 – ENSANUT 2012
ensanut.insp.mx/informes/ENSANUT2012ResultadosNacionales.pdf

Encuesta Nacional de Salud y Nutrición Medio Camino 2016 – ENSANUT MC 2016
<http://ensanut.insp.mx/ensanut2016/index.php#.WpbcTlrOVdh>

Esparza-Castro D, Andrade-Ancira FJ, Merelo-Arias CA, Cruz M, Valladares-Salgado A. Escaneo genómico completo en diabetes tipo 2 y su aplicación clínica. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social* 2015; 53: 592-599.

Falk PG, Hooper LV, Midvedt T, Gordon JI. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62:1157-1170.

Falony G, Joossens M, Vieira-Silva S, Wang J, Darzi Y, Faust K, Kurilshikov A, Bonder MJ, Valles-Colomer M, Vandeputte D, Tito RY, Chaffron S, Rymenans L, Verspecht C, De Sutter L, Lima-Mendez G, D'hoë K, Jonckheere K, Homola D, Garcia R, Tigchelaar EF, Eeckhaut L, Fu J, Henckaerts L, Zhernakova A, Wijmenga C, Raes J. Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science* 2016; 352:560-4.

Florez JC, Jablonski KA, Taylor A, Mather K, Horton E, White NH, Barrett-Connor E, Knowler WC, Shuldiner AR, Pollin TI; Diabetes Prevention Program Research Group. The C allele of ATM rs11212617 does not associate with metformin response in the Diabetes Prevention Program. *Diabetes Care* 2012; 35:1864-7.

Forslund K, Hildebrand F, Nielsen T, Falony G, Le Chatelier E, Sunagawa S, Prifti E, Vieira-Silva S, Gudmundsdottir V, Pedersen HK, Arumugam M, Kristiansen K, Voigt AY, Vestergaard H, Herczeg R, Costea PI, Kultima JR, Li J, Jørgensen T, Levenez F, Dore J; MetaHIT consortium, Nielsen HB, Brunak S, Raes J, Hansen T, Wang J, Ehrlich SD, Bork P, Pedersen O. Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota. *Nature*. 2015; 528:262-266.

Gerich JE. The genetic basis of type 2 diabetes mellitus: impaired insulin secretion versus impaired insulin sensitivity. *Endocrine reviews* 1998; 19:491-503.

Greiner T, Backhed F. Effects of the gut microbiota on obesity and glucose homeostasis. *Trends Endocrinol Metab* 2011; 22:117–23.

Gutiérrez-Robledo C, Roura-Guiberna A, Olivares-Reyes JA. Mecanismos moleculares de la resistencia a la insulina: una actualización. *Gac Med Mex* 2017; 153:214-228.

Guzmán JN, Madrigal BE. Revisión de las características clínicas, metabólicas y genéticas de la diabetes mellitus. *Bioquímica* 2003; 28: 14-23.

Hall AB, Tolonen AC, Xavier RJ. Human genetic variation and the gut microbiome in disease. *Nat Rev Genet* 2017; 18:690-699.

Hardie DG, Ross FA, Hawley SA. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; 13:251-62.

Harris M, Zimmet P. Classification of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. In: *International Textbook of Diabetes Mellitus. Second Edition.* . Alberti K, Zimmet P, DeFronzo R, editors., John Wiley and Sons Ltd; Chichester, UK 1997, pp 9-23.

Hirst JA, Farmer AJ, Ali R, Roberts NW, Stevens RJ. Quantifying the effect of metformin treatment and dose on glycemic control. *Diabetes Care* 2012; 35:446-54.

Hooper LV, Gordon JI. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* 2001; 292: 1115–8.

Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI. How host microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu Rev Nutr* 2002; 22: 283-307.

Hosseyeni-Talei SR, Mahrooz A, Hashemi-Soteh MB, Ghaffari-Cherati M, Alizadeh A. Association between the synonymous variant organic cation transporter 3 (OCT3)-1233G>A and the glycemic response following metformin therapy in patients with type 2 diabetes. *Iran J Basic Med Sci* 2017; 20:250-255.

International Diabetes Federation [IDF] (2013) Online version of IDF Diabetes Atlas: <https://www.idf.org/e-library/epidemiology-research/diabetes-atlas/19-atlas-6th-edition.html>

International Diabetes Federation [IDF] (2015) Online version of IDF Diabetes Atlas: https://www.oedg.at/pdf/1606_IDF_Atlas_2015_UK.pdf

Kahn SE, Haffner SM, Heise MA, Herman WH, Holman RR, Jones NP, Kravitz BG, Lachin JM, O'Neill MC, Zinman B, Viberti G; ADOPT Study Group. Glycemic durability of rosiglitazone, metformin, or glyburide monotherapy. *N Engl J Med* 2006; 355:2427-43.

Karlsson FH, Tremaroli V, Nookaew I, Bergström G, Behre CJ, Fagerberg B, Nielsen J, Bäckhed F. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature* 2013; 498:99-103.

Kim YD, Park KG, Lee YS, Park YY, Kim DK, Nedumaran B, Jang WG, Cho WJ, Ha J, Lee IK, Lee CH, Choi HS. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis through AMP-activated protein kinase-dependent regulation of the orphan nuclear receptor SHP. *Diabetes*. 2008 Feb;57(2):306-14.

Larsen N, Vogensen FK, van den Berg FW, Nielsen DS, Andreasen AS, Pedersen BK, Al-Soud WA, Sørensen SJ, Hansen LH, Jakobsen M. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS One* 2010; 5:e9085.

Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, Almeida M, Arumugam M, Batto JM, Kennedy S, Leonard P, Li J, Burgdorf K, Grarup N, Jørgensen T, Brandslund I, Nielsen HB, Juncker AS, Bertalan M, Levenez F, Pons N, Rasmussen S, Sunagawa S, Tap J, Tims S, Zoetendal EG, Brunak S, Clément K, Doré J, Kleerebezem M, Kristiansen K, Renault P, Sicheritz-Ponten T, de Vos WM, Zucker JD, Raes J, Hansen T; MetaHIT consortium, Bork P, Wang J, Ehrlich SD, Pedersen O. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* 2013; 500:541-6.

Lederberg J, McCray A. Ome sweet 'omics: A genealogical treasury of words. *The Scientist*. 2001; 15:8.

Lee H, Ko G. Effect of metformin on metabolic improvement and gut microbiota. *Appl Environ Microbiol* 2014;80: 5935-43.

Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 2006; 444:1022-3.

López-Contreras BE, Morán-Ramos S, Villarruel-Vázquez R, Macías-Kauffer L, Villamil-Ramírez H, León-Mimila P, Vega-Badillo J, Sánchez-Muñoz F, Llanos-Moreno LE, Canizalez-Román A, Del Río-Navarro B, Ibarra-González I, Vela-Amieva M, Villarreal-Molina T, Ochoa-Leyva A, Aguilar-Salinas CA, Canizales-Quinteros S. Composition of gut microbiota in obese and normal-weight Mexican school-age children and its association with metabolic traits. *Pediatr Obes*. 2017 Dec 5. doi: 10.1111/ijpo.12262. [Epub ahead of print]

Maedler K. Beta cells in type 2 diabetes –a crucial contribution to pathogenesis. *Diabetes Obes Metab*. 2008; 10:408-420.

Mahida YR. Microbial-gut interactions in health and disease. Epithelial cell responses. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004; 18:241-53.

Mahrooz A, Parsanasab H, Hashemi-Soteh MB, Kashi Z, Bahar A, Alizadeh A, Mozayeni M. The role of clinical response to metformin in patients newly diagnosed with type 2 diabetes: a monotherapy study. *Clin Exp Med* 2015; 15:159-65.

Mardinoglu A, Wu H, Bjornson E, Zhang C, Hakkarainen A, Räsänen SM, Lee S, Mancina RM, Bergentall M, Pietiläinen KH, Söderlund S, Matikainen N, Ståhlman M, Bergh PO, Adiels M, Piening BD, Granér M, Lundbom N, Williams KJ, Romeo S, Nielsen J, Snyder M, Uhlén M, Bergström G, Perkins R, Marschall HU, Bäckhed F, Taskinen MR, Borén J. An Integrated Understanding of the Rapid Metabolic Benefits of a Carbohydrate-Restricted Diet on Hepatic Steatosis in Humans. *Cell Metab* 2018; 27:559-571.

Martin FP, Wang Y, Sprenger N, Yap IK, Lundstedt T, Lek P, Rezzi S, Ramadan Z, van Bladeren P, Fay LB, Kochhar S, Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. Probiotic modulation of symbiotic gut microbial-host metabolic interactions in a humanized microbiome mouse model. *Mol Syst Biol* 2008; 4:157.

Napolitano A, Miller S, Nicholls AW, Baker D, Van Horn S, Thomas E, Rajpal D, Spivak A, Brown JR, Nunez DJ. Novel gut-based pharmacology of metformin in patients with type 2 diabetes mellitus. *PLoS One* 2014; 9:e100778.

Nathan DM, Buse JB, Davidson MB, Ferrannini E, Holman RR, Sherwin R, Zinman B; American Diabetes Association; European Association for Study of Diabetes. Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care* 2009; 32:193-203.

Nicholson JK, Holmes E, Kinross J, Burcelin R, Gibson G, Jia W, Pettersson S. Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science* 2012; 336:1262–7.

O’Shea EF, Cotter PD, Stanton C, Ross RP, Hill C. Production of bioactive substances by intestinal bacteria as a basis for explaining probiotic mechanisms: bacteriocins and conjugated linoleic acid. *Int J Food Microbiol* 2012; 152:189 –205.

Ouwehand AC, Vaughan EE, editors. *Gastrointestinal microbiology*. New York : Informa Healthcare; 2006.

Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, Kummeling I, van den Brandt PA, Stobberingh EE. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* 2006; 118:511-21.

Prakash S, Tomaro-Duchesneau C, Saha S, Cantor A. The gut microbiota and human health with an emphasis on the use of microencapsulated bacterial cells. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011:981214.

Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Li S, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Li S, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Doré J, Guarner F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J; MetaHIT Consortium, Bork P, Ehrlich SD, Wang J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010; 464:59-65.

Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, Liang S, Zhang W, Guan Y, Shen D, Peng Y, Zhang D, Jie Z, Wu W, Qin Y, Xue W, Li J, Han L, Lu D, Wu P, Dai Y, Sun X, Li Z, Tang A, Zhong S, Li X, Chen W, Xu R, Wang M, Feng Q, Gong M, Yu J, Zhang Y, Zhang M, Hansen T, Sanchez G, Raes J, Falony G, Okuda S, Almeida M, LeChatelier E, Renault P, Pons N, Batto JM, Zhang Z, Chen H, Yang R, Zheng W, Li S, Yang H, Wang J, Ehrlich SD, Nielsen R, Pedersen O, Kristiansen K, Wang J. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* 2012; 490:55-60.

Rajilić-Stojanović M, Heilig HG, Molenaar D, Kajander K, Surakka A, Smidt H, de Vos WM. Development and application of the human intestinal tract chip, a phylogenetic microarray: analysis of universally conserved phylotypes in the abundant microbiota of young and elderly adults. *Environ Microbiol* 2009; 11:1736-51.

Ramírez-Ordoñez M, Ascanio-Carvajalino M, Coronado-Cote MP, Gómez-Mora CA, Mayorga-Ayala LD, Medina-Ospino R.. Estilo de vida actual de los pacientes con diabetes mellitus tipo 2". *Revista Ciencia y Cuidado* 2011; 8:21-28.

Ravier MA, Nenquin M, Miki T, Seino S, Henquin JC. Glucose controls cytosolic Ca²⁺ and insulin secretion in mouse islets lacking ATP-sensitive K⁺ channels owing to a knockout of the pore-forming subunit Kir6.2. *Endocrinology* 2009; 150:33–45.

Requena T, Martínez-Cuesta MC, Peláez C. Diet and microbiota linked in health and disease. *Food Funct* 2018; 21:688-704.

Rotella CM, Monami M, Mannucci E. Metformin beyond diabetes: new life for an old drug. *Curr Diabetes Rev* 2006; 2:307–315.

Salas-Salvadó J, Martínez-González MÁ, Bulló M, Ros E. The role of diet in the prevention of type 2 diabetes. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2011; 21 Suppl 2:B32-48.

Santulli G, Lombardi A, Sorriento D, Anastasio A, Del Giudice C, Formisano P, Béguinot F, Trimarco B, Miele C, Iaccarino G. Age-related impairment in insulin release: the essential role of $\beta(2)$ -adrenergic receptor. *Diabetes* 2012; 61: 692-701.

Sato J, Kanazawa A, Ikeda F, Yoshihara T, Goto H, Abe H, Komiya K, Kawaguchi M, Shimizu T, Ogihara T, Tamura Y, Sakurai Y, Yamamoto R, Mita T, Fujitani Y, Fukuda H, Nomoto K, Takahashi T, Asahara T, Hirose T, Nagata S, Yamashiro Y, Watada H. Gut dysbiosis and detection of "live gut bacteria" in blood of Japanese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2014; 37:2343-50.

Saxena R, Elbers CC, Guo Y, Peter I, Gaunt TR, Mega JL, Lanktree MB, Tare A, Castillo BA, Li YR, Johnson T, Bruinenberg M, Gilbert-Diamond D, Rajagopalan R, Voight BF, Balasubramanyam A, Barnard J, Bauer F, Baumert J, Bhangale T, Böhm BO, Braund PS, Burton PR, Chandrupatla HR, Clarke R, Cooper-DeHoff RM, Crook ED, Davey-Smith G, Day IN, de Boer A, de Groot MC, Drenos F, Ferguson J, Fox CS, Furlong CE, Gibson Q, Gieger C, Gilhuijs-Pederson LA, Glessner JT, Goel A, Gong Y, Grant SF, Grobbee DE, Hastie C, Humphries SE, Kim CE, Kivimaki M, Kleber M, Meisinger C, Kumari M, Langae TY, Lawlor DA, Li M, Lobbmeyer MT, Maitland-van der Zee AH, Meijs MF, Molony CM, Morrow DA, Murugesan G, Musani SK, Nelson CP, Newhouse SJ, O'Connell JR, Padmanabhan S, Palmen J, Patel SR, Pepine CJ, Pettinger M, Price TS, Rafelt S, Ranchalis J, Rasheed A, Rosenthal E, Ruczinski I, Shah S, Shen H, Silbernagel G, Smith EN, Spijkerman AW, Stanton A, Steffes MW, Thorand B, Trip M, van der Harst P, van der A DL, van Iperen EP, van Setten J, van Vliet-Ostaptchouk JV, Verweij N, Wolffenbuttel BH, Young T, Zafarmand MH, Zmuda JM; Look AHEAD Research Group; DIAGRAM consortium, Boehnke M, Altshuler D, McCarthy M, Kao

WH, Pankow JS, Cappola TP, Sever P, Poulter N, Caulfield M, Dominiczak A, Shields DC, Bhatt DL, Zhang L, Curtis SP, Danesh J, Casas JP, van der Schouw YT, Onland-Moret NC, Doevendans PA, Dorn GW 2nd, Farrall M, FitzGerald GA, Hamsten A, Hegele R, Hingorani AD, Hofker MH, Huggins GS, Illig T, Jarvik GP, Johnson JA, Klungel OH, Knowler WC, Koenig W, März W, Meigs JB, Melander O, Munroe PB, Mitchell BD, Bielinski SJ, Rader DJ, Reilly MP, Rich SS, Rotter JI, Saleheen D, Samani NJ, Schadt EE, Shuldiner AR, Silverstein R, Kottke-Marchant K, Talmud PJ, Watkins H, Asselbergs FW, de Bakker PI, McCaffery J, Wijmenga C, Sabatine MS, Wilson JG, Reiner A, Bowden DW, Hakonarson H, Siscovick DS, Keating BJ. Large-scale gene-centric meta-analysis across 39 studies identifies type 2 diabetes loci. *Am J Hum Genet* 2012; 90: 410-425.

Serrano R, Villar M, Martínez C, Carrascosa JM, Gallardo N, Andrés A. Differential gene expression of insulin receptor isoforms A and B and insulin receptor substrates 1, 2 and 3 in rat tissues: modulation by aging and differentiation in rat adipose tissue. *J Mol Endocrinol* 2005; 34:153-161.

Sharabi Y. Management of the unholy trinity diabetes-obesity-hypertension (diabetesotension). *Diabetes Metab Res Rev* 2012 Nov 20. doi: 10.1002/dmrr.2371.

Shin NR, Lee JC, Lee HY, Kim MS, Whon TW, Lee MS, Bae JW. An increase in the *Akkermansia* spp. population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in diet-induced obese mice. *Gut* 2014; 63: 727–735.

Shokri F, Ghaedi H, Ghafouri Fard S, Movafagh A, Abediankenari S, Mahrooz A, Kashi Z, Omrani MD. Impact of ATM and SLC22A1 Polymorphisms on Therapeutic Response to Metformin in Iranian Diabetic Patients. *Int J Mol Cell Med* 2016; 5:1-7.

Shu Y, Sheardown SA, Brown C, Owen RP, Zhang S, Castro RA, Ianculescu AG, Yue L, Lo JC, Burchard EG, Brett CM, Giacomini KM. Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1 (OCT1) on metformin action. *J Clin Invest* 2007; 117:1422-31.

SIGMA Type 2 Diabetes Consortium, Williams AL, Jacobs SB, Moreno-Macías H, Huerta-Chagoya A, Churchhouse C, Márquez-Luna C, García-Ortíz H, Gómez-Vázquez MJ, Burt NP, Aguilar-Salinas CA, González-Villalpando C, Florez JC, Orozco L, Haiman CA, Tusié-Luna T, Altshuler D. Sequence variants in SLC16A11 are a common risk factor for type 2 diabetes in Mexico. *Nature* 2014; 506:97-101.

Sohail MU, Althani A, Anwar H, Rizzi R, Marei HE. Role of the Gastrointestinal Tract Microbiome in the Pathophysiology of Diabetes Mellitus. *J Diabetes Res* 2017;2017:9631435.

Sonnenburg JL, Xu J, Leip DD, Chen CH, Westover BP, Weatherford J, Buhler JD, Gordon JI. Glycan foraging in vivo by an intestine-adapted bacterial symbiont. *Science* 2005; 307:1955-9.

Steinthorsdottir V, Thorleifsson G, Reynisdottir I, Benediktsson R, Jonsdottir T, Walters GB, Styrkarsdottir U, Gretarsdottir S, Emilsson V, Ghosh S, Baker A, Snorraddottir S, Bjarnason H,

Ng MC, Hansen T, Bagger Y, Wilensky RL, Reilly MP, Adeyemo A, Chen Y, Zhou J, Gudnason V, Chen G, Huang H, Lashley K, Doumatey A, So WY, Ma RC, Andersen G, Borch-Johnsen K, Jorgensen T, van Vliet-Ostaptchouk JV, Hofker MH, Wijmenga C, Christiansen C, Rader DJ, Rotimi C, Gurney M, Chan JC, Pedersen O, Sigurdsson G, Gulcher JR, Thorsteinsdottir U, Kong A, Stefansson K. A variant in CDKAL1 influences insulin response and risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 2007; 39:770-5.

Stöckli J, James DE. Insulin action under arrestin. *Cell Metab* 2009; 9: 213-214.

Thomas CM, Hong T, van Pijkeren JP, Hemarajata P, Trinh DV, Hu W, Britton RA, Kalkum M, Versalovic J. Histamine derived from probiotic *Lactobacillus reuteri* suppresses TNF via modulation of PKA and ERK signaling. *PLoS One* 2012; 7:e31951.

Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*. 2006; 444:1027-31.

Turnbaugh PJ, Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Knight R, Gordon JI. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci Transl Med* 2009; 1:6ra14.

Turrone F, Bottacini F, Foroni E, Mulder I, Kim JH, Zomer A, Sánchez B, Bidossi A, Ferrarini A, Giubellini V, Delledonne M, Henrissat B, Coutinho P, Oggioni M, Fitzgerald GF, Mills D, Margolles A, Kelly D, van Sinderen D, Ventura M. Genome analysis of *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 reveals metabolic pathways for host-derived glycan foraging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 19514-9.

Villarreal-Molina MT, Flores-Dorantes MT, Arellano-Campos O, Villalobos-Comparan M, Rodríguez-Cruz M, Miliar-García A, Huertas-Vazquez A, Menjivar M, Romero-Hidalgo S, Wachter NH, Tusie-Luna MT, Cruz M, Aguilar-Salinas CA, Canizales-Quinteros S; Metabolic Study Group. Association of the ATP-binding cassette transporter A1 R230C variant with early-onset type 2 diabetes in a Mexican population. *Diabetes* 2008; 57:509-13.

Wang H, Hong T, Li N, Zang B, Wu X. Soluble dietary fiber improves energy homeostasis in obese mice by remodeling the gut microbiota. *Biochem Biophys Res Commun* 2018; 498:146-151.

Wu H, Esteve E, Tremaroli V, Khan MT, Caesar R, Mannerås-Holm L, Ståhlman M, Olsson LM, Serino M, Planas-Fèlix M, Xifra G, Mercader JM, Torrents D, Burcelin R, Ricart W, Perkins R, Fernández-Real JM, Bäckhed F. Metformin alters the gut microbiome of individuals with treatment-naïve type 2 diabetes, contributing to the therapeutic effects of the drug. *Nat Med* 2017; 23:850-858.

Yu LC, Wang JT, Wei SC, Ni YH. Host-microbial interactions and regulation of intestinal epithelial barrier function: From physiology to pathology. *World J Gastrointest Pathophysiol* 2012; 3:27-43.

Zeitler P, Hirst K, Pyle L, Linder B, Copeland K, Arslanian S, Cuttler L, Nathan DM, Tollefsen S, Wilfley D, Kaufman F; TODAY Study Group. A clinical trial to maintain glycemic control in youth with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2012; 366:2247–2256.

Zhao L, Shen J. Whole-body systems approaches for gut microbiota-targeted, preventive healthcare. *J Biotechnol* 2010; 149:183–90.

Zhuo F, Gilbert ER, Liu D. Regulation of Insulin Synthesis and Secretion and Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes. *Curr Diabetes Rev* 2013; 9:25–53.

ANEXO 1

Tecnología, seguimiento y respuesta a metformina de diabéticos con datos genómicos y metagenómicos.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

1. *Presentación*

Queremos invitarlo a formar parte del Proyecto de Investigación Titulado “**Tecnología, seguimiento y respuesta a metformina de diabéticos con datos genómicos y metagenómicos.**”, el cual será desarrollado por investigadores de la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY) y del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN). El propósito principal de este proyecto es valorar si el tratamiento de la diabetes mellitus con un medicamento llamado metformina, causa un cambio en la composición de los microorganismos presentes en su intestino, y si esto se asocia a una mejoría en su estado metabólico y salud.

2. *¿Cuál es el propósito de esta investigación?*

Los genes son la base del “manual de instrucciones” que usan las células para formar nuestro cuerpo y están hechos de ADN. Más del 99.9% del ADN de una persona es idéntico al de cualquier otra persona que no sea su pariente, sin embargo no existen dos personas que tengan exactamente el mismo ADN (excepto los gemelos idénticos). Las diferencias en el ADN son conocidas como variaciones genéticas. Estas variaciones explican algunas de las diferencias físicas entre la gente, y explican en parte por qué algunas personas sufren enfermedades como cáncer, diabetes, asma o depresión, mientras que otras no. También pueden explicar por qué las personas con algunas enfermedades presentan respuestas diferentes al mismo tratamiento.

Las bacterias y otros microorganismos que están en nuestro cuerpo tienen su propio ADN, que también puede afectar nuestra salud. Normalmente, muchos microorganismos viven en nuestro intestino sin causar directamente enfermedad, pero su presencia o su composición pueden tener un efecto en nuestro estado metabólico y nuestro estado general de salud.

El propósito del Proyecto “**Tecnología, seguimiento y respuesta a metformina de diabéticos con datos genómicos y metagenómicos**” es valorar si el tratamiento de la diabetes mellitus con un medicamento llamado metformina, causa un cambio en la composición de los microorganismos presentes en su intestino, y si esto se asocia a una mejoría en su estado metabólico y salud. Esto se puede saber aislando el ADN de los microorganismos a partir de muestras de materia fecal. También se pretende evaluar si ciertas variaciones genéticas del ADN humano tienen influencia en la manera en que los pacientes con diabetes mellitus responden al tratamiento. Esto se realizará mediante el estudio del ADN de muestras de sangre colectadas en individuos que presenten diabetes mellitus.

Se espera que los datos que se obtengan de este estudio sean útiles para ayudar a que futuros investigadores contribuyan al conocimiento de la salud y las enfermedades. Se espera también que estos datos ayuden a entender mejor como las personas responden de manera diferente a distintas dietas y medicamentos. Posiblemente, otros estudios futuros utilicen estos datos y muestras para entender mejor la variación genética, el papel de los microorganismos intestinales en la salud y enfermedad, así como otras preguntas importantes de la biología humana.

3. *¿Por qué se le ha invitado a participar en el estudio?*

Este proyecto incluirá al menos 100 participantes, hombres y mujeres con diabetes mellitus tipo 2 de reciente diagnóstico y que tengan ascendencia Maya.

Usted ha sido invitado a participar en el estudio por las siguientes razones:

- Usted tiene ascendencia Maya.
- Usted tiene entre 20 y 70 años, se le acaba de diagnosticar diabetes mellitus tipo 2, y no ha recibido tratamiento previo para esta enfermedad.
- Usted necesita tratamiento y seguimiento para la diabetes, y está inscrito al Seguro Popular.

Su nombre y sus datos personales no serán divulgados. Las muestras de ADN que se obtengan de su sangre y de su materia fecal no serán identificadas con su nombre ni con ningún dato personal que permita relacionarlas con usted. Todas las muestras serán identificadas con un código que será asignado por los investigadores, y no será divulgado.

Si usted está interesado en ser parte de este proyecto, por favor lea el resto de este documento y tome todo el tiempo que necesite para hacer preguntas y resolver sus dudas. La decisión de participar o no es completamente voluntaria y depende solamente de Usted. Su atención médica no se verá afectada por su decisión de participar o no en este estudio.

4. *¿Qué se me pedirá hacer si estoy interesado en participar?*

Si usted acepta participar en el estudio:

- 1) Se le citará un total de 3 veces en un lapso de 4 meses. La duración de cada cita no será mayor a una hora.
- 2) En la cita inicial, se le pesará y se le medirá la proporción de grasa corporal, y se le tomará una muestra de sangre de aproximadamente 32 mililitros (el equivalente a un poco más de 2 cucharadas soperas) de uno de sus brazos. La toma de la muestra de sangre no representa un riesgo adicional para su salud. Los riesgos de los participantes son posibles molestias debido a la punción venosa para la toma de una muestra de sangre, pudiendo presentar un hematoma (moretón), lo que podría provocar dolor mínimo controlable con analgésicos en dosis bajas.

- 3) Si es mujer en edad reproductiva, se le hará una prueba de embarazo. Usted no debe recibir tratamiento médico con metformina si está embarazada, ya que no se sabe si la metformina pueda causarle daño al feto. Si acepta participar en el estudio, se le pedirá que siga algún método anticonceptivo durante el estudio, que puede ser hormonal o la combinación de 2 métodos de barrera, y se le hará una prueba de embarazo en orina en cada cita de seguimiento.
- 4) Si usted llegara a embarazarse, saldrá de este estudio de investigación, el médico le indicará qué tratamiento debe seguir, y se le dará seguimiento hasta el término del embarazo.
- 5) Se le pedirá que done una muestra de materia fecal antes de iniciar el tratamiento. Se le dará un instructivo, y un frasco estéril para recolectar esta muestra, y se le explicará cómo entregarla a los investigadores de este estudio.
- 6) Se le enseñará a monitorear sus niveles de glucosa con un glucómetro proporcionado en su primera visita, y se le pedirá que monitoree sus niveles de glucosa 3 veces por semana.
- 7) Se le dará un dispositivo llamado VITADAT, que permite el envío automático a la del resultado de sus mediciones de glucosa a una plataforma a la que su médico tiene acceso. Se le explicará detalladamente cómo utilizar este dispositivo.
- 8) Se le iniciará tratamiento para su diabetes mellitus con un medicamento llamado metformina.
- 9) La muestra de sangre será utilizada para analizar su glucosa y hemoglobina glicosilada, y para extraer material con información genética (ADN). Este material se almacenará en un repositorio en el INMEGEN y será utilizado por los investigadores en este proyecto y posiblemente en futuros proyectos que investiguen el papel de los genes en enfermedades metabólicas.
- 10) Se le pedirá que acuda a 2 consultas de seguimiento, cada 8 semanas. En estas 2 citas subsecuentes, se le medirá otra vez su peso y composición corporal, se valorará su apego al tratamiento y se le tomará una muestra de 8 mililitros de sangre periférica (menos de 1 cucharada sopera) para analizar su perfil de lípidos y glucosa. Se le tomarán en total alrededor de 48 mililitros (aproximadamente 3 cucharadas soperas) de sangre de su brazo en 3 citas distintas, separadas por un lapso de 2 meses cada una (32 mililitros en la primera cita, 8 mililitros en la segunda cita y 8 mililitros en la tercera cita y última cita).
- 11) La información derivada del estudio de las muestras será guardada en bases de datos científicas a las que tendrán acceso los investigadores del INMEGEN y la UADY que participen en el estudio. Esta información podrá ser utilizada para otros proyectos futuros relacionados con la salud.

5. *¿Qué es la Metformina?*

Como tratamiento de su diabetes, se la pedirá que tome un medicamento llamado metformina. Este es un medicamento aprobado en México para el tratamiento de la diabetes. El médico le indicará la dosis que debe tomar.

Se define evento adverso, cualquier evento médico imprevisto e inesperado que causa daño o complicación al paciente o sujeto de investigación clínica a quien se le administró un medicamento y que puede o no tener una relación con este tratamiento. La metformina puede asociarse a efectos los siguientes eventos adversos: ocasionalmente dolor de estómago, náuseas, vómitos, diarrea y falta de apetito; en raras ocasiones sabor metálico desagradable en la boca; y muy rara vez puede causar enrojecimiento de la piel, dolor de cabeza o dolores musculares.

Cualquier malestar que presente durante el tratamiento deberá notificarlo a su médico para su registro y seguimiento.

En caso de presentar un evento adverso el investigador podrá retirarlo del estudio si lo considera necesario. El Seguro Popular cubrirá cualquier gasto que se genere para tratar el evento adverso. Si usted llegara a presentar algún evento adverso por favor comuníquese con la Dra. Ligia Vera Gamboa, investigadora del Centro de Investigaciones Regionales (CIR) “Dr. Hideyo Noguchi” Universidad Autónoma de Yucatán UADY) al teléfono +52 (999) 958 0215, o bien al celular (999) 958 0215.

6. *¿Qué pasará con mis muestras?*

Sus muestras de ADN obtenidas de sangre y de materia fecal serán resguardadas en el Repositorio de Instituto Nacional de Medicina Genómica para ser procesadas y almacenadas. El Repositorio está ubicado en la Ciudad de México y estará supervisado por personal del INMEGEN. Su participación será anónima por respeto a su privacidad.

Si decide retirarse del estudio, sus muestras serán destruidas.

7. *¿Cuáles son los costos y gratificaciones?*

Participar en este proyecto no tendrá ningún costo para usted. Las consultas, los exámenes de sangre y en su caso, las pruebas de embarazo, no tendrán costo alguno para usted. Algunas de las investigaciones que se hagan con sus muestras o con la información de las bases de datos científicas podrían eventualmente derivar en el desarrollo de pruebas diagnósticas o predictivas, medicamentos, u otro producto comercial. Si esto ocurre, usted no recibirá ninguna gratificación o ganancia por dichos productos, ni gozará de descuentos o acceso especial a los productos. Usted no recibirá ningún pago o remuneración por participar en este estudio, ni se le pagarán viáticos.

8. ¿Cuáles son los beneficios de participar en el proyecto?

Probablemente usted no se beneficiará personalmente por haber donado una muestra para este proyecto porque este tipo de investigaciones normalmente requieren mucho tiempo para producir resultados médicamente útiles. Sin embargo, esperamos que su participación ayude a otros investigadores a entender más sobre la variación genética humana, los microorganismos que habitan el intestino y su relación con la salud y la enfermedad.

9. ¿Cuáles son los riesgos de participar?

La toma de la muestra de sangre no representa un riesgo adicional para su salud. Puede que usted presente un ligero dolor y/o un pequeño moretón al tomarle la muestra de sangre, lo que podría provocar dolor mínimo controlable con analgésicos en dosis bajas. También existe una baja probabilidad de que usted tenga una infección, sangrado excesivo, se sienta mareado o se desmaye por la toma de sangre. En caso de presentar alguna complicación por la toma de la muestra de sangre, los médicos responsables le proporcionarán inmediatamente el tratamiento adecuado. En caso de presentar una infección, se le proporcionará el tratamiento adecuado en su unidad de atención, sin ningún costo para usted.

La toma de la muestra de heces fecales no representa ningún riesgo para su salud, será utilizada únicamente para identificar los microorganismos que habitan en su intestino antes y después de iniciar el tratamiento.

El uso del dispositivo VITADAT no representa ningún riesgo para su salud, solo envía automáticamente las mediciones de glucosa obtenidos con su glucómetro a una plataforma, que permitirá que haya una red privada de colaboración entre usted, el personal de salud, y si usted así lo desea, sus familiares y/o cuidadores.

Aunque no se divulgará su nombre y tomaremos todas las medidas posibles para proteger su privacidad (véase #9. *¿Cómo protegerán mi privacidad?*), generaremos información genética acerca de cada persona que acepte participar en el estudio. Solamente los científicos del INMEGEN y de la UADY podrán tener acceso a dicha información, y resguardarán su privacidad.

En caso de presentar un evento adverso relacionado con la toma de metformina, se le dará el tratamiento necesario mediante el Seguro Popular. Debido a que la metformina es un medicamento ya aprobado como tratamiento para la diabetes tipo 2 en México, este estudio no prevé indemnizar a los pacientes por eventos adversos.

Conforme avanza la tecnología, nuevas formas de relacionar la información con usted podrían aparecer, las cuales ahora no podemos prever. Así mismo, no siempre se pueden prever los resultados de la investigación, de manera que nuevos riesgos podrían aparecer en el futuro

que no podemos predecir ahora. Creemos que los beneficios de aprender más acerca de la variación genética humana, los microorganismos que habitan su intestino y su relación con la salud y enfermedad superan los posibles riesgos actuales y futuros, pero esto es algo que debe valorar usted mismo.

10. ¿Cómo protegerán mi privacidad?

Protegeremos su privacidad de diferentes maneras:

- Guardaremos su consentimiento informado en un archivo seguro; únicamente los miembros del grupo de trabajo del INMEGEN y de la UADY tendrán acceso a este archivo.
- La información genética que se obtenga será guardada con un código que identifique su muestra, pero que no revele información personal de usted (como su nombre, domicilio, fecha de nacimiento, etc.).

Debido a estas medidas, será extremadamente difícil que una persona que consulte la base de datos científicas pueda saber si hay o no información de usted en dicha base de datos.

11. ¿Puedo cambiar de opinión después de que he decidido participar?

Sí, usted puede decidir retirarse del estudio en cualquier momento, sin que esto afecte la atención médica que está recibiendo. En este caso, su muestra será destruida y los datos obtenidos de ella serán retirados del análisis del proyecto.

12. ¿A quién puedo llamar si tengo preguntas sobre este proyecto?

Si usted tiene preguntas acerca de la recolección de muestras, sus derechos en este proyecto o sobre el almacenamiento de las mismas, contacte:

Dudas sobre el proyecto de investigación:

- A la Dra. María Teresa Villarreal Molina, Laboratorio de Genómica de Enfermedades Cardiovasculares INMEGEN al teléfono (55) 5350-1900 ext. 1161, email:mvillareal@inmegen.gob.mx.

Dudas sobre cuestiones éticas del proyecto:

- A la Maestra Garbiñe Saruwatari (Presidenta del Comité de Ética INMEGEN) al teléfono (55) 5350-1900 ext. 1157; email: gsaruwatari@inmegen.gob.mx.

Dudas sobre su salud, su tratamiento para la diabetes o sobre algún evento adverso:

A la Dra. Ligia Vera Gamboa (Investigadora del Centro de Investigaciones Regionales (CIR) “Dr. Hideyo Noguchi” Universidad Autónoma de Yucatán UADY) al teléfono +52 (999) 958 0215, o bien al celular (999) 958 0215.

Testigo 1

Nombre y firma _____

Fecha_____

Relación con el participante_____

Domicilio_____

Testigo 2

Nombre y firma _____

Fecha_____

Relación con el participante_____

Domicilio_____

Traductor (en caso de haberse requerido)

Nombre y firma _____

Fecha_____

Domicilio_____

Nombre y firma de quien aplicó el consentimiento informado:

Fecha_____

Protocolo de extracción de ADN de muestras fecales

Se colectaron muestras de heces fecales de acuerdo a un instructivo que se anexo en paquetes con los frascos para colectar las muestras.

Las muestras se colectaron por duplicado una muestra se guardó en un frasco para muestras fecales estéril y otro se guardó en un tubo que contenía RNA later.

Después de la colecta las muestras se guardaron en el congelador a -70°C.

Procedimiento para cortar muestras fecales

MATERIAL:

ALICATAS
INSTRUMENTO DE CORTE
PINZAS
GASAS
CLORO AL 75%
ETANOL
BALANZA ANALITICA
TUBOS DE 2ml CON TAPA

Este procedimiento se recomienda hacerlo en una campana de extracción de ADN. Previamente esterilizada con lámpara UV al igual que el material que se ocupa en este procedimiento.

1. Se toma el frasco y se abre cuidadosamente
2. Si la muestra es muy grande se mete la alicata y se corta la muestra
3. Se pesa aproximadamente entre 180-220 mg de muestra fecal en un tubo eppendorf de 2 ml estéril.

Nota: Cuando utilice muestras de heces congeladas, asegúrese de que las muestras no se descongelan hasta agregar el **Buffer ASL** en el paso 2 para lisar la muestra; de lo contrario el ADN en la muestra puede degradarse. Después de la adición del **Buffer ASL**, todas las siguientes etapas se pueden realizar a temperatura ambiente (15-25 ° C).

EXTRACCIÓN DE ADN

Después de cortar y pesar la muestra fecal se procede a:

1. Agregar 1.4 ml de **Buffer ASL** a cada muestra de materia fecal. Vortexear continuamente durante 1 minuto o hasta que la muestra de materia fecal este completamente homogeneizada.
2. Incubar la suspensión durante 5 minutos a 70°C. (En este punto es recomendable hacerlo a 95°C para las células que son difíciles de lisar).
3. Vortexear cuidadosamente durante 15 segundos, centrifugar la suspensión a toda velocidad durante 1 minuto para sedimentar partículas de heces.
4. Pipetear 1.2 ml del sobrenadante a un nuevo tubo de 2 ml y desechar el sedimento. **Nota:** Transferencia de pequeñas cantidades de material sedimentado no afectará el procedimiento.
5. Añadir 1 **Tableta de Inhibitex** a cada muestra y agitar inmediatamente durante 1 minuto o hasta que la tableta está completamente suspendida. Incubar la suspensión durante 1 minuto a temperatura ambiente para permitir que los inhibidores se absorban a la matriz Inhibitex.
6. Centrifugar a máxima velocidad durante 3 minutos para sedimentar inhibidores unidos a la matriz Inhibitex.
7. Pipetear todo el sobrenadante a un nuevo tubo de 1.5 ml y desechar el sedimento. Centrifugar la muestra a toda velocidad durante 3 minutos. Transferencia de pequeñas cantidades de material sedimentado no afectará el procedimiento.
8. Pipetear 15 µl de proteinasa K en un tubo nuevo de 1.5 ml.
9. Pipetear 200 µl de sobrenadante del paso 8 en el tubo de 1.5 ml que contiene la proteinasa K.
10. Añadir 200 µl de **Buffer AL** y agitar durante 15 segundos.
Nota: No agregue proteinasa K directamente al Buffer AL. Es esencial que la muestra y Buffer AL se mezclen a fondo para formar una solución homogénea.
11. Vortexear ligeramente la mezcla e incubar a 70°C durante 30 minutos.

12. Trascurrido el tiempo vortexear cuidadosamente y centrifugar brevemente para eliminar gotas del interior de la tapa del tubo (opcional).
13. Añadir 200 µl de etanol (96-100%) al lisado y mezclar mediante agitación.
14. Transferir el lisado a una columna QIAamp en un tubo de recolección de 2 ml sin humedecer el borde. Cerrar el tapón y centrifugar a toda velocidad durante 1 minuto. Coloque la columna en un nuevo tubo de recolección de 2 ml, y desechar el tubo que contiene el filtrado.
15. Abrir con cuidado la columna QIAamp y añadir 500 µl **Buffer AW1**. Centrifugar a toda velocidad durante 1 minuto. Colocar la columna en un nuevo tubo de recolección de 2 ml, y desechar el tubo que contiene el filtrado.
16. Abrir con cuidado la columna QIAamp y añadir 500 µl **Buffer AW2**. Centrifugar a toda velocidad durante 3 minutos. Coloque la columna en un nuevo tubo de recolección de 2ml y desechar el tubo que contiene el filtrado. Recomendación: Coloque la columna en un nuevo tubo de recogida de 2ml y desechar el tubo de recolección con el filtrado. Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto.
17. Transferir la columna QIAamp en un nuevo tubo de 1.5 ml marcado. Abrir con cuidado la columna QIAamp y agregar 200 µl **Buffer AE** directamente sobre la membrana QIAamp. Se incuba durante 1 minuto a temperatura ambiente. Centrifugar a toda velocidad durante 1 minuto para eluir el ADN.
18. Se cuantifica en Nanodrop y se refrigera a 4°C.

ANEXO 3

Protocolo de preparación de muestras de ADN microbiano para secuenciación

1. Se prepara un PCR punto final para amplificar las regiones de interés

A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
A13	A14	A15	A16	A17	A18	A19	A20	A21	A22	A23	A24
B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
B13	B14	B15	B16	B17	B18	B19	B20	B21	B22	B23	B24
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
C13	C14	C15	C16	C17	C18	C19	C20	C21	C22	C23	C24
D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
D13	D14	D15	D16	D17	D18	D19	D20	D21	D22	+	-

2. Para preparar el PCR se hace una reacción de 25.5µl

Reacción de PCR 1X	
Master Mix	22.5 µL
Primer FV	0.5 µL
Primer RV	0.5 µL
ADN	2 µL
Total	25.5 µL

3. Se mete en un termociclador con las siguientes condiciones

Microbiota		
94°C	3min	35 ciclos
94°C	30seg	
50°C	30min	
68°C	1:30min	
68°C	5min	
4	∞	

4. Se prepara un gel de agarosa al 2X para observar que los amplicones se encuentran en el tamaño que deberían.
5. La muestras se purifican con perlas magnéticas (Agencourt AMPure XP)

6. Se hace una cuantificación en Qiubit para tener una concentración exacta de la muestra
7. Después de conocer la concentración de las muestras, se prepara un pool con todas las muestras que tengan el mismo oligo.
8. Se hace una segunda amplificación

Reacción de PCR	
Master Mix	45 µL
Primer FV	1 µL
Primer RV	1 µL
ADN	4 µL
Total	51 µL

Reacción de PCR	
Master Mix	45 µL
Primer FV	1 µL
Primer RV	1 µL
ADN	2 µL
Agua	2 µL
Total	51 µL

NOTA: En esta amplificación si la concentración del pool es de 25ng/µl se agregan 4 µl de ADN a la reacción de PCR

Si la concentración es del doble se agregan 2 µl de DNA a la reacción de PCR

Condiciones para termociclador

Microbiota		
94°C	3min	15 ciclos
94°C	30seg	
50°C	30min	
68°C	1:30min	
68°C	5min	
4	∞	

9. Se hace un gel de agarosa al 2X para ver que el amplicon cambio de tamaño en este gel se agrega un pool como control para observar el cambio

10. Se purifica los amplicones con (Agencourt AMPure XP), primero se hace una purificación estándar y luego una purificación selectiva
11. Se cuantifica por Qubit
12. Se prepara un pool con todas las muestras
13. Se hace una concentración del pool
14. Se corre un bioanalizador para verificar que la librería este en el tamaño indicado
15. Se envía a la unidad de secuenciación

ANEXO 4

Protocolo de purificación con las perlas Magneticas Ampure XP

1. Se recomienda sacar las perlas del refrigerador antes de trabajar con ellas para que se aclimaten
2. Se agrega la cantidad de perlas de acuerdo al volumen de reacción a purificar

PCR Reaction Volume (μL)	AMPure XP Volume (μL)
10	18
20	36
50	90
100	180

3. Mezclar con la pipeta 10 veces
4. Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos
5. Colocar en el rack magnético por 2 minutos
6. Quitar sobrenadante y desecharlo
7. Preparar etanol al 70% para posteriores lavados
8. Agregar etanol al 70% e incubar 30 segundos. Este paso se realiza SIN quitar el tubo del rack magnético
9. Quitar todo el sobrenadante y desecharlo
10. Repetir el paso 8
11. Quitar el sobrenadante y desecharlo. En este paso asegurarse de no dejar gotas en el tubo para que se pueda secar rápido
12. Destapar el tubo en el rack y dejar secar por 5 minutos
13. Agregar agua y quitar el tubo del rack (no quitar el tubo del rack antes de agregar el agua) y mezclar con la pipeta hasta quitar de la pared las perlas
14. Dejar incubar 1 minuto a temperatura ambiente
15. Colocar el tubo en el rack magnético por 1 minuto
16. Quitar sobrenadante y guardarlo en otro tubo con la etiqueta de la muestra
17. Cuantificar por nanodrop
18. Guardar el DNA en el refrigerador a 4°C o congelar a -20°C

ANEXO 5

Diseño de primers

OLIGOS HPLC		
REV_BC27_ILLUM	CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT AAA GGA ATG TGA CTG GAG TTC AGA CGT GTG CTC TTC CGA TCT	AGGAAT
REV_BC25_ILLUM	CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT AAA TCA GTG TGA CTG GAG TTC AGA CGT GTG CTC TTC CGA TCT	ATCAGT
REV_BC23_ILLUM	CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT AAC CAC TCG TGA CTG GAG TTC AGA CGT GTG CTC TTC CGA TCT	CCACTC
REV_BC22_ILLUM	CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT AAC GTA CGG TGA CTG GAG TTC AGA CGT GTG CTC TTC CGA TCT	CGTACG

OLIGOS DESALADOS		
REV_BC1_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TCG TGA TGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	CGTGAT
REV_BC2_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TAC ATC GGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	ACATCG
REV_BC3_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TGC CTA AGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	GCCTAA
REV_BC4_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TTG GTC AGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	TGGTCA
REV_BC5_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TCA CTG TGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	CACTGT
REV_BC6_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TAT TGG CGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	ATTGGC
REV_BC7_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TGA TCT GGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	GATCTG
REV_BC8_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TTC AAG TGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	TCAAGT
REV_BC9_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TCT GAT CGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	CTGATC
REV_BC10_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TAA GCT AGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	AAGCTA
REV_BC11_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TGT AGC CGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	GTAGCC
REV_BC12_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TTA CAA GGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	TACAAG
REV_BC13_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TTT GAC TGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	TTGACT
REV_BC14_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TGG AAC TGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	GGAACT
REV_BC15_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TTG ACA TGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	TGACAT
REV_BC16_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TGG ACG GGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	GGACGG
REV_BC18_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TGC GGA CGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	GCGGAC
REV_BC19_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TTT TCA CGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	TTTCAC
REV_BC20_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TGG CCA CGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	GGCCAC
REV_BC21_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TCG AAA CGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	CGAAAC
REV_BC22_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TCG TAC GGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	CGTACG
REV_BC23_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TCC ACT CGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	CCACTC
REV_BC25_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TAT CAG TGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	ATCAGT
REV_BC27_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TAG GAA TGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	AGGAAT

ANEXO 6

Abundancia Relativa de Géneros Bacterianos Encontrados Antes y Después del Tratamiento con Metformina (4 meses) en 34 pacientes con DT2 Sin Tratamiento Previo

OTU	X Antes	X Despues	P	FDR_P	Bonferroni_P
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Erysipelotrichi;o_Erysipelotrichales;f_Erysipelotrichaceae;g_RFN20	0.0014592	9.47E-06	0.0373191	0.9951068	1
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Ruminococcaceae;g_Oscillospira	0.0027616	0.00183052	0.0399292	0.9951068	1
k_Bacteria;p_Synergistetes;c_Synergistia;o_Synergistales;f_Dethiosulfovibrionaceae;g_Pyramidobacter	2.31E-05	0.00107266	0.0649102	0.9951068	1
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Peptostreptococcaceae;g_	0.0002208	0.00025226	0.0690861	0.9951068	1
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Lachnospiraceae;g_Dorea	0.0028431	0.00314043	0.0940819	0.9951068	1
k_Bacteria;p_Tenericutes;c_RF3;o_ML615J-28;f_ ;g_	0.0001029	0.00018682	0.1184037	0.9951068	1
k_Bacteria;p_Cyanobacteria;c_4C0d-2;o_YS2;f_ ;g_	0.003027	0.00063861	0.1196245	0.9951068	1
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Bacilli;o_Lactobacillales;f_Lactobacillaceae;g_Lactobacillus	0.0003365	0.00188284	0.1426446	0.9951068	1
k_Bacteria;p_Tenericutes;c_Mollicutes;o_Anaeroplasmatales;f_Anaeroplasmataceae;g_	0.00041	4.56E-06	0.1927777	0.9951068	1
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Veillonellaceae;g_Anaerovibrio	0.0012872	0.0003097	0.2007263	0.9951068	1
k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Coriobacteriia;o_Coriobacteriales;f_Coriobacteriaceae;g_Collinsella	0.002605	0.00523828	0.2086743	0.9951068	1
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Veillonellaceae;g_Mitsuokella	0.0024155	0.002326	0.2086743	0.9951068	1
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Clostridiaceae;g_Clostridium	0.0059749	0.00746261	0.2176921	0.9951068	1
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Lachnospiraceae;g_Lachnobacterium	0.0016501	0.00475814	0.2414539	0.9951068	1
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Lachnospiraceae;g_Blautia	0.0122534	0.01230677	0.2464175	0.9951068	1
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Clostridiaceae;g_	0.002236	0.00170768	0.2514522	0.9951068	1
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Lachnospiraceae;g_	0.0400326	0.05347997	0.2723062	0.9951068	1
k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Coriobacteriia;o_Coriobacteriales;f_Coriobacteriaceae;g_Slackia	0.0001643	0.00023485	0.3024407	0.9951068	1
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_ ;g_	0.0417641	0.06021975	0.311582	0.9951068	1
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Christensenellaceae;g_	0.0029113	0.00183531	0.3202999	0.9951068	1
k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Bacteroidia;o_Bacteroidales;f_S24-7;g_	0.0052556	0.0068694	0.3234578	0.9951068	1
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Lachnospiraceae;g_Coproccoccus	0.0020112	0.00329336	0.3234578	0.9951068	1
k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Bacteroidia;o_Bacteroidales;f_[Odoribacteraceae];g_Butyricimonas	0.0012463	0.0012679	0.3294126	0.9951068	1
k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Coriobacteriia;o_Coriobacteriales;f_Coriobacteriaceae;g_	0.0010702	0.00061368	0.3415593	0.9951068	1
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Lachnospiraceae;g_Roseburia	0.0192436	0.02068439	0.3544204	0.9951068	1
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Clostridiaceae;g_Sarcina	0.0001121	0.00013365	0.3769081	0.9951068	1
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Veillonellaceae;g_Dialister	0.0285893	0.0668578	0.3871916	0.9951068	1
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Lachnospiraceae;g_Anaerostipes	0.0001397	0.00020048	0.3981948	0.9951068	1

OTU	X Antes	X Despues	P	FDR_P	Bonferroni_P
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales:f_Veillonellaceae:g__	0.0024626	0.007495603	0.407713	0.9951068	1
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Deltaproteobacteria;o_Desulfovibrionales:f_Desulfovibrionaceae:g__	0.000141	0.000171392	0.4105731	0.9951068	1
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Aeromonadales:f_Succinivibrionaceae:g_Succinivibrio	0.0728232	0.040754691	0.4217472	0.9951068	1
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Enterobacteriales:f_Enterobacteriaceae:g_Klebsiella	0.0061717	0.00389295	0.4217472	0.9951068	1
k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Bacteroidia;o_Bacteroidales:f_[Paraprevotellaceae];g_Paraprevotella	0.0066326	0.009236572	0.4360606	0.9951068	1
k_Bacteria;p_Lentisphaerae;c_[Lentisphaeria];o_Victivallales:f_Victivallaceae:g__	0.0005346	0.000458371	0.4638791	0.9951068	1
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales:f_Veillonellaceae:g_Megamonas	0.004925	0.0043435	0.4882657	0.9951068	1
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Erysipelotrichi;o_Erysipelotrichales:f_Erysipelotrichaceae:g_[Eubacterium]	0.0044365	0.010856487	0.4882906	0.9951068	1
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Bacilli;o_Lactobacillales:f_Leuconostocaceae:g__	0.000234	0.000116875	0.5021153	0.9951068	1
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Aeromonadales:f_Succinivibrionaceae:g_Anaerobiospirilli	0.0004325	0.001383391	0.5223168	0.9951068	1
k_Bacteria;p_Fusobacteria;c_Fusobacteriia;o_Fusobacteriales:f_Fusobacteriaceae:g_Fusobacterium	0.010496	0.009093431	0.5275986	0.9951068	1
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Bacilli;o_Turicibacterales:f_Turicibacteraceae:g_Turicibacter	3.70E-05	0.000676112	0.5394171	0.9951068	1
k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Bacteroidia;o_Bacteroidales:f__;g__	0.002372	0.00229729	0.5432927	0.9951068	1
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Pasteurellales:f_Pasteurellaceae:g__	0.0014852	0.008269777	0.5518862	0.9951068	1
k_Bacteria;p_Tenericutes;c_Mollicutes;o_RF39:f__;g__	0.0024223	0.000957779	0.5519089	0.9951068	1
k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Actinobacteria;o_Bifidobacteriales:f_Bifidobacteriaceae:g_Bifidobacterium	0.0019104	0.003519971	0.5684415	0.9951068	1
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales:f_Veillonellaceae:g_Megasphaera	0.0096259	0.019831804	0.5851916	0.9951068	1
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Erysipelotrichi;o_Erysipelotrichales:f_Erysipelotrichaceae:g_Catenibacterium	0.0083991	0.013885173	0.5851916	0.9951068	1
k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Bacteroidia;o_Bacteroidales:f_[Paraprevotellaceae];g__	0.0002953	0.00038121	0.6139611	0.9951068	1
k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Bacteroidia;o_Bacteroidales:f_[Odoribacteraceae];g_Odoribacter	0.0014641	0.010484317	0.6193284	0.9951068	1
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Enterobacteriales:f_Enterobacteriaceae:g_Trabulsiella	0.0003641	0.000184938	0.6265049	0.9951068	1
k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Bacteroidia;o_Bacteroidales:f_Prevotellaceae:g_Prevotella	0.3121137	0.255284729	0.6280386	0.9951068	1
k_Bacteria;p_Elusimicrobia;c_Elusimicrobia;o_Elusimicrobiales:f_Elusimicrobiaceae:g__	4.75E-05	0.000382156	0.6300031	0.9951068	1
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales:f_[Mogibacteriaceae];g__	0.0001968	0.000276491	0.6437685	0.9951068	1
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Erysipelotrichi;o_Erysipelotrichales:f_Erysipelotrichaceae:g__	0.0015244	0.001769833	0.654375	0.9951068	1
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Bacilli;o_Lactobacillales:f_Leuconostocaceae:g_Weissella	0.0006207	0.000264658	0.6562507	0.9951068	1
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Deltaproteobacteria;o_Desulfovibrionales:f_Desulfovibrionaceae:g_Bilophila	0.001016	0.00120009	0.6632403	0.9951068	1
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Bacilli;o_Lactobacillales:f_Streptococcaceae:g_Streptococcus	0.0082256	0.007718032	0.7174762	0.9951068	1

OTU	X Antes	X Despues	P	FDR_P	Bonferroni_P
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Lachnospiraceae;g_[Ruminococcus]	0.0011552	0.00308915	0.722061909	0.995106783	1
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Ruminococcaceae;g_	0.0682988	0.06079114	0.726662718	0.995106783	1
k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Bacteroidia;o_Bacteroidales;f_Porphyromonadaceae;g_Parabacteroides	0.0060187	0.00480713	0.735888703	0.995106783	1
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Burkholderiales;f_Alcaligenaceae;g_Sutterella	0.0144638	0.01449642	0.745152936	0.995106783	1
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Clostridiaceae;g_SMB53	0.0063881	0.00144664	0.763714583	0.995106783	1
k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Bacteroidia;o_Bacteroidales;f_[Paraprevotellaceae];g_[Prevotella]	0.0272073	0.02250228	0.782567299	0.995106783	1
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Ruminococcaceae;g_Faecalibacterium	0.0239402	0.03406614	0.830042398	0.995106783	1
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Aeromonadales;f_Succinivibrionaceae;g_	1.23E-05	1.09E-05	0.832667379	0.995106783	1
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Lachnospiraceae;g_Butyrvibrio	0.0002789	0.00022096	0.839673228	0.995106783	1
k_Bacteria;p_Verrucomicrobia;c_Verrucomicrobiae;o_Verrucomicrobiales;f_Verrucomicrobiaceae;g_Akkermansia	0.0003706	0.00067763	0.842428461	0.995106783	1
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Deltaproteobacteria;o_Desulfovibrionales;f_Desulfovibrionaceae;g_Desulfovibrio	0.0022831	0.00337797	0.849218167	0.995106783	1
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Ruminococcaceae;g_Ruminococcus	0.0307126	0.0212371	0.858840363	0.995106783	1
k_Archaea;p_Euryarchaeota;c_Methanobacteria;o_Methanobacteriales;f_Methanobacteriaceae;g_Methanobrevibacter	0.0002648	7.42E-05	0.864849026	0.995106783	1
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Erysipelotrichi;o_Erysipelotrichales;f_Erysipelotrichaceae;g_Holdemania	1.00E-04	0.00011116	0.875741797	0.995106783	1
k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Bacteroidia;o_Bacteroidales;f_Bacteroidaceae;g_Bacteroides	0.1256355	0.10778494	0.878146385	0.995106783	1
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Enterobacteriales;f_Enterobacteriaceae;g_	0.0234011	0.01955495	0.887827387	0.995106783	1
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Veillonellaceae;g_Acidaminococcus	0.0045939	0.00734053	0.892673245	0.995106783	1
k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Bacteroidia;o_Bacteroidales;f_[Paraprevotellaceae];g_CF231	0.0007747	0.00100587	0.901955366	0.995106783	1
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Veillonellaceae;g_Phascolarctobacterium	0.0034162	0.0037111	0.916965237	0.995106783	1
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Erysipelotrichi;o_Erysipelotrichales;f_Erysipelotrichaceae;g_Bulleidia	0.0002689	0.00035197	0.925250806	0.995106783	1
k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Bacteroidia;o_Bacteroidales;f_Rikenellaceae;g_	0.0033148	0.00443972	0.94621507	0.995106783	1
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_RF32;f_g_	0.0009474	0.00023534	0.956160631	0.995106783	1
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Enterobacteriales;f_Enterobacteriaceae;g_Erwinia	0.0002854	0.00013753	0.975051109	0.995106783	1
k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Bacteroidia;o_Bacteroidales;f_[Barnesiellaceae];g_	0.000956	0.00083958	0.975529422	0.995106783	1
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Veillonellaceae;g_Veillonella	0.0011224	0.00172914	0.980413267	0.995106783	1
k_Bacteria;p_Spirochaetes;c_Spirochaetes;o_Spirochaetales;f_Spirochaetaceae;g_Treponema	0.0004312	0.00041602	0.992636124	0.995106783	1
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Lachnospiraceae;g_Lachnospira	0.0098018	0.01153896	0.995106783	0.995106783	1

ANEXO 7

Parametros bioquímicos y antropométricos antes y 4 meses después del tratamiento con metformina de todos los pacientes

Clave	HbA1c_0	HbA1c_2	Glucosa_0	Glucosa_2	Colesterol_0	Colesterol_2	HDL_0	HDL_2	LDL_0	LDL_2	Triglicéridos_0	Triglicéridos_2	Peso_0	Peso_2	IMC_0	IMC_2	Cintura_0	Cintura_2	Cadera_0	Cadera_2	Edad	Sexo	Talla_1
AHC	7.5	7.0	132.6	130.7	177.0	169.8	28.6	31.54	104.44	102.4	333.5	264.91	75.1	76	28.3	28.3	95	94	101	100	86	Femenino	1.64
AMA	11.6	5.3	162.9	117.5	147.1	103.9	56.41	44.03	74.06	48.14	132.49	87.73	63.6	66.6	31.7	31.7	94	93	100	100	57	Femenino	1.45
ARRG	7.1	6.6	88.5	123.3	179.5	179.8	28.4	39.69	118.9	118.17	161.4	170.47	83.1	82.4	32.5	32.2	105	103	102	96	58	Femenino	1.6
ACM	11.5	10.0	271.1	200.3	202.6	175.0	44.36	41.39	142.6	103.55	193.9	254.35	89.3	88.3	40.8	40.3	117	117.5	138	132.5	88	Femenino	1.48
ABOM	7.1	6.3	114.0	122.3	248.7	174.6	36.8	29.69	151.3	104.4	303.1	271	80	80.5	35.6	35.8	105	100	114	111	47	Femenino	1.5
EBUM	7.4	6.3	122.9	128.6	232.5	233.5	41.7	41.7	150.3	153.18	524.4	281.57	57.2	57	26.8	26.7	81	81	98	98	53	Femenino	1.46
ENL	7.3	6.1	133.4	116.3	212.6	208.1	32	46.1	71.5	138.31	545.9	155.3	60.6	55.1	29.2	26.6	87	78	98	90	33	Femenino	1.44
EMSN	6.8	6.1	115.6	108.4	183.5	183.5	49.2	65.24	104	101.47	151.5	127.27	65.8	64	32.6	31.7	116.5	116	110.5	110	62	Femenino	1.42
EMBC	7.1	6.0	95.7	96.7	222.5	167.4	66	45.78	120	99.55	181.8	160.2	63.3	60	30.1	28.5	78	83	102	104	42	Femenino	1.45
EBS	9.5	7.8	212.7	170.9	213.0	195.9	63.3	62.52	129.7	112.28	166.12	167.71	73.4	73.4	36.9	36.9	105	105	109	109	59	Femenino	1.41
FATR	7.1	5.7	107.0	113.7	213.3	195.8	37.7	46.16	155	128.56	103.4	131.99	121.7	112	38.4	35.3	136	116	129	126	52	Masculino	1.78
FTFM	7.0	8.1	133.6	173.6	243.7	262.2	47.94	47.65	160.86	149.03	326.91	431.23	84.7	79.1	31.1	29.1	98	98	102	102	57	Masculino	1.65
FOVM	11.0	8.7	226.7	173.0	163.7	160.0	41.02	41.08	57.04	86.9	228.22	228.52	82.6	92.2	30.0	33.8	115	111	108	104	53	Masculino	1.68
GEIL	9.6	7.9	194.7	188.9	181.2	200.0	34.2	39.9	107.4	125.3	197	174.1	68	65.6	31.9	30.8	98.5	96	107.5	107	38	Femenino	1.46
GLRU	8.9	7.4	191.5	145.1	287.5	210.5	42.5	35.8	204.9	135.57	200.6	255.96	73.6	72.5	30.2	29.8	93.5	93	108	106	55	Femenino	1.56
JAPD	9.1	7.8	189.9	169.8	224.5	204.8	28.4	44.03	142.5	135.82	268.1	238	65.6	68.9	26.0	26.9	89	89	95	95	43	Masculino	1.6
JIPM	12.6	6.3	236.6	85.5	336.9	195.6	35.1	42.77	139.3	121.13	941.2	241.03	98.6	104.8	36.2	38.5	116	113	112	117	34	Masculino	1.65
JCKB	9.9	6.2	291.0	101.1	218.0	175.7	40.6	43.4	147.4	117.43	150.1	98.79	129.9	123.2	44.6	42.6	132	129	119	115	37	Masculino	1.7
JIPM	12.8	6.5	311.1	139.0	198.8	201.0	24.3	24.28	107.2	102	688.1	612	72	77.8	26.8	28.9	88.5	93	92	96	40	Masculino	1.64
JRVR	6.8	6.7	130.7	132.7	303.3	302.7	41.68	39.17	223.03	208.23	314.7	394.12	92.2	90.6	31.2	30.6	112	108	107	107	52	Masculino	1.72
KCCC	8.8	9.3	207.3	176.0	151.3	134.9	34.94	33.87	98.77	86.13	117.68	121.7	68.1	68.8	31.3	31.7	98	92	105.5	105	38	Femenino	1.485
LEUH	7.9	6.7	135.8	114.4	227.8	176.6	29.4	46.39	143.1	97.35	276.9	258.67	68.3	68.4	35.4	35.9	103.5	103	112	112	64	Femenino	1.39
LAPB	6.9	6.6	157.8	130.9	206.3	190.4	32.6	37.4	115.2	106.1	292.6	337.8	88.4	81.1	37.3	34.2	105	105	113	113	32	Femenino	1.54
LLPP	7.5	6.0	117.2	96.8	249.1	210.0	49.96	57.27	156.42	137.42	213.52	126.51	55	51.3	24.1	22.5	83	86	97.5	94	48	Femenino	1.51
LAGE	7.1	5.9	153.3	108.1	236.1	173.6	47.8	52.38	176	111.07	89.6	101.78	110	100.5	37.6	34.4	119	106	115	114	34	Masculino	1.71
MARC	6.9	6.1	103.3	103.0	139.2	149.4	47.3	51.61	70.1	82.8	109.4	107.07	71	68	33.3	31.9	108	102.5	106	107	66	Femenino	1.46
MJPG	7.7	7.3	160.0	153.0	399.7	359.8	48.3	54.4	170.9	140.9	536.2	1365.72	64.5	64.2	23.6	23.5	90	94	95	105	44	Masculino	1.653
MCTP	6.7	6.3	92.5	106.0	184.3	191.4	49.4	56.4	109.9	108.94	125.1	172.09	75.2	77.3	32.1	33.0	108	102	114.5	111	49	Femenino	1.53
MFCPC	6.9	6.5	119.2	120.4	281.6	274.0	67.48	66.77	158.54	159.23	277.91	350.26	52.7	49.4	28.1	26.3	94	81	90	94	64	Femenino	1.37
MIGUC	10.0	12.1	91.4	345.2	250.0	218.0	28.4	52.5	118.9	145.33	164.3	198.37	62.6	60.8	27.1	26.3	105	91	102	105	56	Femenino	1.52
MIMC	10.1	10.0	312.4	284.0	187.9	148.3	30	29.78	115.8	100.06	210.52	142.96	59.5	59.6	25.8	25.8	88	88	100	100	46	Femenino	1.52
MJLP	13.0	7.0	198.0	129.1	169.1	180.2	50.03	79.88	84.74	91.77	444	99.94	68.8	71.4	35.1	36.4	102	120	120	120	64	Femenino	1.4
MRPC	7.0	6.5	126.0	127.6	118.1	151.3	39	44.13	60.3	85.72	94.2	131.63	69.3	71.9	35.4	36.7	106.5	106	110	111	51	Femenino	1.4
MILPP	7.4	7.5	119.6	161.2	205.7	158.8	43.2	47.7	127.3	96.3	176.1	111.3	55.5	53.9	27.5	26.7	92.8	92	95.8	95	61	Femenino	1.42
MKS	7.4	7.5	119.6	161.2	205.7	158.8	43.2	47.7	127.3	96.3	176.1	111.3	55.1	53.9	29.0	27.9	92.5	92	89.9	95	60	Femenino	1.39
MPTK	10.7	8.7	223.0	175.6	133.2	127.6	54.68	56.8	51.96	55.7	132.81	108.5	52.4	58.1	26.7	29.6	97.5	94	92.5	96	60	Femenino	1.4
NJMA	8.4	10.6	177.2	216.4	491.0	588.1	43.1	40.95	88.3	34.11	263.7	292.87	84.4	84.4	33.0	33.0	103	103	106	106	47	Masculino	1.6
RMTD	6.7	7.7	239.9	294.2	180.6	179.6	48.72	41.37	61.29	99.11	354.71	328.55	76.2	72	33.6	32	101	100	106	106	36	Femenino	1.5
VMVO	10.4	9.4	237.0	190.0	164.2	163.4	41.7	36.24	82.23	89.31	201.11	294.7	43.8	57.3	27.1	27.6	84	85	92	92	58	Femenino	1.44
MRCO	12.9	6.3	289.0	103.5	196.0	148.9	53	40.44	124.6	92.05	105	118.76	57.7	55.6	29.0	33.0	88	88	95	92	58	Femenino	1.41
TJRL	10.3	7.1	126.8	140.5	286.4	250.0	55.6	64.72	175	158.74	274.07	112.59	82	81.9	33.7	33.7	109.5	106	127.5	117	49	Femenino	1.56