

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

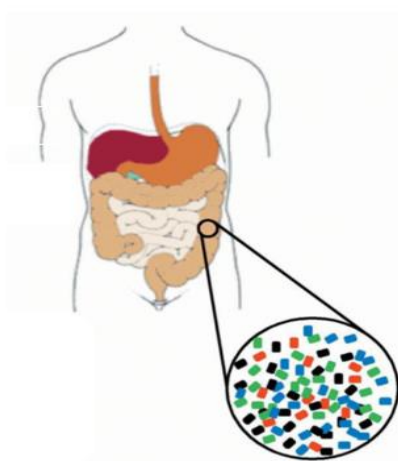


Facultad de Medicina

**Programa de Doctorado en Biomedicina. Investigación Traslacional y
Nuevas Tecnologías en Salud**

**CAMBIOS EN LA MICROBIOTA INTESTINAL EN PACIENTES
CON DIABETES TIPO 2 E INTOLERANCIA A METFORMINA
TRAS REINTRODUCCIÓN DE LA MISMA.**

Tesis doctoral




**Cristina María Díaz Perdigones
Málaga, 2022**

**Directores:
Francisco José Tinahones Madueño
Araceli Muñoz Garach**



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Cristina María Díaz Perdigones

 <https://orcid.org/0000-0002-0808-2616>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es





DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

D./Dña CRISTINA MARÍA DÍAZ PERDIGONES

Estudiante del programa de doctorado PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA, INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL Y NUEVAS TECNOLOGÍA EN SALUD de la Universidad de Málaga, autor/a de la tesis, presentada para la obtención del título de doctor por la Universidad de Málaga, titulada: CAMBIOS EN LA MICROBIOTA INTESTINAL EN PACIENTES CON DIABETES TIPO 2 E INTOLERANCIA A METFORMINA TRAS REINTRODUCCIÓN DE LA MISMA

Realizada bajo la tutorización de FRANCISCO JOSÉ TINAHONES MADUEÑO y dirección de ARACELI MUÑOZ GARACH Y FRANCISCO JOSÉ TINAHONES MADUEÑO (si tuviera varios directores deberá hacer constar el nombre de todos)

DECLARO QUE:

La tesis presentada es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, conforme al ordenamiento jurídico vigente (Real Decreto Legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo.

Igualmente asumo, ante a la Universidad de Málaga y ante cualquier otra instancia, la responsabilidad que pudiera derivarse en caso de plagio de contenidos en la tesis presentada, conforme al ordenamiento jurídico vigente.

En Málaga, a 28 de NOVIEMBRE de 2022

Fdo.: Doctorando/a	Fdo.: Tutor/a





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Escuela de Doctorado

Fdo.:
Director/es de tesis



D. / D^a Francisco José Tinahones Madueño

Catedrático de la Facultad de Medicina de la Universidad de Málaga

D. / D^a Araceli Muñoz Garach,

Facultativo especialista de Area de Endocrinología y Nutrición del Hospital Virgen de las Nieves de Granada

CERTIFICA/N Que D/D^a.Cristina María Díaz Perdigones

ha obtenido y estudiado personalmente bajo mi dirección los datos clínicos necesarios para la realización de su Tesis Doctoral, titulada: *Cambios en la microbiota intestinal en pacientes con diabetes tipo 2 e intolerancia a metformina tras introducción de la misma* que considero tiene el contenido y rigor científico necesario para ser sometido al superior juicio de la Comisión que nombre la Universidad de Málaga para optar a grado de Doctor.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente certificado en

Málaga, 28 de Noviembre 2022

Firman todos

Directores

ABREVIATURAS

AACE / ACE: Asociación Americana de Endocrinólogos Clínicos
ADA: Asociación Americana Diabetes
ADO: Antidiabéticos orales
ADN: Ácido desoxirribonucleico
ADP: Adenilato Difosfato
AGE: Productos Finales de Glicación Avanzada
AGL: Ácidos Grasos Libres
AMP: Adenilato monofosfato
AMPc: Adenosín monofosfato cíclico
AMPK: Proteína quinasa activada por AMP
ARNm: Ácido ribonucleico mensajero
ATP: Adenosina tri-fosfato
AUC: Área bajo la curva
ASV: Amplicon secuencias variantes
BSH: Hidrolasa de las sales bilares
C β : Célula beta
CB1: Receptor cannabinoide 1
CB2: Receptor cannabinoide 2
C α : Célula alfa
C δ : Célula teta
Cmax: Concentración máxima
Cpt-1: Carnitina palmitoiltransferasa-1
CRCT2: Coactivador 2 de la transcripción regulada por proteínas
CT: Grupo control sin diabetes
CVD: Enfermedad cardiovascular
DAG: Diacilglicéridos
DM: Diabetes mellitus
DM1: Diabetes mellitus tipo 1
DM2: Diabetes mellitus tipo 2 o grupo control con diabetes mellitus tipo 2 en tratamiento con metformina
DDP4i: Inhibidores de dipeptidil peptidasa-4
eCB: Sistema endocannabinoide
EASD: Asociación europea del estudio de la diabetes
ECV: Eventos cardiovascular
eGFR: Filtración glomerular renal estimada
EMA: Agencia europea de medicamentos
ERC: Enfermedad renal crónica
Fiaf/ANGPTL4: Proteína angiopoiteína tipo 4

FDA: Federación administración de medicamentos y alimentos
FID: Federación internacional diabetes
FOS: Fructooligosacáridos
FXR: Receptor X fernesioide
FTO: Fat-mass-associated
GABA: Ácido γ -aminobutírico
GBA: Glucosa basal alterada
GI: Gastrointestinal
GLP-1: Péptido similar al glucagón tipo 1
GLP1RA: Análogo del receptor de péptido similar al glucagón tipo 1
GLUT: Transportadores de glucosa
GoDARTS: Genetics of Diabetes Audit and Research Tayside Study
Hb1Ac: Hemoglobina glicosilada
HIF: Factores inductores de hipoxia
HIF α : Factores inductores de hipoxia alfa
HMP: Proyecto del microbioma humano
H2S: Ácido sulfhídrico
IL-1: Interleucina 1
IL-1 β : Interleucina 1 beta
IL-6: Interleucina 6
IL-1Ra: Antagonista del receptor de IL-1
IMC: Índice de masa corporal
INT: Intolerantes precoces a metformina o grupo total de pacientes intolerantes a metformina
IRS: Proteínas de acoplamiento del receptor de insulina
IR: Receptor de insulina
ISRS: Inhibidores de la recaptación de serotonina
ITG: Intolerancia a la glucosa
JNK1: La cinasa aminoterminal c-Jun-1
LDA: Análisis discriminante lineal
LEfSe: Análisis discriminante lineal, efecto-tamaño
LPS: Lipopolisacárido de membrana
LKB1: Quinasa hepática B1
MALA: Acidosis láctica asociada a la metformina
MAPK: Proteína quinasas activadas por mitógenos
MATE1: Transportador apical de cationes orgánicos tipo 1
MATE2: Transportador apical de cationes orgánicos tipo 2
Metformina XR: Metformina de liberación prolongada
Metformina DR: Metformina de liberación retardada

Metformina IR: Metformina de liberación inmediata
mGDP: Glicerofosfato deshidrogenasa
MILA: Acidosis láctica inducida por metformina
NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido hidroruro
NAFLD: Enfermedad del hígado graso no alcohólico
NOTOL: Intolerantes a metformina durante la progresión de dosis de metformina
OCT: Transportadores de cationes orgánicos
OCT1: Transportador de cationes orgánicos 1
OCT2: Transportador de cationes orgánicos 2
OCT3: Transportador de cationes orgánicos 3
PCR: Polimerasa en reacción en cadena
pKa: Punto de disociación ácido
PICRUSt: Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States
PMAT: Transportadores de monoaminas plasmáticas
PPAI: Depósito de polipéptido amiloide
PPAR γ : Factor de transcripción para el receptor de peroxisoma proliferador activado gamma
PYY: Péptido tirosina tirosina
RE: Retículo endoplasmático
RI: Resistencia insulina
ROS: Especies reactivas de oxígeno
SCFA: Ácidos grasos de cadena corta
SD: Desviación estándar
SGLT-1: Transportador de sodio-glucosa tipo 1
SLC30A8: Proteína transportadora de zinc del islote
SNP: Polimorfismos de Nucleótido Único
SREBP-1: Factor de transcripción vinculante del elemento regulador del esterol-1
SERT: Transportador de recaptación de serotonina
SOG: Sobrecarga oral de glucosa
SU: Sulfonilureas
TCF7L2: Factor de transcripción 7-like-2
TGI: Tracto gastrointestinal
TGR5: Receptor 5 de ácido biliar acoplado a la proteína G
TGs: Triglicéridos
THTR2: Transportador de tiamina a nivel intestinal
TLR: Toll like receptor
TNF- α : Factor de necrosis tumoral- α
TZD: Tiazolidinedionas
UKPDS: Estudio prospectivo inglés sobre diabetes

UTO: Unidades taxonómicas organizadas

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a Francisco Tinahones Madueño por ser una fuente inagotable de ideas, por su promoción y labor incansable en el mundo de la investigación biomédica. A mi co-directora de tesis la Dra Araceli Muñoz Garach, por ser siempre una luz de guía en el camino, un ejemplo de bien hacer, tanto en lo profesional como en lo personal. Agradecerte la energía positiva que me has transmitido cuando el camino se complicaba y el desánimo podía ganar la batalla.

En tercer lugar, pero no menos importante, me gustaría incluir en los agradecimientos a Dra. Isabel Moreno Indias; sin su generosidad y sus amplios conocimientos sobre el microbioma y síndrome metabólico este trabajo no hubiese visto la luz. Gracias por tu infinita paciencia cuando te atiborraba a preguntas y dudas, has sido una buena maestra para incentivar me la curiosidad sobre este amplio universo microbiano que habita en nosotros.

A los que fueron y serán por siempre mis residentes mayores y pequeños: María, Isabel, Ana, Carmen, Miguel y Borja; gracias por lo compartido y por lo que espero seguir compartiendo, aunque nos separen unos pocos kilómetros. Mis primeros pasos en la endocrinología no hubiesen sido lo mismo sin vuestra amistad, generosidad y humildad.

A mis amigos malagueños, Gomi, Rocío y Paco, compañeros de fatigas, de viajes y aventuras. Gracias por hacer Málaga un poco más cálida y hogareña.

A todo el personal que conforma el servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Virgen de la Victoria, tanto facultativos, como enfermeros o auxiliares con los que coincidí durante la residencia y como facultativa durante un corto periodo de tiempo. Buen ambiente, buena gente y buen hacer. No se puede pedir más, orgullosa de haber sido la quinta residente de endocrinología y nutrición formada en esa gran familia.

A mis padres, María y Manuel, que aparte de darme la vida me enseñaron a vivir en la generosidad, humildad, fortaleza y perseverancia. En casa nunca disfrutasteis de excesos ni de

caprichos, sin embargo, os sacrificasteis sin pedir nada a cambio para que yo pudiese cambiar mi suerte. Espero poder devolveros, aunque sea mínimamente, todo lo que me habéis dado.

A mis amigos de Arcos de la Frontera, amigos de toda la vida y para toda la vida: Geles, Isidro, Manuel y Juan José, aunque no tengan ni idea de que va esta tesis doctoral, siempre saben estar y preguntar lo más importante.

A mi querido Miguel, mi gran compañero y maestro de vida. A ti, tendría que dedicar un libro mayor que este para agradecerte todo lo vivido. Sin duda, me has dado tu mano para que no me caiga cuando el cansancio o el desánimo podrían haberme alcanzado. Y gracias, también, por tu manera de celebrar la vida y de acompañarme, celebrando mis logros como si fueran propiamente tuyos.

Por último, quiero incluir a los agradecimientos al servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Joan XIII, mi lugar de trabajo en los últimos años, dónde me han dado oportunidad de seguir desarrollándome como médico y me han alentado a finalizar esta tesis doctoral. Con especial mención a Theo y Laia, que me demuestran cada día, su amistad y compañerismo.

“La Medicina es la más humana de las artes, la más artística de las ciencias y la más científica de las humanidades”.

Pellegrino ED

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	15
1. DIABETES MELLITUS TIPO 2	16
1.1. Definición y criterios diagnósticos:	16
1.2. Epidemiología de la diabetes mellitus tipo 2	17
1.3 Factores etiológicos	19
1.4 Homeostasis normal de la glucosa	21
1.5 Fisiopatología	22
1.5.1. Disfunción de la célula beta	22
1.5.2. Resistencia insulínica en la fisiopatología de la DM2	24
1.6. Las bases del tratamiento en la diabetes mellitus tipo 2	28
2. METFORMINA	31
2.1 Historia y origen del nacimiento de la metformina	31
2.2. Farmacocinética de la metformina	32
2.2.1 Formas de presentación de la metformina	34
2.3 Farmacodinámica de la metformina	35
2.3.1. Mecanismos moleculares de acción a nivel mitocondrial	35
2.3.2 Mecanismos moleculares de acción dependientes de activación de AMPK	35
2.3.3 Mecanismos moleculares de acción AMP dependientes	36
2.3.4 Mecanismos moleculares de acción por cambios en el estado redox	37
2.3.5 Mecanismos de acción de la metformina a nivel de tejidos periféricos	38
2.4 Contraindicaciones y efectos adversos	39
2.4.1 Acidosis láctica	42
3. INTOLERANCIA GASTROINTESTINAL A METFORMINA	43
3.1. Definición y características de intolerancia a metformina	43
3.2. Mecanismos subyacentes que dan lugar a la intolerancia digestiva	45
3.3. Estrategias terapéuticas para corrección de la intolerancia digestiva	47
4. MICROBIOTA INTESTINAL	48
4.1. Definición. Evolución y desarrollo de la Microbiota Intestinal	48
4.2. Composición y análisis de la microbiota intestinal	50
4.3. Factores modificadores de la microbiota intestinal	53
4.3.1. Dieta y microbiota intestinal	54
4.3.2. Edad y Microbiota intestinal	56
4.3.3. Antibióticos	56
4.3.4. Demográficos	56
4.3.5. Otros factores	57
4.4. Funciones de la microbiota intestinal	58
4.4.1. Función metabólica y trófica de la microbiota intestinal	58
4.4.2 Función inmunitaria de la microbiota intestinal	59
4.5. Microbiota intestinal y las enfermedades metabólicas	60
4.5.1. Microbiota intestinal y obesidad	60
4.5.2 Microbiota intestinal y diabetes mellitus tipo 2	62
4.6. Metformina y su acción sobre el microbioma intestinal	67
4.6.1. Cambios en la composición de Microbiota Intestinal	67
4.6.2. Efectos metabólicos de la metformina mediados por microbiota intestinal	70
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	75
1. HIPÓTESIS	76
2. OBJETIVOS	76

2.1. Objetivo general	76
2.2. Objetivos específicos	76
DISEÑO Y METODOLOGÍA	77
1. DISEÑO DEL ESTUDIO	78
2. ÁMBITO DE TRABAJO	78
3. CRITERIOS DE INCLUSIÓN	79
4. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	79
5. TAMAÑO MUESTRAL.....	80
6. VARIABLES DEL ESTUDIO	80
6.1. Variable principal	80
6.2. Variables clínico-demográficas	80
6.3. Variables analíticas	81
6.4 Análisis bioinformático	82
6.5 Análisis estadístico	82
6.7. Plan de trabajo	83
RESULTADOS.....	84
1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA POBLACIÓN A ESTUDIO	85
1.1. Variables cualitativas	86
1.2. Variables cuantitativas	90
2. COMPARACIÓN DE VARIABLES CLÍNICAS-ANALÍTICAS ENTRE LOS INTOLERANTES A METFORMINA Y LOS GRUPOS CONTROLES: DIABETES MELLITUS TIPO 2 EN TRATAMIENTO CON METFORMINA Y CONTROLES SIN DIABETES.	94
3. DIFERENCIAS BASALES EN MICROBIOTA INTESTINAL SEGÚN TOLERANCIA A METFORMINA EN EL ESTUDIO DE INTERVENCIÓN: TOLERANTES A METFORMINA, INTOLERANCIA GASTROINTESTINAL PRECOZ A METFORMINA E INTOLERANTES A METFORMINA DURANTE LA PROGRESIÓN DE DOSIS	96
3.1 Filos.....	96
3.2 Familias	98
3.3 Géneros	102
3.4 Especies	108
4. CAMBIOS DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN EL ANÁLISIS LONGITUDINAL Y TRANSVERSAL DE LOS GRUPOS TOLERANTES A METFORMINA VERSUS INTOLERANTES A METFORMINA DURANTE LA PROGRESIÓN DE DOSIS.	111
4.1 Filos	111
4.2 Familias	113
4.3 Géneros	117
4.4 Especies	121
5. COMPARACIÓN DEL PERFIL DE MICROBIOTA ENTRE TODOS LOS INTOLERANTES A METFORMINA CONFIRMADA Y LOS DOS GRUPOS DE CONTROLES: DIABÉTICOS TIPO 2 EN TRATAMIENTO CON METFORMINA DE LARGA DATA (DM2) Y CONTROLES SIN DIABETES (CT)	129
5.1 Filos	129
5.2 Familias	132
5.3 Géneros	136
5.4 Especies	141
6. BIODIVERSIDAD.....	145
6.1. Biodiversidad beta en el análisis de las muestras fecales basales de los grupos clasificados según tolerancia a metformina: intolerantes precoces a metformina (INT), tolerantes a metformina (TOL) y no tolerantes durante la titulación de dosis (NOTOL)	146
6.2. Biodiversidad beta en el análisis longitudinal de las poblaciones tolerantes a metformina (TOL) versus intolerantes a metformina en la progresión de dosis (NOTOL).	147
6.3. Biodiversidad beta en el análisis de las muestras fecales de todos intolerantes a metformina y los dos grupos controles reclutados: diabetes mellitus tipo 2 en tratamiento con metformina y controles sin diabetes.....	150

6.4 Biodiversidad alfa de las muestras fecales basales de los grupos clasificados según tolerancia a metformina durante el estudio de intervención: intolerantes precoces a metformina (INT), tolerantes a metformina (TOL) y no tolerantes durante la progresión de dosis del tratamiento (NOTOL).....	151
6.4.1 Observed_ASV	151
6.4.2 Eveness(Indice Pileau)	152
6.4.3 Indice Shannon	153
6.4.4 Diversidad Faith.....	153
6.5 Biodiversidad alfa en el análisis longitudinal de las poblaciones tolerantes a metformina (TOL) versus intolerantes durante la progresión de dosis (NOTOL).	154
6.5.1 Observed_ASV	154
6.5.2 Eveness(Indice Pileau)	155
6.5.3 Indice Shannon.	156
6.5.4. Diversidad Faith.....	157
6.6 Biodiversidad beta en el análisis de las muestras fecales de todos intolerantes a metformina confirmada (INT), diabéticos en tratamiento con metformina(DM2) y controles sin diabetes(CT)	158
6.6.1. Observed_ASV	158
6.6.2. Eveness(Indice Pileau)	159
6.6.3. Indice Shannon(biodiversidad)	160
6.6.4. Diversidad de Faith	161
7. ANÁLISIS FUNCIONAL	162
7.1 Rutas metabólicas de MetaCyc en el análisis basal de las muestras fecales entre los grupos intolerantes precoces a metformina, intolerantes a metformina en dosis progresivas y tolerantes a metformina.	162
7.2 Rutas metabólicas por MetaCyc con diferencias significativas del análisis longitudinal y final de los grupos tolerantes a metformina e intolerantes durante la progresión de dosis.	170
7.3 Rutas metabólicas por MetaCyc con diferencias significativas entre todos los intolerantes a metformina (INT) y los ambos grupos controles: diabéticos con tratamiento con metformina (DM2) y controles sin diabetes (CT).	171
DISCUSIÓN.....	185
1. DIFERENCIAS TAXONÓMICAS Y FUNCIONALES EN MICROBIOTA INTESTINAL DE TOLERANTES E INTOLERANTES GASTROINTESTINALES A METFORMINA.	186
2. DIFERENCIAS TAXONÓMICAS Y FUNCIONALES EN MICROBIOTA INTESTINAL DE INTOLERANTES A METFORMINA VERSUS CONTROLES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2 EN TRATAMIENTO CON METFORMINA Y CONTROLES SIN DIABETES.	192
LIMITACIONES DEL ESTUDIO	202
CONCLUSIONES.....	204
ANEXO 1	206
ANEXO 2	208
APORTACIÓN CIENTÍFICA	212
BIBLIOGRAFÍA	215

INTRODUCCIÓN

1. Diabetes mellitus tipo 2

1.1. Definición y criterios diagnósticos:

La diabetes mellitus (DM) es un grupo de enfermedades asociadas con la alteración de diversas vías metabólicas y la principal característica definitoria es la hiperglucemia crónica debido a la acción insuficiente de la insulina. Su patogénesis involucra tanto factores genéticos como ambientales. La DM se asocia con una amplia gama de presentaciones clínicas; desde pacientes asintomáticos hasta cetoacidosis o coma hiperglucémico dependiendo del grado de desorden metabólico^{1 2}. La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) tiene una relación directa con la aparición de la obesidad, alteración en la acción de la insulina, disfunción secretora de la insulina y aumento de la producción de glucosa endógena³. La hiperglucemia crónica de la diabetes se asocia con daño a largo plazo, disfunción y fallo de diferentes órganos, especialmente los ojos, los riñones, los nervios, el corazón y los vasos sanguíneos⁴.

Las pruebas que se utilizan en la detección de la DM2 son niveles de Hemoglobina glicosilada (HbA1c) $\geq 6,5\%$, glucosa plasmática en ayunas ≥ 126 mg/dL o glucemia plasmática 2 horas tras una sobrecarga oral de glucosa de 75 g (SOG) ≥ 200 mg/dL.

El comité de expertos en el diagnóstico y clasificación de DM reconoció por primera vez en el año 1997 la existencia de un grupo intermedio de individuos cuyos niveles de glucosa no cumplían los criterios para diabetes pero que, sin embargo, sus niveles de glucemias eran más altos que los considerados como normales⁵. Por lo cual, se determina que existen rangos intermedios en las pruebas de detección de DM2.

Estas situaciones clínicas presentan mayor riesgo de desarrollar diabetes, se conocen como “prediabetes” y son la glucemia basal alterada (GBA) e Intolerancia a la glucosa (ITG). Se incluyen en este estadio valores de HbA1c 5,7-6,4%; glucemia en ayunas 100-125 mg/dL; glucemia a las 2h tras SOG 140-199 mg/dL. Se pueden usar las mismas pruebas para diagnosticar diabetes y que para detectar individuos con prediabetes

Las personas con prediabetes y particularmente en el contexto del síndrome metabólico se beneficiarían de la modificación de los factores de riesgo cardiovascular. Sin embargo, no se ha demostrado que tengan un mayor riesgo para la enfermedad microvascular como se ve en la diabetes. No obstante, estarán en riesgo de desarrollar diabetes y eventos cardiovasculares (ECV). La ITG parece que está más fuertemente asociada a la aparición de resultados en enfermedad cardiovascular (CVD) que la GBA^{4 6}.

HbA1c \geq 6,5%. El análisis se debe realizar en un laboratorio con un método certificado por el NGSP y unificado con el análisis del DCCT*

O

GBA \geq 126 mg/dl. El ayuno se define como ningún aporte calórico durante al menos 8 h.*

O

Glucemia plasmática a **las 2 horas \geq 200 mg/dl** durante una SOG. El análisis debe efectuarse como lo describe la Organización Mundial de la Salud, con una carga de glucosa que contiene el equivalente a 75 g. de glucosa anhidra disueltos en agua.*

O

En un paciente con síntomas clásicos de hiperglucemia o una crisis hiperglucémica, una **glucemia plasmática al azar \geq 200 mg/dl.**

**Si no hay hiperglucemia inequívoca, los resultados se deben confirmar repitiendo el análisis otro día.*

**NGSP. National Glycohemoglobin Standardization Program*

*. *DCCT. Diabetes Control and Complications Trial.*

Tabla 1. Criterios diagnósticos de diabetes mellitus⁷⁸.

La diabetes puede identificarse en cualquier parte del espectro de escenarios clínicos: individuos con bajo riesgo que se someten a pruebas de glucosa y se obtienen como dato casual, en individuos que se evalúan por ser población de riesgo o individuos sintomáticos. En ausencia de hiperglucemia sintomática con un único resultado de la prueba de laboratorio en rango de diabetes no es diagnóstico de la enfermedad. Por lo cual, se debe repetir con otra prueba de laboratorio confirmatoria en otro día diferente. Por el contrario, si presenta hiperglucemia sintomática el diagnóstico se ha realizado y no se requiere una prueba confirmatoria antes de iniciar el tratamiento⁶. En las personas en las que sea probable la diabetes mellitus tipo 1 (DM1) (hiperglucemia en edades tempranas, normo-peso o sintomáticos, especialmente si presentan clínica cardinal con cetonuria o cetonemia), las pruebas de confirmación no deben retrasar el inicio del tratamiento para evitar un deterioro rápido. Si los resultados de dos pruebas diferentes están disponibles y ambos están por encima de los puntos de corte el diagnóstico de diabetes se confirma.

1.2. Epidemiología de la diabetes mellitus tipo 2

La prevalencia estimada de diabetes mundial entre adultos era del 7,4% en 1994; sin embargo, el número de personas con DM se ha cuadruplicado en las últimas tres décadas y es la novena causa principal de muerte. Aproximadamente, 1 de cada 11 adultos en todo el mundo presenta DM, siendo la diabetes mellitus tipo 2 la más prevalente, puesto que conforma casi el 90% de los diagnósticos de DM⁵. La prevalencia de DM mundial prevista para el 2030 es de aproximadamente 578 millones de personas

entre 20 y 79 años. En el 2019 la estimación de población con diabetes ascendía hasta 463 millones. En Europa la prevalencia de DM es de 59 millones de personas y se prevé un crecimiento del 15% para el año 2045. Por otra parte, La Federación Internacional de Diabetes (FID) estima que pueden haber hasta 50% de personas con diabetes que no están diagnosticadas y tienen, por tanto, un mayor riesgo de desarrollar complicaciones⁹.

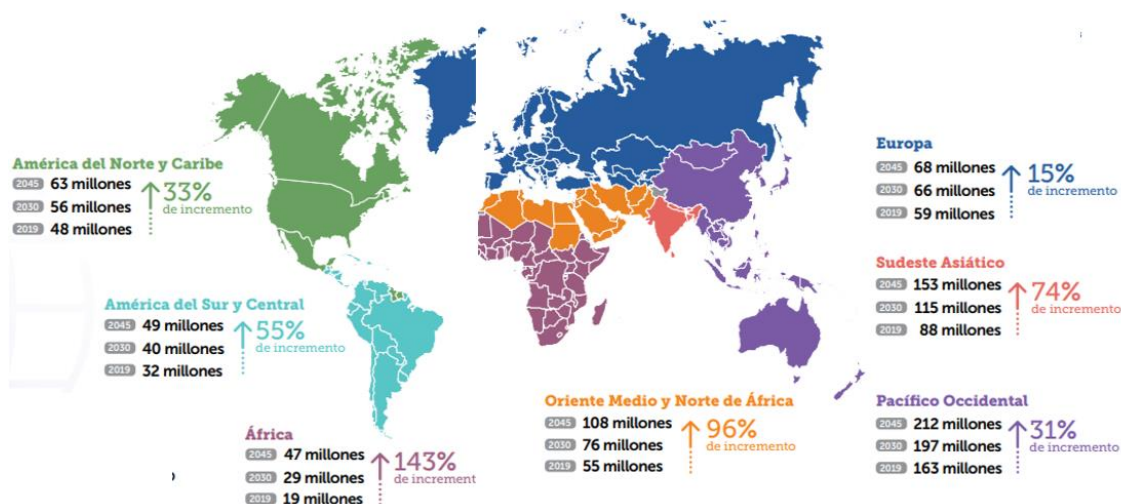


Figura 1. Prevalencia mundial de la diabetes. Adaptado del Atlas FID, 2019, 9ª edición

En España la diabetes ejerce un gran impacto en la salud pública debido a su alta prevalencia que se estima en el 6.2% entre los 30-65 años y del 10% entre los 30-89 años ¹⁰. Entre los estudios de prevalencia de diabetes realizados en nuestro país en los últimos años destaca el estudio epidemiológico Di@bet.es ¹¹ donde se determinó que el 30% de la población del estudio tenían alguna de alteración de la glucosa. Este estudio nacional basado en 5,800 encuestas entre 100 centros de salud españoles y examinó la prevalencia de diabetes, obesidad y factores de riesgos asociados; y concluyó que la prevalencia de DM2 ascendía al 13.8%. ¹¹. Las estimaciones más bajas de prevalencia de DM2 presentes en España fueron: 3,1% en Aragón, el 6,7% Cataluña, 4,6% en el País Vasco, 4% Asturias, el 7,8% en Murcia y el 8% en Valencia^{11 12}. Más recientemente, tras diez años del estudio Di@bet.es, se ha reevaluado la misma cohorte del estudio, con un total de 2408 sujetos incluidos, con el objetivo de determinar la incidencia de diabetes ajustada por de edad y sexo de la población española. Los resultados determinaron una incidencia de 3,7 casos / 1000 personas-año. Los principales factores de riesgo para desarrollar diabetes fueron la presencia de prediabetes en el estudio transversal, la edad, el sexo masculino, la obesidad y los antecedentes familiares de diabetes¹³.

La DM es uno de los principales segmentos dentro de las enfermedades crónicas no transmisibles. En 2000, suponían el 60% de las muertes y el 43% de la carga de enfermedades crónicas no

transmisibles a nivel mundial. Según lo informado por FID, aproximadamente el 75-80% de las personas con diabetes mueren debido a trastornos cardiovasculares¹⁴. La FID estima que 627.000 personas entre 20-79 años murieron por diabetes en 2015 en la región europea. Alrededor de un cuarto (26,3%) de estas muertes fueron en personas menores de 60 años, lo que refleja parcialmente la distribución por edad de la población, pero también puede estar relacionado con unas tasas mejoradas de supervivencia debidas a sistemas sanitarios más avanzados. El número de muertes causadas por diabetes es ligeramente mayor en mujeres comparado con hombres (315.000 vs. 312.000, respectivamente)⁹.

1.3 Factores etiológicos

La diabetes es una enfermedad compleja que involucra una amplia gama de factores genéticos y ambientales. Hay marcadas diferencias entre biología, cultura, estilo de vida, ambiente y estatus socioeconómico que impactan de forma diferente entre hombres y mujeres en la instauración y, la presentación clínica de la diabetes. Los efectos genéticos, los mecanismos epigenéticos, los factores nutricionales y el estilo de vida sedentario modifican el riesgo y las complicaciones de manera diferente en ambos sexos. Además, las hormonas sexuales tienen un gran impacto en el metabolismo energético, la composición corporal, la función vascular y las respuestas inflamatorias. Por lo tanto, los desequilibrios endocrinos se relacionan con rasgos cardio-metabólicos desfavorables, observables en mujeres con exceso de andrógenos o en hombres con hipogonadismo. Los factores biológicos y psicosociales son responsables tanto en diferencias de género y sexo como en el riesgo y el resultado de la diabetes. En el caso de la diabetes se atenúa el efecto protector del sexo femenino en el desarrollo de ECV o nefropatía. Actualmente, se preciaría mayor investigación sobre los mecanismos fisiopatológicos dimorfológicos del sexo de la DM2 y sus complicaciones. Todo ello podría contribuir a un cuidado de la diabetes más personalizado en el futuro y, por lo tanto, promovería una mayor conciencia en términos de factores de riesgo específicos de sexo y género^{15 16}.

Por otra parte, en los últimos años parte de la investigación en diabetes se han centrado en elucidar el amplio espectro de genes que desempeñan un papel en el mecanismo molecular del desarrollo de la diabetes¹⁷. Desde el primer estudio de asociación de genoma completo (GWAS) sobre DM2 en 2007, ha habido un progreso considerable en genética. Desde entonces se han podido describir una gran variedad de polimorfismos de un único nucleótido (SNP) implicados en las vías metabólicas que afectan a los niveles de glucosa en sangre, así que el mecanismo genético exacto que da lugar a la aparición a la diabetes sigue siendo un reto. Evidentemente, la complicación más importante es el hecho de que una sola mutación genética o polimorfismo no impondrá el mismo efecto entre individuos diferentes dentro de una población o en poblaciones diferentes. Esta variación se ve directa o indirectamente afectada por el fondo genético general a nivel individual, familiar o poblacional que se complica potencialmente por la interacción con factores modificadores del entorno que son altamente variables¹⁷. Se conocen más de 75 loci genéticos distintos, con más de 150 variantes, que pueden estar involucrados en la patogénesis de DM2, sin embargo, sólo se ha podido atribuir de un 10 a 15% de la heredabilidad de la DM2. Se conocen

11 variantes genéticas (TCF7L2, PPARG, FTO, KCNJ11, NOTCH2, WFS1, CDKAL1, IGF2BP2, SLC30A8, JAZF1 y HHEX) que se asociaron significativamente con el riesgo de DM2 independientemente de los factores de riesgos clínicos; a su vez, 8 de estas variantes de genes se asociaron con alteración de la función de la célula beta¹⁸¹⁹. De estos genes, uno de los mejores estudiados es el factor de transcripción 7-like-2 (TCF7L2), localizado en el cromosoma 10, que desempeña un papel central en la regulación de la proliferación celular y la secreción de insulina. El polimorfismo rs7903146 del gen TCF7L2 se asocia con trastornos en la secreción de insulina y una respuesta reducida al péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1), y predice el desarrollo de DM2 en diferentes grupos étnicos²⁰. La proteína transportadora de zinc del islote (SLC30A8) ha demostrado una correlación positiva con el riesgo de desarrollar DM2 donde las mutaciones variantes en este gen parecen protectoras contra la enfermedad, lo que proporciona una herramienta potencial para el tratamiento²¹. En otro trabajo realizado para el estudio de polimorfismos genéticos en población latina se encontró que los cambios en locus SLC16A11 y SLC16A13 se asociaban hasta en un 20% con la presencia de DM2²². En los últimos años se ha profundizado más en el estudio del epigenoma, concretamente, uno de los primeros estudios de asociación de todo el epigenoma con el objetivo de identificar variaciones de metilación relacionadas con la presencia de DM2 se realizó en 2011. Los resultados determinaron que los loci GWAS conocidos estaban enriquecidos con sitios de metilación de forma diferente. Entre los hallazgos destaca la disminución de la metilación en el gen Fat-mass-associated (FTO), con asociación significativa a padecer DM2. Recientemente, tres estudios realizados de forma independiente confirmaron que la metilación diferencial de las regiones CpG en el gen relacionado con la tiorredoxina (TXNIP) se asociaban fuertemente a la presencia de DM2. De manera similar, se ha informado que existen hasta 102 genes relacionados con los islotes de células pancreáticas presentan diferentes grados de metilación, pudiendo afectar a las funciones de la célula β (C β)²³.

Por último, hacer hincapié en la importancia de la dieta en el desarrollo de diabetes y en la prevención de la aparición de complicaciones. Las principales recomendaciones de la Sociedad Americana de Diabetes son la realización de un plan estructurado de dieta hipocalórica con actividad física para modificación de hábitos. Se enfatiza el consumo de alimentos en granos enteros, legumbres, nueces, frutas, verduras y reducción de los alimentos muy procesados²⁴. Existen recientes estudios donde se muestra que un patrón dietético que incorpore un alto consumo de productos lácteos y, en particular, yogur puede ser protector contra la DM2 en adultos mayores con alto riesgo cardiovascular²⁵. La evidencia acumulada hasta ahora sugiere que la adopción de una dieta mediterránea puede ayudar a prevenir la DM2; además el estilo mediterráneo parece bueno para la reducción de HbA1c en personas con diabetes establecida²⁶. Entre los estudios más importantes realizados en los últimos años destaca el PREDIMED. Se trata de ensayo multicéntrico, realizado en España, en el que se asignó aleatoriamente a los participantes a una de las siguientes tres intervenciones: una dieta mediterránea suplementada con aceite de oliva virgen extra (aproximadamente 1 litro por semana), una dieta mediterránea suplementada con frutos secos o una dieta control (con consejo para reducir la grasa dietética) con objetivo primario evaluar efectos a nivel de ECV. El estudio concluyó con resultados positivos a nivel de del riesgo absoluto de

aproximadamente tres eventos cardiovasculares por 1.000 personas-año con el uso de dieta mediterránea²⁷²⁸.

1.4 Homeostasis normal de la glucosa

El mantenimiento de la homeostasis de la glucosa en el cuerpo depende de la secreción normal de insulina por C β y la capacidad efectora de la misma en los tejidos periféricos, lo que implica una sensibilidad normal de los tejidos a la insulina y a la hiperglucemia para su correcto funcionamiento. La acción de la insulina proporciona esencialmente un conjunto integrado de señales que permite equilibrar la disponibilidad y la demanda de nutrientes²⁹. La mayoría de la captación de glucosa (~65-70%) durante la digestión ocurre en tejidos insensibles a la insulina (cerebro, eritrocitos y tejidos esplácnicos) para eliminar la glucosa ingerida y restaurar la normoglucemia. La ruta de entrada de la glucosa en el cuerpo juega un papel importante en el mantenimiento de normoglucemia y la distribución tisular de la glucosa administrada. La captación hepática de glucosa es mucho mayor con glucosa oral que en comparación con la intravenosa. Por lo tanto, solo el 10-15% de la glucosa infundida por vía intravenosa es absorbida por el hígado, sin embargo, esta aumenta a 30-40% cuando la glucosa se administra por vía oral³⁰. Tras la digestión, la concentración de glucosa plasmática se corresponde con la tasa de producción endógena de glucosa, principalmente mediada por el hígado y, en menor medida, por el riñón³¹. Por lo tanto, la producción de glucosa hepática es el principal contribuyente a la concentración de glucosa plasmática en ayunas y a su vez, está regulada principalmente por las concentraciones plasmáticas de **insulina** y **glucagón**.

La **insulina** inhibe la neoglucogénesis y promueve la síntesis de glucógeno y lipogénesis de novo. Los **ácidos grasos libres** (AGL) generados se almacenan como triglicéridos (TGs) en los adipocitos y sirven como una fuente importante de energía en condiciones de ayuno. La insulina es un potente inhibidor de la lipólisis, restringe la liberación de AGL desde el adipocito mediante la inhibición de la enzima lipoproteína lipasa (LPL). La disminución en la concentración de AGL en plasma induce un aumento de la captación de glucosa a nivel muscular y contribuye a inhibir la producción hepática de glucosa.

El **glucagón** es la hormona fundamental que condiciona un incremento en la producción hepática de glucosa: estimula tanto la neoglucogénesis (estimulando la captación de sustratos neoglucogénicos y activando las enzimas neoglucogénicas) como la glucogenólisis. Por otro lado, hay que tener en cuenta que en la gluconeogénesis frente a la glucogenólisis no puede incrementarse sin el suministro de precursores gluconeogénicos (lactato, alanina, piruvato y glicerol), así que la disponibilidad del sustrato puede limitar la influencia del glucagón en la gluconeogénesis.³²

El **músculo esquelético** es el sitio principal de la absorción de glucosa estimulada por la insulina en el estado posprandial. La reducción de la masa muscular y la fuerza se asocia comúnmente con muchas enfermedades crónicas, incluida la obesidad y la resistencia a la insulina. Las complicaciones de la diabetes

en la masa y la fisiología de los músculos esqueléticos, resultantes de la privación de insulina o la resistencia a la insulina aceleran las pérdidas de funciones fisiológicas de la homeostasis de la glucosa³³

El **riñón** humano está involucrado en la regulación de la homeostasis de la glucosa y en las anomalías encontradas en la DM a través de tres mecanismos diferentes: liberación de glucosa en la circulación a través de la gluconeogénesis; absorción de glucosa desde la circulación para captación renal y reabsorción en la circulación de la glucosa del filtrado glomerular para conservar el carbono de la glucosa³¹. El riñón no puede liberar glucosa a través de la glucogenólisis porque contiene muy poco glucógeno y las células renales que pueden sintetizar glucógeno carecen de la enzima glucosa-6-fosfatasa y, por lo tanto, no pueden liberar glucosa³⁴.

La glucosa liberada por **el hígado** en el estado postabsorción puede derivarse tanto de la glucogenólisis como de la gluconeogénesis. Las enzimas clave involucradas en la regulación de la gluconeogénesis (piruvato carboxilasa, fosfoenolpiruvato carboxiquinasa), la glucogenólisis (glucógeno fosforilasa) y la producción neta de glucosa hepática (glucoquinasa, glucosa-6-fosfatasa)³⁵. En el estado postabsorción, la concentración de insulina en plasma en ayunas en sujetos DM2 es 2-4 veces mayor que en sujetos no diabéticos. Esta hiperinsulinemia es un potente inhibidor de la producción hepática de glucosa y por ello, podemos explicar que la resistencia insulínica a nivel hepático debe estar presente en el estado postabsorción para explicar la producción excesiva de glucosa por el hígado en los pacientes con DM.

1.5 Fisiopatología

La teoría más aceptada es la aparición de una secuencia temporal en la que anomalías metabólicas se van desarrollando de forma paulatina en cada estadiaje de la enfermedad. Muchos autores proponen que el defecto de acción de la insulina es la anomalía predominante en el estadio temprano del desarrollo de la DM2 y que la disfunción en la secreción de la insulina es un estadio más posterior³.

1.5.1. Disfunción de la célula beta

Se desconoce si la baja masa de célula β (C β) en la DM2 precede al inicio de la diabetes (es un factor de riesgo para la diabetes) o se desarrolla como consecuencia del proceso de la enfermedad. Los factores que intervienen en este proceso son probablemente multifactoriales e incluyen procesos de **glucotoxicidad, depósitos de amiloide sobre las C β** ³⁶ que inducen a la **apoptosis de la C β , estrés oxidativo, estrés del retículo endoplásmico, fenómenos inflamatorios locales y ausencia de autofagia**. Por un lado, en las C β hay un defecto secretor por reducción de la masa celular y por otra parte, existe una mayor necesidad de secreción de insulina por el estado de resistencia insulínica, lo que da lugar a la disfunción de la C β y al desarrollo de DM.³³⁷. Si bien existe una reducción en la masa de C β en la DM2,

está claro que la magnitud de esta anomalía es insuficiente para explicar el grado de deterioro en la liberación de insulina. Aunque menos estudiado, **la liberación desregulada de glucagón de las células α ($C\alpha$)**, que se manifiesta como un aumento de las concentraciones de glucagón en ayunas e imposibilidad para suprimir adecuadamente la liberación de glucagón después de la ingestión de comida, contribuye al desarrollo de hiperglucemia³⁸. No obstante, se desconoce si esto representa un cambio primario en la $C\alpha$ o si es secundario a una anomalía en la función de la $C\beta$. La sangre de los islotes fluye desde la $C\beta$ a la $C\alpha$ y luego a la célula δ ($C\delta$) productora de somatostatina, y las altas concentraciones de insulina que bañan la $C\alpha$ son capaces de suprimir la liberación de glucagón. Otros productos de $C\beta$ tales como zinc, ácido γ -aminobutírico (GABA) o glutamato también pueden regular la liberación de glucagón³⁹

La **inflamación sistémica** se vincula con la disfunción de las $C\beta$ ya que la glucosa y los AGL incrementan la producción de IL-1 y IL-6. Los marcadores de inflamación sistémica, incluida la proteína C-reactiva (PCR) muestran relaciones transversales con la sensibilidad a la insulina y la función de las $C\beta$ ⁴⁰. La producción de IL-1 β en islotes y los antagonistas de origen natural, particularmente el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra), equilibran y regulan la acción de IL-1 β en los islotes pancreáticos. A nivel del tejido adiposo se asocia con la acumulación de macrófagos activados que expresan una serie de genes proinflamatorios. Entre las citocinas producidas destaca la producción de TNF- α , que se liberan y tiene su efecto destacado a nivel local para deteriorar la señalización de la insulina⁴¹.

El **estrés oxidativo** secundario a un estado de hiperglucemia crónica y a alteraciones lipídicas lleva lugar a la aparición de la “**glucolipotoxicidad**”⁴². Las $C\beta$ carecen de enzimas antioxidantes que puedan eliminar el exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que a su vez favorece la apoptosis de este tipo de células. La mitocondria es la principal fuente de ROS y a su vez, la principal diana del daño de la excesiva producción de estrés oxidativo³⁸. En los modelos de cultivo celular de la DM la hiperglucemia produce estrés oxidativo y lesión celular en los cardiomiocitos, las células endoteliales y las neuronas⁴³. El estrés oxidativo también da como resultado niveles elevados de glutatión y una mayor peroxidación lipídica en modelos animales murinos de DM2. Los productos finales de glicación avanzada (AGEs) son entidades que fomentan las complicaciones en la DM y que conducen a la liberación de ROS.

El **retículo endoplásmico (RE)** es el responsable de la síntesis de todas las proteínas secretadas, incluida la insulina. Cuando hay una mayor demanda secretora, se requiere mayor actividad del RE y se ve obligado a aumentar la producción de insulina, lo que podría causar estrés crónico del RE con disminución en la traducción de proinsulina y la degradación de ARN mensajero de insulina⁴⁴. La disfunción de la $C\beta$ mediada por el estrés del RE puede ser fundamental en la transición de prediabetes a diabetes⁴⁵.

El **depósito de polipéptido amiloide (PPAI)** aparece en los islotes de $C\beta$ y ha sido considerado durante mucho tiempo como la característica patológica más predominante en los islotes de DM2. Sin embargo, no se ha determinado si es simplemente un subproducto o la causa de la pérdida de $C\beta$ en la diabetes. Es intrigante que más del 80% de los pacientes de EE. UU. con DM2 tienen deposición de

amiloide de islote, pero solo el 27% de los pacientes japoneses con DM2 son positivos para el amiloide, lo que muestra la diferencia étnica en el depósito de amiloide en la DM2. También se ha demostrado que la degradación alterada de las moléculas de amiloide causa estrés RE en las C β , dando lugar a daños irreparables y muerte de las C β , aunque los datos aún son controvertidos⁴⁶

La **ausencia de autofagia** en modelos murinos ha mostrado que da lugar a un aumento de la apoptosis, descenso de la proliferación celular, alteración de la secreción de insulina, acúmulos proteicos y daño de orgánulos intracelulares⁴⁷. La inducción del déficit de autofagia también se postula mediado a través de procesos de eliminación de amiloide⁴⁶

1.5.2. Resistencia insulínica en la fisiopatología de la DM2

La resistencia insulínica (RI) se caracteriza por un déficit de acción de la insulina en los tejidos periféricos aún en presencia de concentraciones sanguíneas elevadas (hiperinsulinemia), y es debida a eventos que afectan al receptor de insulina y alteraciones a nivel postreceptor. Otros mecanismos responsables de la alteración en la acción de la insulina son el aumento de los niveles circulantes de precursores de la gluconeogénesis (lactato, alanina, glicerol), la hiperglucagonemia y la mejoría de la sensibilidad al glucagón⁴⁸. El exceso de deposición de grasa (acil CoA LC-grasos, diacilglicerol y ceramida) en el hígado y el músculo ha demostrado que causa resistencia a la insulina en estos órganos, por lo que se podría extrapolar que la disposición de grasa en la célula beta puede producir su propia disfunción^{48,30}.

El receptor de insulina (IR) está formado por dos subunidades α y dos unidades β (con actividad quinasa). Ambos tipos de subunidades son sintetizadas a partir de un pro-receptor único codificado por un gen localizado en el cromosoma 19. Las dos subunidades β se insertan en la membrana celular y están unidas a las subunidades alfa mediante enlaces de disulfuro. Las subunidades alfa se encuentran en el lado extracelular de la membrana. A su vez, éstas se unen entre sí mediante puentes disulfuro, pero, también están a su vez unidas a las subunidades β por enlaces disulfuro, de modo que la molécula forma un solo complejo heterotetramérico. El proceso de señalización de insulina comienza con la unión a su receptor en la superficie celular. A partir de la activación de la quinasa de la subunidad β del IR se dividen las vías de señalización molecular⁴⁹. El mecanismo de autofosforilación al parecer se da por procesos de cis- y trans- autofosforilación mediante las cuales ciertos residuos son fosforilados por la actividad de fosfotransferasa de la misma subunidad β (cis-), mientras que otros son sustrato de la actividad de cinasa de la subunidad β opuesta (trans-). Además, estudios recientes han reportado que se requiere de al menos 7 sitios de fosforilación en Tyr en el IR y de la actividad enzimática de cinasa de Tyr para el apropiado funcionamiento del receptor. El inicio de la actividad de tirosincinasa del receptor de insulina fomenta la autofosforilación de la propia subunidad β y la fosforilación rápida de las denominadas proteínas de acoplamiento como los sustratos de IR (IRS) -1, -2, -3 y -4, y otros sustratos; que incluyen las proteínas de homología del colágeno (shc) y proteínas con dominio SH2 (por ejemplo, fosfatidilinositol-IP- 3-cinasa). Estas a su vez, activan múltiples sustancias intermedias de señalización intracelular (figura 2). Así pues,

las proteínas IRS, shc y SH2 desempeñan un papel regulador importante en la cascada de señalización de la insulina. La interacción entre las proteínas IRS-1 y fosfatidilinositol (IP) 3-cinasa determina la activación de Akt (también, denominada proteincinasa B), que desempeña un papel crucial en el mecanismo de acción de la insulina para la translocación de GLUT-4, el transporte de glucosa y la activación de la óxido-nítrico sintasa. En cambio, los efectos no metabólicos, proliferativos, mitógenos y proinflamatorios de la insulina se producen mediante la activación de la Ras (principalmente a través de shc y, en menor grado, de proteínas IRS), la Raf y las cinasas de proteína activada por mitógenos (MAPK) ^{49 50}.

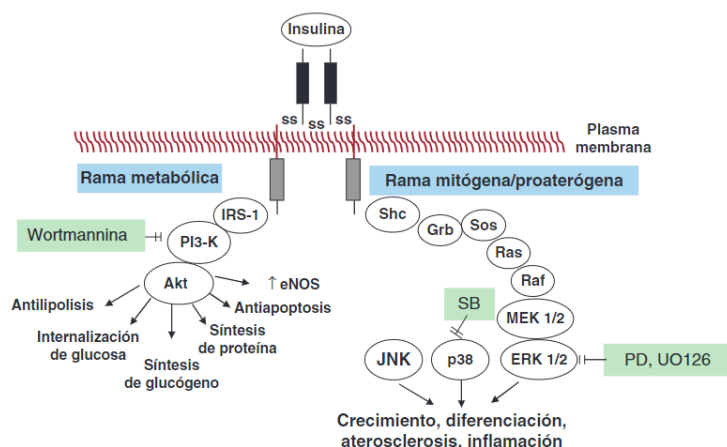


Figura 2. Receptor de Insulina. Adaptado de⁵¹

Akt: proteincinasa B; eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial; ERK: cinasa receptora extracelular; IRS-1: receptor de sustrato de insulina 1; JNK: cinasa terminal c-Jun NH₂-1; MEK: proteincinasa activada por mitógenos/cinasa receptora extracelular; p38: proteincinasa activada por mitógenos p38; PD (PD98059) y UO126: inhibidores de cinasa receptora extracelular 1/2; PI3-cinasa: fosfatidilinositol (IP)3 cinasa; wortmannina: inhibidor de PI3-cinasa.

Aunque existe una predisposición genética muchos de los mecanismos moleculares implicados en la falta de respuesta de la insulina están ampliamente relacionados con la **obesidad** y el **envejecimiento**. Otros factores principales implicados son la **lipotoxicidad**, **hipoxia**, **estrés del RE**, **estrés oxidativo**, **disfunción mitocondrial e hiperinsulinemia**⁴⁸

La **obesidad** se asocia a un estado inflamatorio crónico de bajo grado y se caracteriza por un incremento de la presencia de citocinas pro-inflamatorias como IL-6, PCR, inhibidor del activador del plasminógeno o la expresión TNF- α ⁵². La secreción de TNF- α tiene efectos directos en las funciones del tejido adiposo y está mediada por la expresión en el adipocito de genes responsables de la inducción de la lipólisis, inhibición de la señalización de la insulina, liberación de AGL, inflamación y respuesta inmune. La supresión de este receptor confiere mejoras metabólicas y disminuye la resistencia insulínica periférica y hepática. La obesidad está asociada a una activación de diferentes vías de señalización intracelulares con capacidad proinflamatoria. Entre ellas, cabe destacar la activación de la vía del inhibidor de kappa β cinasa (IKK β) / factor nuclear kappa β (NF-k β) o la activación de la cinasa amino-terminal c-Jun-1 (JNK1).

Ambas vías se han relacionado con la activación de TNF- α , AGL, diacilglicerol, ceramidas, ROS e hipoxia en obesidad⁵³. Por ejemplo, la fosforilación inhibitoria de IRS-1 puede ocurrir a nivel de adipocitos, hepatocitos y células musculares tras la activación de JNK-1 o NF-K β , lo que conduce a la activación de vías intracelulares implicadas en procesos de inflamación, proliferación celular y aterogénesis. El estado inflamatorio, además de inhibir la cascada de señalización de la insulina, afecta a la función del factor de transcripción para el receptor de peroxisoma proliferador activado gamma (PPAR γ), que actúa a nivel de la regulación de la síntesis lipídica y acumulación de grasa en el tejido adiposo^{54,55}. Por lo cual, se favorece la sobrecarga grasa que induce la activación de más vías inflamatorias y aumenta la liberación de AGL por los adipocitos, que estimula a macrófagos y adipocitos residentes a través de receptores de tipo Toll-like (TLR). La señalización a través de los TLR es responsable de gran parte de la producción de citoquinas proinflamatorias que se expresa en células endoteliales, células del músculo esquelético, hepatocitos y adipocitos, donde contribuye a la resistencia a la insulina promoviendo la formación de ROS, así como la activación de serin-quinazas que catalizan serina en lugar de tirosina en la fosforilación de IRS⁵⁶. Por otro lado, no hay que olvidar la implicación de las células inmunes en el proceso inflamatorio en la obesidad (macrófagos, linfocitos, neutrófilos y células Nk) y en el tejido adiposo subcutáneo. En obesos se ha cuantificado una infiltración de macrófagos activados mucho mayor, constituyendo el 50% del contenido celular total, respecto a individuos con normopeso 10%⁵⁷.

La **lipotoxicidad** es una acumulación anormal de TG y otras especies de lípidos en tejidos no adiposos y está presente tanto en la obesidad como en la lipodistrofia. Esta última entidad representa una situación en la que el desarrollo del tejido adiposo se ve afectado, impidiendo la acumulación de grasa corporal, con acumulación lipídica fuera del tejido adiposo⁵⁵. Varios mecanismos han servido para explicar cómo los ácidos grasos saturados perjudican las acciones de la insulina, como el ciclo de Randle (ciclo de ácidos grasos de glucosa), la acumulación de derivados de lípidos intracelulares (diacilglicerol y ceramidas), estrés oxidativo, modulación de la transcripción génica, inflamación y disfunción mitocondrial⁵⁸.

La **hipoxia** a nivel local del tejido adiposo desempeña un papel clave en la disfunción metabólica participando en el reclutamiento de macrófagos e inflamación local. Se incrementa la expresión de citocinas proinflamatorias y de genes implicados en el metabolismo glucolítico. Por otro lado, tiene un efecto inhibitorio en el desarrollo de vías del metabolismo oxidativo⁵⁹. El tejido adiposo de los pacientes obesos está pobremente oxigenado y los adipocitos tienden a hacerse más grandes y distantes de la vascularización. Los factores inductores de hipoxia (HIF) son importantes mediadores de la respuesta celular adaptativa a la hipoxia. Estos factores desempeñan un papel importante en la regulación de genes implicados en el metabolismo anaeróbico, crecimiento celular, supervivencia, angiogénesis y respuesta inmune⁶⁰. La hipoxia también inhibe la expresión de genes relacionados con el metabolismo oxidativo mientras estimula la expresión de genes asociados con la glucólisis. La captación de glucosa y la liberación de lactato por los adipocitos son estimuladas por la hipoxia y la sensibilidad a la insulina disminuye. Los pre-adipocitos y macrófagos del tejido adiposo también responden a la hipoxia. El HIF α se considera un

sensor celular de las concentraciones celulares de oxígeno; se acumula dentro del citoplasma en situaciones de hipoxia, para luego actuar a nivel nuclear, mediando la adaptación metabólica durante la hipoxia y la isquemia, incluyendo la transición del metabolismo oxidativo al glucolítico⁶¹.

El **estrés del RE** a pesar de que es considerado uno de los posibles mecanismos implicados en el desarrollo de RI tanto en hígado como tejido adiposo o páncreas, sólo tenemos disponibles estudios desarrollados en modelos murinos. Recientemente, los enlaces moleculares entre el exceso de nutrientes, el estrés de los orgánulos y el desarrollo de enfermedades metabólicas se han estudiado ampliamente. Específicamente, el exceso de nutrientes desencadena el estrés del retículo endoplásmico y aumenta la producción de especies de oxígeno reactivas mitocondriales, que conduce a la activación de la vía de señalización del estrés, la respuesta inflamatoria, la lipogénesis y la muerte de la C β . La concentración de proteínas en la luz del RE es muy alta y el aumento de la demanda de síntesis de proteínas o acumulación de las proteínas mal plegada en el lumen del RE genera "estrés ER". La presencia de proteínas mal plegadas en el citosol desencadena la activación de la vía de señalización denominada respuesta proteica desplegada (UPR). La activación de la UPR desencadena una importante respuesta transcripcional, implicada en el desarrollo de RI y en la que interviene la proteína homóloga a C/EBP (CHOP). Colectivamente, la UPR alivia el estrés celular con disminución de la síntesis de proteínas global, aumento de la degradación de proteínas mal plegadas, que promueven la síntesis de chaperonas, la expansión del volumen de la membrana del RE y desencadenan la muerte celular. La autofagia es un mecanismo indispensable para la depuración de lípidos hepáticos, disminución del estrés oxidativo de las C β y la diferenciación de los adipocitos^{44 62}.

La DM como enfermedad progresiva está mediada en gran medida por la liberación de ROS y el **estrés oxidativo**. La elevada producción de radicales libres que llegan a sobrepasar la capacidad antioxidante endógena. Están implicadas varias enzimas tales como cyclooxygenasas, xantina oxidasa, óxido nítrico sintasas desacopladas y NADPH oxidasas⁴³. Su principal papel a nivel de RI es la activación de vías proinflamatorias como JNK o NF κ B⁶³

La **disfunción mitocondrial** se define como una alteración en el número, densidad o función de las mitocondrias presentes en una célula o tejido⁶⁴. Hay alteraciones en la función intrínseca de las mitocondrias aisladas de humanos que cursan con RI y DM. En sujetos diabéticos y obesos en comparación con sujetos delgados se demostraron una disminución de la presencia de NADH ubiquinona oxidorreductasa, también conocida como NADH deshidrogenasa o complejo I en el transporte electrónico mitocondrial. Su importancia radica en pertenecer al primer complejo proteico de la cadena de transporte de electrones y es el ensamblaje enzimático de membrana de mayor tamaño, y el mayor de toda la cadena respiratoria. Una reducción de la presencia de este complejo enzimático da lugar a una disminución de la capacidad reductora de las células de sujetos obesos o diabéticos. Así pues, se produce también una acumulación de acilCoAs y diacilglicerol (DAG) que interfieren en la señalización de la insulina a través de la proteína quinasa C (PKC)⁶⁵. Además, recientemente, hay estudios que implican la desregulación de la homeostasis del Ca²⁺ intracelular con la presencia de disfunción mitocondrial. La relación se establece a

través de los defectos en la función de las membranas del RE asociadas a mitocondria (lugares de contacto entre la membrana externa mitocondrial y la membrana RE)⁶⁶. En general, la mayoría de los autores describen la disfunción mitocondrial como consecuencia de la RI, más que como un origen causal de la propia RI

La **hiperinsulinemia** significa un alto nivel constante de insulina en plasma en ayunas. El equilibrio de la tasa de producción de insulina y la tasa de aclaramiento de insulina determinará el nivel de insulina en plasma. Aunque generalmente se acepta que la hiperinsulinemia es el resultado de la RI, los estudios también sugieren que un nivel alto de insulina puede conducir a la RI, especialmente en presencia de ácidos grasos.⁶⁷ Han pasado más de 30 años desde que la RI se considera como resultado de la hiperinsulinemia, que representa un esfuerzo del cuerpo para prevenir la hiperglucemia. La vía de señalización de la insulina tiene un circuito de retroalimentación negativa para controlar la actividad de dicha vía, precisamente en respuesta a la estimulación de la insulina. Este circuito se activa por la señal de la insulina para evitar la activación de las respuestas de estrés inducidas por la insulina⁶⁷. El mecanismo es la inhibición de la función IRS-1/2 después de la activación del circuito de retroalimentación negativa en la vía de señalización de la insulina.⁶⁸ Por otro lado, hay otras vías moleculares como la resistencia a la leptina en las C β que también pueden contribuir a la producción excesiva de insulina por las C β ⁶⁸.

1.6. Las bases del tratamiento en la diabetes mellitus tipo 2

La optimización del estilo de vida y la educación diabetológica son esenciales para todos los pacientes con diabetes y conforman la base de los principios integrados del manejo de la diabetes. Se debe considerar la pérdida de peso en todos los pacientes con prediabetes y DM2 que presenten sobrepeso u obesidad^{69,70}. Las investigaciones más recientes disponibles relacionadas con los patrones de alimentación recomendados para la prediabetes o DM2 es el patrón de alimentación mediterráneo. Aunque se consideran aceptables otros patrones alimentarios, pero priorizando los vegetales sin almidón, los granos enteros, la fibra dietética y la reducción de los hidratos de carbono⁷¹. En la actividad física, se adaptará a la situación clínica del paciente, se recomienda un programa de ejercicio con los siguientes puntos: actividad aeróbica de intensidad moderada ≥ 150 min / semana (frecuencia cardíaca máxima del 50% -70%), distribuida en ≥ 3 días / semana con no más de 2 días consecutivos sin ejercicio, entrenamiento de resistencia ≥ 2 veces / semana (en ausencia de contraindicaciones) y reducir el tiempo sedentario, a no más de 90 minutos seguidos sentados⁷².

A la hora de determinar el objetivo Hb1Ac se deberá decidir en función de numerosos factores; como la edad, la esperanza de vida, comorbilidades, duración de diabetes, riesgo de hipoglucemia o consecuencias adversas por hipoglucemia, motivación y adherencia. Un nivel de A1C de $\leq 6.5\%$ se considera óptimo si se puede lograr de una manera segura y asequible, pero los objetivos más altos pueden ser apropiados para ciertos individuos. Por lo tanto, un objetivo de $> 6.5\%$, incluso 7% a 8%, puede

ser apropiado para algunos pacientes, como aquellos con vida limitada expectativa o antecedentes de hipoglucemia grave⁷³⁷⁴.

Los objetivos de control glucémico incluyen glucosa en ayunas y postprandial según lo determina el autocontrol de la glucosa en sangre. La elección de las terapias para la diabetes debe individualizarse según las comorbilidades de los pacientes y los efectos adversos de los fármacos. Minimizar el riesgo de hipoglucemia grave y no severa es una prioridad. Se trata de una cuestión de seguridad, adherencia y costo-eficacia, al igual que minimizar el riesgo de aumento de peso.⁷⁰⁷³⁷⁴.

En 1998, el emblemático estudio prospectivo de la diabetes del Reino Unido (UKPDS) reveló que el tratamiento con metformina además de los efectos reductores de la glucosa, la neutralidad en el peso y bajo riesgo de hipoglucemia, se podría asociar a largo plazo con reducción de los eventos cardiovasculares y mejorar la supervivencia⁷⁵. La reducción del RCV parece ser en gran parte independiente de la eficacia de reducción de la glucosa y la atención de la literatura propone a señalar los efectos potencialmente ventajosos del fármaco a nivel macrovascular y microvascular⁷⁶. En los 10 años de seguimiento posterior al UKPDS se observó una reducción continua en el riesgo microvascular y una reducción del riesgo emergente de infarto de miocardio y muerte por cualquier causa. Los pacientes asignados a metformina, en comparación con el grupo convencional, tuvieron reducciones de riesgo del 32% para cualquier criterio de valoración relacionado con la presencia diabetes, 42% para la muerte relacionada con la diabetes y 36% para la mortalidad por todas las causas⁷⁷⁷⁸. A día de hoy, a pesar de la aparición de nuevos fármacos y estudios de seguridad cardiovascular no se ha desbancado el lugar prioritario de la metformina en el tratamiento farmacológico⁷⁹⁶⁹⁸⁰. La terapia de combinación de fármacos generalmente es necesaria y debe involucrar agentes con mecanismos de acción complementarios. La DM-2 es una enfermedad progresiva y a pesar, del tratamiento con metformina de primera línea puede requerir adherir otras terapias para llevar un control glucémico óptimo. En las recomendaciones de guías de práctica clínica de la ADA sugieren pautar terapia dual inicial con metformina más otro agente (con cambios de hábitos de vida) cuando el valor de Hb1Ac está entre 1.5-2% por encima del objetivo y la asociación de endocrinólogos clínicos de americanos (AACE) recomienda que en caso de Hb1Ac >7,5% al diagnóstico o en el transcurso de la enfermedad hay que añadir segundo fármaco hipoglucemiante. No obstante, las recomendaciones terapéuticas más actuales, tanto en los consensos de la ADA como de AACE consideran en caso de pacientes con enfermedad cardiovascular establecida, enfermedad renal establecida, alto riesgo de enfermedad cardiovascular (pacientes de >55 años con estenosis carotídea mayor del 50%, enfermedad vascular periférica o hipertrofia ventricular) o fallo cardíaco es recomendado iniciar segundo fármaco independientemente del valor de Hb1Ac. Los análogos de receptor del péptido 1 de tipo glucagón (GLP1RA) y/o inhibidores del cotransportador -2 de sodio-glucosa (iSGLT2) deben iniciarse conjuntamente con metformina en este tipo de población. La elección del medicamento de segundo escalón debe ir orientada según los efectos secundarios, en particular la hipoglucemia y el aumento de peso, el costo y preferencias del paciente. Consideraciones similares se aplican en pacientes que requieren un tercer agente para lograr objetivos glucémicos; allí es

muy poca evidencia basada en ensayos para guiar esta elección^{81 82}. En pacientes intolerantes a metformina, se deben considerar dos fármacos con mecanismos de acción complementarios de otras clases. Hay seis clases principales de agentes antidiabéticos que se puede combinar con metformina: sulfonilureas (SU), tiazolidinedionas (TZD), dipeptidil peptidasa-4 inhibidores (DPP4i), inhibidores del cotransportador-2 de sodio-glucosa (iSGLT2), agonistas del receptor del péptido 1 de tipo glucagón (GLP1RA) e insulina⁷⁰⁸³⁸⁴. Es importante destacar que no se debe esperar hasta que el control glucémico del paciente se deteriore antes de agregar un segundo agente. Históricamente, la insuficiente secreción de insulina fue tratada con secretagogos; sulfonilureas (entre las más usadas están glibenclamida o glicazida) o con la terapia de reemplazo de insulina. Ambas reducen la Hb1Ac, pero confieren riesgo de hipoglucemia y aumento de peso. La pioglitazona, una opción efectiva adicional, pero no es una de las medicaciones recomendadas por AACE, posiblemente por lo que respecta a un mayor riesgo de insuficiencia cardíaca y aumento de peso⁷⁴. Las terapias basadas en incretinas aumentan la secreción de insulina dependiente de glucosa y confieren un bajo riesgo de hipoglucemia. Estos agentes incluyen los GLP1RA y iDPP4. El GLP-1 es una hormona secretada por el intestino delgado distal en respuesta a la ingestión de alimentos. Este péptido aumenta la secreción de insulina dependiente de la glucosa, disminuye la secreción de glucagón en los islotes, ralentiza el vaciamiento gástrico y aumenta la sensación de saciedad. El GLP1RA puede asociarse con náuseas y vómitos transitorios tras iniciar el tratamiento (de 1 a 3 meses de duración). Los inhibidores de la DPP-4 mantienen mayores concentraciones endógenas de GLP1, reducen modestamente la glucosa en sangre, son neutros en peso y no causan hipoglucemia. Algunos autores han comenzado a defender el uso de aGLP1RA por encima de la metformina por su acción en lo que se conoce el sexteto ominoso DeFronzo (efectos beneficiosos de GLP-1 a nivel del sistema cardiovascular, gastrointestinal, pancreático, sistema nervioso central, renal y pérdida de peso)⁸⁵. Los SGLT-2 reducen Hb1Ac sin hipoglucemia y sus efectos adversos incluyen poliuria, diuresis, presión arterial baja, pérdida de peso, cetoacidosis e infecciones genitales aumentadas. No obstante, la insulina sigue siendo el agente reductor de la glucosa más potente, particularmente para pacientes con altos niveles de HbA1c. Existen múltiples barreras para iniciar el tratamiento con insulina, incluido el tiempo restricciones, incomodidad del paciente con auto-inyecciones y limitaciones en el conocimiento sobre nuevas formulaciones de insulina.

Las guías AACE / ACE recomiendan la insulina basal en combinación con metformina u otros agentes reductores de glucosa, como tratamiento inicial para pacientes con una HbA1c inicial > 9% que tienen síntomas de hiperglucemia. Además, puede ser útil como opción complementaria para la doble o triple combinación de terapia. Más, específicamente, se recomienda insulina basal para pacientes con DM2 que reciben 2 antidiabéticos orales que tienen una HbA1c > 8% o de larga duración DM2. La insulinización temprana debe considerarse en aquellos pacientes que al diagnóstico presentan un catabolismo continuo (pérdida de peso), glucemias > 300 mg/dl o Hb1 Ac > 10%^{74 86 87 88}. Priorizar la insulinización con análogos basales de insulina sobre el uso de insulina protamina humana (NPH) porque una sola dosis basal proporciona una concentración de insulina sérica relativamente uniforme durante hasta 24 horas^{89 90}. Aunque los análogos de insulina y la NPH han demostrado ser igualmente efectivos

en la reducción de la HA1c en los ensayos clínicos, los análogos de insulina causaron menos hipoglucemia⁹⁰. Tras la falta de control glucémico con insulina basal con o sin terapia oral asociada; se ofrece agregar al tratamiento insulínico tres opciones igualmente válidas: GLP-1-R, inyección de insulina prandial a la hora de la comida (los análogos de acción rápida son preferibles a la insulina humana regular, ya que tienen un inicio de acción más rápido y se asocian con menor tasa de hipoglucemias) o administrar una insulina mixta inyectada dos veces al día^{83 91}.

2. Metformina

2.1 Historia y origen del nacimiento de la metformina

El origen herbolario de la metformina comienza a partir del uso de *Galega officinalis* como medicina tradicional en la Europa medieval⁹². Sus usos fueron recogidos en el libro *Culpeper's Complete Herbal* en 1652. Se le atribuían beneficios contra gusanos, epilepsia, fiebre y la peste. Más tarde, en 1772, John Hill recomendó el uso de *G.officinalis* para tratar condiciones de sed y micción. La planta se introdujo en América del Norte en 1891 y ahora está clasificada como hierba nociva en muchos estados de los EE. UU⁹³

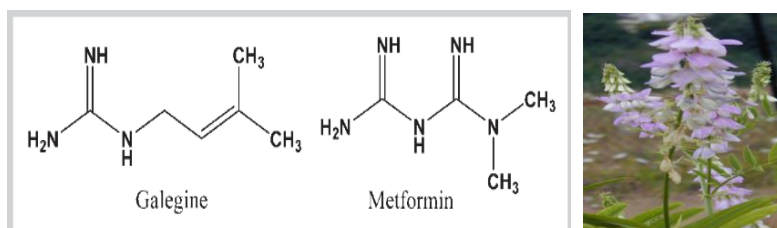


Figura 3. Estructura química de *G.Officinalis* y foto de la planta originaria.

Los primeros análisis químicos de *G. officinalis* que datan de mediados de 1800 encontraron que la planta era rica en guanidina y compuestos relacionados. En 1918 la guanidina es utilizada por primera vez para reducir la glucosa en sangre de animales. En la década del 1920 varios derivados de mono-guanidina mostraron una reducción de la glucosa en sangre. No obstante, el optimismo inicial se atenuó cuando se observó toxicidad secundaria y en la década de 1930 se aparcó como planta medicinal. Su estudio no se volvería a retomar en profundidad hasta el año 1956, a través de Jean Sterne, debido al trabajo realizado en el Aron laboratorio en París, con la ayuda de Denise Duval. Sus estudios se centraron sobre la farmacodinamia de varios compuestos a base de guanidina. Entre ellos destacaban la metformina y la fenformina. Se elaboraron estudios tanto en modelos de animales sanos como en diabéticos. Destacaron la metformina para su estudio en la clínica de diabetes basada en su eficacia para reducir la glucosa y los efectos adversos mínimos en modelos animales sanos y diabéticos⁹³⁹⁴. Esto se debió principalmente a que el riesgo de acidosis láctica era mucho mayor con el uso de otras biguanidas (fenformina o buformina). Así que, a partir de 1970 la biguanida que tendría aprobación para uso médico

sería sólo la metformina⁹⁵. Su composición química lo conforman dos grupos de guanidina con la pérdida de un grupo amoníaco. Tras el miedo inicial suscitado por la acidosis láctica de sus antecesores no fue definitivamente aprobado por la FDA hasta el 29 de diciembre de 1994. A medida que creció la confianza de los prescriptores, se aprobó una formulación de liberación prolongada de metformina en el año 2000 con efectos secundarios gastrointestinales reducidos⁹³.

2.2. Farmacocinética de la metformina

En los últimos 50 años más de 100 publicaciones han discutido los estudios de farmacocinética de la metformina sin llegar a comprenderla en su totalidad. Los parámetros farmacocinéticos pueden deberse a variaciones en el tamaño de la dosis, forma de dosis, etnia del sujeto, genética, estudio diseño, tamaño de muestra y métodos analíticos. Se conoce que la metformina es un fármaco oral con un pKa (constante de disociación ácida) de 11,5, por lo que la molécula es capaz de disociarse en pH fisiológicos. Por lo tanto, la difusión pasiva rápida de metformina a través de las membranas celulares es poco probable. La excreción de la metformina inalterada en la orina es su principal modo de eliminación, y los metabolitos de la droga no se han identificado. Además de la filtración renal, el medicamento también es eliminado por secreción tubular activa. Aproximadamente, el 90% se eliminará en 12 horas y el 100% en 24 horas. El aclaramiento renal promedio de la población que toma metformina es de 507 ± 129 ml / min en adultos sanos o pacientes diabéticos con buena función renal. La vida media del fármaco es de 4 a 8 horas, tiempo que se prolonga en sujetos con deterioro de la función renal. El gran volumen aparente de distribución de la metformina entre todos los órganos se cree que viene determinado por transportadores del fármaco. La concentración de metformina en los hepatocitos es mucho mayor que en la sangre. En el hígado encontramos uno de sus sitios primarios de acción. Numerosos estudios han relacionado varios transportadores de cationes orgánicos (OCT) para su absorción en los diferentes tejidos: OCT1 (gen SLC22A1), OCT2 (gen SLC22A2), OCT3 (gen SLC22A3), MATE1 (gen SLC47A1), MATE2 (gen SLC47A2), PMAT (gen SLC29A4) y OCTN1 (gen SLC22A4)⁹⁶.

El principal lugar de absorción del fármaco ocurre en el intestino delgado (duodeno y yeyuno), sobretodo, mediado por los transportadores de monoaminas plasmáticas (PMAT) y por el transportador de cationes orgánicos 3 (OCT3), y posteriormente, mediante el transportador de cationes orgánicos-1 (OCT1) alcanza el torrente sanguíneo. El OCT3 se encuentra principalmente localizado en el borde de cepillo de los enterocitos. No obstante, se puede detectar en casi todos los tejidos y se expresa en alta concentraciones a nivel de tejido adiposo, pulmón, próstata y músculo esquelético de humanos y roedores. Por ello, se le ha atribuido gran parte de la responsabilidad de la distribución del fármaco en el resto de los tejidos. El OCT1 se expresa a nivel de la membrana basolateral de los enterocitos y juega un papel muy importante en la absorción de metformina, mediando su flujo desde la membrana basolateral de los enterocitos a la circulación portal. Recientemente, el transportador de tiamina a nivel intestinal (THTR-2) también ha demostrado la capacidad de transportar metformina hacia los tejidos, mayormente, cuando existe un pH intestinal ácido. Metformina puede ejercer de sustrato de varios transportadores de

cationes orgánicas expresados en el riñón. Más concretamente, el transportador de cationes orgánicas 2 (OCT2) se expresa principalmente en la membrana basolateral de las células del túbulo renal. La principal función que ejercen en el tejido renal es la entrada de metformina en las células del túbulo proximal y, junto con MATE1 (transportador de apical de cationes orgánicos tipo 1) y MATE2 (transportador apical de cationes orgánicos tipo 2) regulan la secreción de metformina en la orina. Un inhibidor competitivo de MATE, primetamina, puso en relieve la importancia del receptor MATE1 en la excreción renal de metformina. Después de la administración de primetamina se lograba una reducción significativa en el aclaramiento renal de metformina entre un 23 y 35%, tanto en microdosis como en dosis terapéuticas. Se destacaron aumentos significativos en la concentración máxima (Cmax) y el área bajo la curva (AUC) de concentración plasmática metformina-tiempo en dosis terapéuticas⁹⁷.

El papel de los factores genéticos en la predicción de las variaciones de respuesta a la metformina ha sido sujeto de muchas investigaciones. Múltiples estudios han informado asociaciones entre variaciones genómicas de los transportadores de metformina y su farmacocinética. Entre los estudios genéticos en voluntarios sanos destacan los hallazgos en los polimorfismos : OCT2 y MATE1/MATE2 que se han asociado con cambios en la farmacocinética y la farmacodinamia de la metformina⁹⁸. En un estudio de farmacogenómica realizado con 20 voluntarios sanos demostraron la existencia de varias variantes genéticas de OCT1: R61C (rs12208357), G401S (rs34130495), 420d (rs142448543 o rs34305973 o rs35191146), y G465R (rs34059508) que ejercieron un significativo efecto sobre la farmacocinética de la metformina después de la administración oral⁹⁹. En el estudio de *Choi et al* demuestra que los pacientes diabéticos que son homocigotos para g.-130G> A (rs12943590) en MATE2-K (gen SLC47A2) tienen una respuesta peor a tratamiento con metformina medido por la evaluación del cambio de Hb 1 Ac¹⁰⁰.

La concentración del fármaco a nivel intestinal puede superar hasta 300 veces el valor de la concentración plasmática. La biodisponibilidad oral media \pm desviaciones estándar (SD) de metformina es del $55 \pm 16\%$ y se reduce del 86% al 42% después de que las dosis de metformina por vía oral varíen entre 250 a 2000 mg diarios. Además, la biodisponibilidad de la metformina puede disminuir en presencia de alimentos con una reducción del 20% en el AUC y una reducción Cmax en el 35%. Su principal determinante es la absorción intestinal y nos lleva a pensar que presenta un mecanismo saturable en su proceso de absorción. A su vez, ese mecanismo saturable depende de los transportadores. La terapia con metformina se asocia con efectos secundarios gastrointestinales que incluyen malestar gástrico, náuseas y diarrea. El enlentecimiento del vaciado gástrico y el tránsito del intestino delgado pueden afectar la absorción y el perfil farmacocinético de la metformina. Hay nuevas estrategias de formulación para la metformina que pueden conducir a una mejora en la biodisponibilidad, una reducción en la frecuencia de dosificación y/o una disminución en los efectos secundarios gastrointestinales¹⁰¹. La tasa de absorción de metformina es mayor a pH 6.6 que a pH 7.4 y es consistente con la fisiología intestinal. Estos datos sugieren que el ambiente naturalmente ácido en la luz intestinal puede servir como una fuerza motriz para promover la absorción de metformina mediada por PMAT^{96 100}

2.2.1 Formas de presentación de la metformina

La formulación más usada es la de liberación inmediata (metformina IR) en dosis de 500, 850 y 1,000 mg, en tabletas o en polvo. La formulación en polvo ha sido diseñada para superar el problema del tamaño de las tabletas, que son difíciles de tragar, especialmente para pacientes de edad avanzada o aquellos con disfagia. En los últimos años se han desarrollado nuevas preparaciones de metformina para una posible mejora de la eficacia, tolerancia y los efectos no glicemiantes pleiotrópicos del fármaco. La metformina de liberación prolongada (metformina XR) ha contribuido a mejoría de la adherencia, a una mejor tolerancia gastrointestinal, permite la dosificación una vez al día y actualmente, está disponible en múltiples formulaciones de marcas y genéricos; sin embargo, es más costosa que la metformina IR. Recientemente, se ha desarrollado otra nueva formulación de metformina; metformina de liberación retardada (metformina DR). En estas tabletas la principal modificación es la aparición de un núcleo de hidrocloreuro; añadido a la metformina de liberación inmediata (metformina IR), superpuesto todo ello, con un recubrimiento entérico propio. La liberación de la metformina se retrasa en el intestino delgado hasta que alcance el pH 6.5, es decir, a nivel del intestino delgado distal o más allá, donde la absorción de metformina es muy baja. Al contacto con el fluido del tracto gastrointestinal, la tableta se hincha y la metformina se libera a medida que el polímero se descompone gradualmente. En comparación con la metformina IR o la metformina XR, la biodisponibilidad de metformina DR es menor, aunque su eficacia para reducir la glucosa es similar, a pesar de la menor exposición sistémica. Una preparación de metformina de liberación retardada ya se evaluó clínicamente hace más de 40 años. Las concentraciones máximas de metformina en plasma se alcanzan más lentamente con la formulación XR comparada con la metformina IR convencional, aunque ambas brindan exposición sistémica a una dosis diaria total. El desarrollo de la metformina DR se basa en los hallazgos recientes de que la metformina puede ejercer su acción de disminución de la glucosa mediante la actuación en las células L intestinales del íleon, y no solo a través de la exposición sistémica^{102 103} Además, hay presente un aumento de la secreción de GLP-1, péptido YY, acción sobre los ácidos biliares y sobre el microbioma intestinal. Estos hallazgos están respaldados porque la administración de metformina intravenosa no tiene efectos agudos sobre la eliminación de glucosa o la producción de glucosa hepática en humanos. Además, metformina DR ha demostrado lograr una baja exposición plasmática que puede ser particularmente útil en pacientes con patologías que aumentan el riesgo de acidosis láctica; incluyendo insuficiencia renal, disfunción cardíaca, insuficiencia hepática o insuficiencia cardíaca^{104 105}

2.3 Farmacodinámica de la metformina

2.3.1. Mecanismos moleculares de acción a nivel mitocondrial

La metformina por su naturaleza hidrofílica aportada por la cadena lateral metilada no puede difundirse pasivamente a través de las membranas celulares y el transporte depende de la familia OCT para su captación en los hepatocitos. La cadena lateral hidrocarbonada no polar de las biguanidinas será la que aporte la acción lipofílica de la molécula⁹⁹. La metformina una vez cargada positivamente en los hepatocitos es impulsada hacia la membrana de las mitocondrias. Además, la metformina se acumula dentro de las mitocondrias; a concentraciones hasta 1000 veces más altas que en el medio extracelular¹⁰⁶. La primera interacción de la molécula con las mitocondrias parece tener lugar entre la cadena lateral de hidrocarburo apolar de la metformina y los fosfolípidos hidrofóbicos de la membrana mitocondrial¹⁰⁷. En general, se acepta que el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial es uno de los objetivos principales de la metformina, dando lugar a una disminución de nicotinamida adenina dinucleótido hidroruro (NADH); con respuesta final de reducción de la producción de adenosina trifosfato (ATP), imitando así, una situación de ayuno. En condiciones fisiológicas, la oxidación del gliceraldehido 3P a 1,3 bifosfatoglicerato durante la glicolisis genera dos moléculas de NADH y dos moléculas de ATP. Tras la acción de la metformina hay un aumento de la producción de adenina monofosfato (AMP) y esto estimula la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) que es un denominado sensor de energía celular. Hay varias líneas de investigación independientes que concluyen que la metformina inhibe selectivamente la oxidación de los sustratos del complejo I, pero no de los sustratos II o IV¹⁰⁶¹⁰⁷¹⁰⁸. Secundariamente, existe una inhibición de la oxidación mitocondrial del glutamato y malato de manera más efectiva que a nivel del succinato, por lo que el succinato que es útil como sustrato para el complejo II podría eludir la inhibición realizada sobre el complejo I¹⁰⁹. Estos hallazgos se observaron por primera vez en hepatocitos de rata aislados, pero más tarde se obtuvieron resultados similares en numerosos modelos de células, incluidas células de hepatocitos humanos. Aunque sigue siendo controvertido porque sólo con dosis suprafisiológicas del fármaco se ha logrado replicar el bloqueo directo del complejo I mitocondrial, probablemente, aún se desconozcan mecanismos por los que metformina actúa a nivel de la cadena respiratoria mitocondrial. El pH elevado de la matriz mitocondrial podría transformar a metformina en un metabólico más desprotonado con una alta afinidad por los iones de cobre. Estos complejos de cobre tienen el potencial de interferir con las reacciones redox sensibles de la cadena respiratoria⁹⁵.

2.3.2 Mecanismos moleculares de acción dependientes de activación de AMPK

Como ya hemos comentado, previamente, la disminución en el estado de energía intracelular a nivel del hepatocito activará la proteína AMPK. A pesar de la importancia del AMPK, no se puede considerar un mecanismo molecular indispensable para que metformina ejerza su efecto reductor en la a

nivel de la glucosa. Hay estudios en modelos murinos donde se observa efectos metabólicos del fármaco con deficiencias del AMPK a nivel hepático¹¹⁰. El AMPK consiste en un complejo heterotrimérico que contiene un catalizador; una subunidad α y dos subunidades reguladoras β y γ . A su vez, cada subunidad tiene varias isoformas ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$) que están codificados por genes distintos, dando múltiples combinaciones de holoenzima con diferente distribución tisular y localización celular¹¹¹. La subunidad α contiene un residuo de treonina, Thr 172, cuya fosforilación por quinasas es necesaria y suficiente para que ocurra la activación de AMPK. La unión de AMP a la subunidad γ activa AMPK, por un mecanismo complejo de activación alostérica directa, tras lo cual, se produce la fosforilación del residuo Thr172 y se inhibe la desfosforilación por proteínas fosfatasas específicas¹¹².

Altas concentraciones de metformina (500 $\mu\text{mol/l}$) son necesarias para observar la activación de AMPK después de un contacto breve, es decir, inferior a 1 h de exposición al fármaco. Sin embargo, se observan cambios significativos en la activación de AMPK en los tejidos hepáticos si la incubación del tejido se produce en períodos tiempo más alargados. Estas concentraciones son más compatibles con las concentraciones del medicamento encontradas en la vena porta de los pacientes. La estimulación de AMPK aumenta también la translocación de transportadores de glucosa (GLUT) hacia la membrana celular, e intensifica el transporte de glucosa hacia la célula¹⁰⁷

La metformina también puede activar AMPK por un mecanismo que involucra el lisosoma, en lugar de los cambios mediados por la ratio AMP: ATP. El andamio de la proteína AXIN juega un papel esencial en la activación de la AMPK inducida por la inanición de la glucosa y por exposición a bajas dosis de metformina. En la superficie del lisosoma se produce la co-translocación de la kinasa hepática B1(LKB1), en conjunto con la proteína andamio AXIN, que además se acopla al complejo lisosómico v-ATPasa-Ragulator¹¹³. Por otra parte, la activación de LKB1 por AMPK permite la inactivación del coactivador transcripcional regulado por CREB2 (CRTC2), el cual es clave para regular la expresión de genes que intervienen en la gluconeogénesis¹¹⁴.

2.3.3 Mecanismos moleculares de acción AMP dependientes

Se ha propuesto que metformina inhibe la producción de glucosa hepática por mecanismos que involucran la modulación de la energía celular. Metformina puede alterar la activación de la vía de la gluconeogénesis secundada por el incremento intracelular de los niveles de AMP. Más específicamente, en la vía de la gluconeogénesis, el AMP inhibe la fructosa 1,6 bifosfatasa de forma alostérica disminuyendo la conversión de fructosa-1,6-bifosfato a fructosa-6-fosfato, un precursor de la síntesis de glucosa. Por otro lado, tanto metformina y como su fármaco hermano, fenformina, actúan como antagonistas de la producción de glucagón, hormona contrarreguladora, debido al papel que ejerce AMP en la inhibición de adenilato ciclasa, enzima catalizadora del paso de ATP a AMPc. El bloqueo de adenilato ciclasa por presencia de AMP originará a su vez, una disminución de la activación de la proteína cinasa dependiente de AMPc, más conocida como vía de señalización de la proteína cinasa A (PKA). La reducción de la gluconeogénesis puede también ser secundada por disminución de la presencia de PKA, puesto que hay

enzimas esenciales en el proceso de la gluconeogénesis como son el 6-fosfofructo-2-quinasa, fructosa - 2,6-bifosfatasa 1, inositol -3-P o el receptor de CREB1 que precisan de PKA para su activación¹¹⁵.

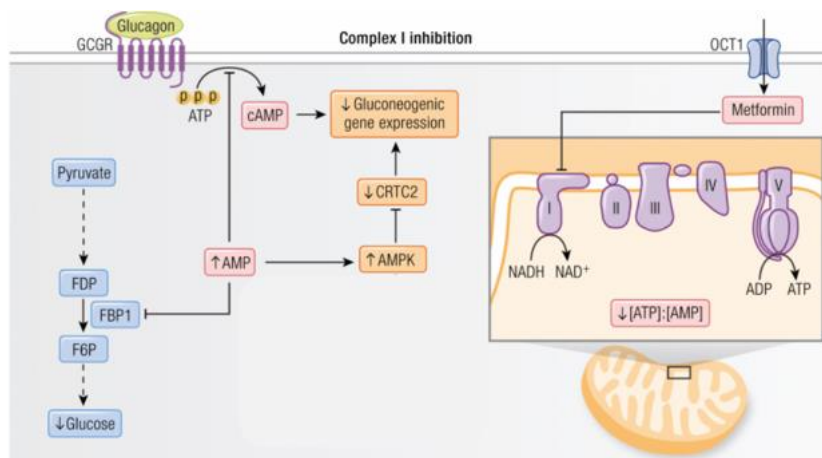


Figura 4. Los mecanismos moleculares mediados por inhibición del complejo I mitocondrial y la activación de las vías AMP dependientes. Adaptado de¹¹⁶

2.3.4 Mecanismos moleculares de acción por cambios en el estado redox

La lanzadera de glicerofosfato es uno de los dos sistemas existentes que llevan equivalentes reductores al citoplasma de la mitocondria para actuar en la reoxidación del complejo $\text{NAD}^+ : \text{NADH}$. El glicerofosfato deshidrogenasa (mGPD) es una enzima esencial en la función del transportador glicerofosfato, y, al inhibir esta enzima se desregula la función redox de la lanzadera glicerofosfato. Como resultado obtenemos un estado redox hepatocelular alterado, con conversión reducida de la producción de lactato y glicerol a glucosa. Más concretamente, la propia inhibición de mGPD dificulta la conversión de glicerol-3-fosfato a dihidroxiacetona fosfato, inhibiendo así la gluconeogénesis. Además, la disminución del nivel de NAD^+ (forma oxidada de NADH) genera un aumento del lactato intracelular, dado que se bloquea la transformación de lactato a piruvato (una reacción catalizada por la lactato deshidrogenasa)¹¹⁷. Sin embargo, la inhibición de la lanzadera de glicerofosfato por sí sola no puede ser suficiente para un impacto sostenido sobre la gluconeogénesis. En última instancia, un grupo de investigación publicó, recientemente, en 2019 que en cultivos celulares el bloqueo de la mGPD mediado por metformina no ejercía cambios en los niveles de producción de glucosa. Por otro lado, la acumulación de metformina a nivel de mitocondrial y su carga positiva permite la despolarización de la membrana mitocondrial e inhibición del transporte de electrones por la lanzadera malato-aspartato, dando lugar a un incremento de la ratio $\text{NADH} : \text{NAD}^+$. El bloqueo de la lanzadera malato-aspartato disminuye los niveles circulantes de glicerol-3-P, lo que conduce a su vez, al bloqueo de la neoglucoogénesis¹¹⁸. Por lo tanto, la reducción de la glucosa por la metformina depende de contribuciones relativas en la inhibición de mGPD, en cambio, el bloqueo en el complejo I de la cadena respiratoria, la ratio $\text{NADH} : \text{NAD}^+$ o la ratio $\text{AMP} : \text{ATP}$ parecen ser mecanismos más ampliamente involucrados

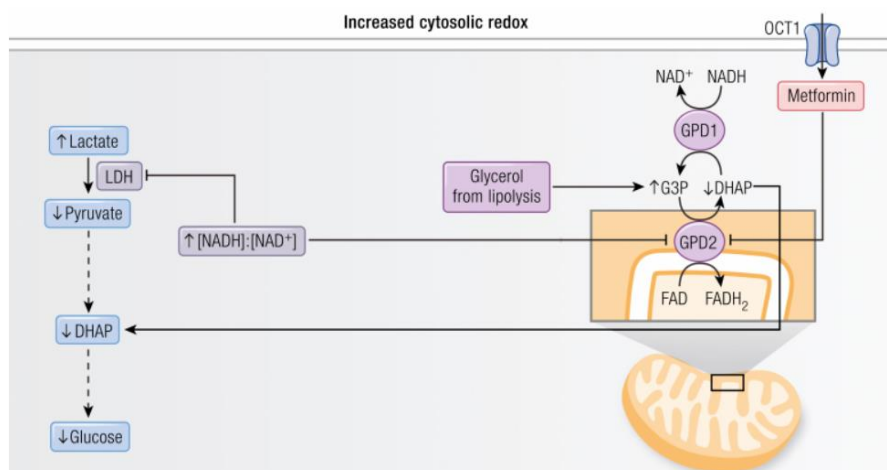


Figura 5. Inhibición de la glicerato deshidrogenasa mediada por metformina e incremento citosólico de la ratio NADH:NAD⁺. Adaptado de ¹¹⁶

2.3.5 Mecanismos de acción de la metformina a nivel de tejidos periféricos

En tejidos periféricos, especialmente en el músculo esquelético, donde se produce el 80% de la captación de glucosa, metformina mejora la captación y utilización tisular de la misma. A diferencia de las sulfonilureas, metformina disminuye la glucemia basal y postprandial, sin causar prácticamente hipoglucemia, y evita el hiperinsulinismo responsable del aumento de tejido adiposo y de peso a largo plazo. La glucosa en el músculo puede ser oxidada o utilizada para la formación de glucógeno, en cambio, a nivel del tejido adiposo la glucosa puede favorecer la lipogénesis ¹¹⁹. La activación crónica de AMPK en tejido muscular que genera metformina puede aumentar la hexoquinasa y la expresión de GLUT, imitando el efecto del entrenamiento muscular. En estudios realizados in vitro la activación continuada de AMPK dan lugar a un aumento de los receptores GLUT-1 y GLUT 4¹²⁰.

Metformina ejerce sobre los adipocitos humanos tanto in vitro o como in vivo la activación de la fosforilación de la AMPK, inhibiendo dentro de los adipocitos la estimulación beta-adrenérgica de la lipólisis. Adicionalmente, metformina induce la fosforilación de la lipasa hormono-dependiente dando lugar también a una disminución de la lipólisis. El AMPK inactiva a la enzima acetil CoA carboxilasa, disminuye la producción de malonil CoA, reduce los niveles circulantes de AGL y aumenta la presencia de la carnitina palmitoil transferasa 1 que facilita la entrada de AGL en la mitocondria y su beta oxidación. Este efecto ocurre tanto a nivel hepático como en músculo o en el tejido graso^{121 122}. De nuevo, a través de la activación de AMPK se logra suprimir la expresión de SREBP-1 (factor de transcripción vinculante del elemento regulador del estero-1), un factor clave en la transcripción lipogénica. En ratas tratadas con metformina la expresión hepática de ARNm y su proteína SREBP-1 (y otros lipogénicos) está más reducida¹²². Como resultado, metformina bloquea la producción de AGL, disminuye el nivel VLDL circulantes con reducción final de la hipertrigliceridemia entre el 10 y 20%. A todo ello, se le suman cambios en la concentración de colesterol total y LDL con una reducción total de un 5%.

2.4 Contraindicaciones y efectos adversos

Los efectos adversos gastrointestinales son los más frecuentes (1 de cada 10 pacientes), que pueden aparecer tras la toma de metformina, pero serán desarrollados más adelante en el capítulo 3. La metformina puede estar contraindicada en pacientes con **insuficiencia renal, insuficiencia hepática**, en pacientes muy ancianos y condiciones de disfunción circulatoria como la **insuficiencia cardiaca congestiva** debido a un mayor riesgo de acidosis láctica. Por otra parte, el uso a largo plazo de metformina puede estar asociado con la deficiencia bioquímica de vitamina B12, y la medición periódica de los niveles de vitamina B12 debe considerarse en pacientes tratados con metformina, especialmente en aquellos con anemia o neuropatía periférica¹²³.

Federacion Drug Alimentation (FDA) fue la primera institución que modificó el etiquetado de todos los medicamentos que contienen metformina en los EE. UU. para su uso en personas con insuficiencia renal crónica (ERC) leve o moderada. Los cambios permitieron un uso más más parecido a los estándares establecidos en el Reino Unido. Posteriormente, la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) también adoptó estas pautas de prescripción más liberales. Por tanto, tanto la ADA como la FDA recomienda que antes de comenzar con este fármaco se obtenga la tasa de filtración glomerular renal estimada (eGFR), ya que está contraindicada en pacientes con un eGFR por debajo de 30 ml / minuto / 1.73 m². Se debería reevaluar la función renal anualmente en todos los pacientes que toman metformina. En pacientes con mayor riesgo de desarrollar o progresar la insuficiencia renal crónica, como los ancianos, esta reevaluación deberá hacerse más frecuentemente. En pacientes que toman metformina cuya eGFR cae durante el seguimiento por debajo de 45 ml / minuto / 1.73 m² hay que evaluar los beneficios y riesgos de continuar el tratamiento. Las pautas actuales estipulan que debe iniciarse con precaución en las tasas estimadas eGFR de menos de 60 ml / minuto y su interrupción en todos los casos que presenten eGFR por debajo de 30 ml / minuto / 1.73 m²^{123,124}. En paciente muy ancianos, mayores de 80 años, existen datos escasos sobre eventos adversos, como molestias gastrointestinales o insuficiencia renal. Por lo que la evidencia de iniciar tratamiento en estos pacientes es baja. Otra de las dificultades para establecer el uso de la metformina en ERC es que no hay ensayos clínicos aleatorizados para evaluar la hipótesis específica de que la metformina es segura en ERC de leve a moderada. Los ensayos aleatorizados ayudarían a informar mejor las pautas basadas en evidencia. Sin embargo, dada la rareza de la acidosis láctica en el contexto de la terapia con metformina, se necesitaría examinar a cientos de miles de pacientes durante muchos años para demostrar la no inferioridad en comparación con otros agentes, lo cual es poco práctico^{80 125 126}.

ERC estadio	eGFRml/min por 1,73 m ²	Dosis máxima por día en mg	Otras recomendaciones
1	≥90	2550	
2	60<90	2550	
3A	45<60	2000	Evitar si la función renal se espera que pueda empeorar
3B	30<45	1000	No iniciar terapia en este estadio pero se puede continuar con el tratamiento si ya fue iniciado. Considerar más precauciones en el seguimiento
4	15<30	No usar	
5	<15	No usar	

Tabla 2. Dosis de metformina ajustada según estadio de ERC¹²⁶

Los pacientes con DM2 tienen un alto riesgo de desarrollar **insuficiencia cardíaca sistólica**. En una cohorte poblacional (base de datos de salud de Saskatchewan, Canadá) de pacientes con DM2 de reciente inicio, la incidencia fue del 6% durante 5,2 años¹²⁷. La farmacoterapia es particularmente difícil en este grupo de pacientes ya que la medicación antidiabética puede afectar el metabolismo de la energía del miocardio, lo que influye en los síntomas y el resultado clínico. Los datos del UKPDS mostraron que el riesgo de insuficiencia cardíaca no fue significativamente diferente entre los grupos tratados con metformina y sus controles. Además, un estudio prospectivo realizado en Dinamarca con 10.920 pacientes hospitalizados por primera vez por insuficiencia cardíaca entre 1997-2006 evaluó el tratamiento recibido: metformina, SU y/o insulina. Los resultados mostraron que el tratamiento con metformina se asocia con un bajo riesgo de mortalidad en pacientes diabéticos con insuficiencia cardíaca en comparación con el tratamiento con SU o insulina¹²⁸. En un revisión sistemática publicada en 2013 donde se incluían 9 estudios con un total de 34000 pacientes se confirmaba que el tratamiento con metformina reducía el riesgo de mortalidad por insuficiencia cardíaca, 23% versus 37% en el grupo control, aunque los controles eran principalmente pacientes con tratamiento con sulfonilureas ^{129 130}.

La **disfunción hepática**, particularmente la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), una afección que se caracteriza por el excesivo acúmulo de grasa en hígado, y la presencia de DM2 coexisten frecuentemente. NAFLD se puede definir como un espectro clínico que abarca desde la esteatosis hepática simple, esteatohepatitis no alcohólica hasta la cirrosis sin consumo significativo de alcohol. Entre el 49-62% de los pacientes con DM2 tienen NAFLD y el tratamiento de la DM2 en pacientes con disfunción hepática es complejo, ya que muchos antidiabéticos orales pueden estar contraindicados

por el aumento de riesgo de hipoglucemia. Hay solo unos pocos casos reportados de efectos secundarios hepatotóxicos para la metformina¹³¹, pero puede haber un mayor riesgo de desarrollar acidosis láctica en el contexto de la función hepática alterada. Por lo tanto, metformina está contraindicada para pacientes con enfermedad hepática avanzada. No se espera que metformina cause o exacerbe lesiones hepáticas, y probablemente, sea beneficioso su uso en pacientes con NAFLD. En un metaanálisis reciente, metformina presenta la capacidad de mejorar la sensibilidad a la insulina de pacientes con esteatosis hepática, pero no en pacientes con esteatohepatitis no alcohólica. No obstante, si se observó una mejora significativa en los niveles de transaminasas hepáticas de los pacientes con esteatohepatitis no alcohólica¹³². Por el contrario, el tratamiento con metformina no mejora significativamente las variables histológicas hepáticas para la esteatosis, inflamación y fibrosis. En definitiva, existe un número limitado de ensayos clínicos con datos heterogéneos para abordar la dosis óptima y duración de la terapia para lograr efectos sostenibles. La mayor parte de la información disponible sobre la disfunción hepática provienen de la acidosis láctica que han sido trasladados de informes de casos y mecanismos teóricos¹³³. La mayoría de esos pacientes con acidosis láctica tenían cirrosis hepática con algún grado de insuficiencia renal. La estrategia más prudente es identificar a los pacientes con cirrosis y controlar la función renal antes de iniciar la metformina. Si un paciente tiene una disfunción hepática estable y pocas comorbilidades, es probable que la metformina sea razonablemente segura, pero la dosis debe reducirse a 1500 mg al día como máximo y debe interrumpirse si empeora la función renal o hepática¹³³.

La **malabsorción de vitamina B12** fue relacionada por primera vez en pacientes diabéticos tratados con metformina en el año 1971. Desde entonces, la asociación entre el uso de metformina y niveles bajos de vitamina B12 han sido apoyados por diferentes niveles de evidencia. La incidencia en el déficit de la vitamina B12 aumenta en pacientes que han sido tratado con metformina durante ≥ 4 años y aquellos que han estado usando altas dosis de metformina. La deficiencia de vitamina B12 puede conducir a distintas manifestaciones clínicas. Entre ellas destaca el deterioro de la memoria, neuropatía periférica, demencia, delirio, degeneración combinada subaguda de la médula espinal, anemia megaloblástica y pancitopenia. La neuropatía en pacientes diabéticos secundaria a un déficit de vitamina B12 es una situación clínica que puede afectar alrededor del 30% de los pacientes diabéticos de más de 40 años de edad. Lamentablemente, los síntomas y los signos de neuropatía diabética y parestesias son algo similares; sensibilidad vibratoria reducida y disminución de la propiocepción (sentido de la vibración) relacionada con la deficiencia de vitamina B12. Independientemente de la asociación establecida entre la metformina y la deficiencia de vitamina B12, el verdadero problema aún no se ha cuantificado con precisión. Estudios previos han indicado que la prevalencia de la deficiencia de vitamina B12 oscila entre 5.8% y 52%. El criterio de diagnóstico del déficit de vitamina B12 es controvertido y no está firmemente determinado. Todavía no existe un consenso sobre qué biomarcadores son más indicativos de la deficiencia y cuál es el nivel de corte ideal. La mera medición del suero de los niveles de vitamina B12 no se considera suficiente para reflejar el estado metabólico de la vitamina. La naturaleza compleja y multipaso de la vitamina B12 dependiente de la absorción en el tracto gastrointestinal aumenta la posibilidad de malabsorción cuando el proceso es interrumpido en cualquier punto durante el curso. Entre

los mecanismos de acción relacionados con una baja absorción gastrointestinal de vitamina B12 destacan: aclorhidria, gastritis atrófica, gastrectomía, cirugía gástrica y, posiblemente, infección persistente por *Helicobacter Pylori*, pancreatitis, enfermedad de Chron y/o parasitosis. Por tanto, la causa principal de déficit de vitamina B12 es la malabsorción intestinal y, frecuentemente, los niveles se encuentran más reducidos en población anciana atribuyéndose tanto a una mala absorción crónica como a una baja ingesta dietética^{134 135 136}

2.4.1 Acidosis láctica

La acidosis láctica es una complicación infrecuente asociada al uso de la metformina y su fisiopatología viene derivada de la inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial, debido a un subyacente incremento de la lipólisis y una alta producción de lactato. Además, las biguanidas disminuyen la captación y utilización del lactato para la gluconeogénesis. Estas acciones pueden derivar en acidosis láctica: pH < 7,35, valores de lactato superiores a 4,5 meq/L y elevación del anión gap. Sin embargo, la incidencia de acidosis láctica con metformina es muy baja, alrededor de 3,3 casos / 100000 pacientes / año. Se han propuesto dos tipos diferentes de acidosis láctica, relacionadas con la terapia con metformina¹³⁷. En particular, acidosis láctica asociada a la metformina (MALA) es causada por la acumulación de metformina en presencia de factores precipitantes, tales como lesión renal o deshidratación; menos común es la acidosis láctica inducida por metformina (MILA), cuando la metformina parece ser la única causa de acidosis láctica sin patología aparente asociada y generalmente está relacionada con la intoxicación aguda. Se calcula que la acidosis láctica secundaria a sobredosis supone sólo un 16% de todos los casos registrados¹³⁸. Los factores de riesgo identificados para MALA incluyen: insuficiencia renal aguda, hipoxemia, sepsis, abuso de alcohol, insuficiencia hepática, administración de medio de contraste radiológico, infarto de miocardio y shock. Además, los medicamentos que interfieren con la autorregulación hemodinámica renal (inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina, bloqueadores de los receptores de la angiotensina y fármacos antiinflamatorios no esteroideos) y la depleción de volumen intravascular secundarios a pérdidas gastrointestinales están en íntima relación en la generación de insuficiencia renal aguda que precipite MALA. Las concentraciones plasmáticas de metformina son aproximadamente de dos a cuatro veces superiores en pacientes con DM2 en insuficiencia renal grave en comparación con sujetos sanos. Los pacientes con DM2 también presentan mayor riesgo de hiperlactatemia, que se atribuye a alteraciones en el potencial redox. La mortalidad en pacientes con MALA está entre 10.8% y 45% en la serie de casos más grande informada. Por lo tanto, se puede confirmar que MALA es con frecuencia fatal, dependiendo de un diagnóstico y tratamiento correcto^{126 138}.

3. Intolerancia gastrointestinal a metformina

3.1. Definición y características de intolerancia a metformina

Los eventos adversos gastrointestinales en los pacientes tratados con metformina en la mayoría de los casos no se presentarán o solo se observan temporalmente, en un grado moderado durante el período de titulación del fármaco. Los eventos adversos gastrointestinales que se encuentran típicamente con la terapia con metformina incluyen diarrea, náuseas, flatulencia, indigestión, vómitos y molestias abdominales. La diarrea es el síntoma más común, seguido de las náuseas. Las tasas de diarrea que conducen a la suspensión inmediata de metformina varían desde 1.2% al 5% de los pacientes, y puede depender de la dosis utilizada. La intolerancia a la metformina variará de intermitente a persistente y de moderada a grave. Se definió como la presencia de diarrea y/o dismotilidad gastrointestinal concomitante con la ingesta del medicamento que persiste después de la titulación de la metformina en las primeras semanas. La intolerancia se considera grave cuando, además, los efectos secundarios gastrointestinales persisten incluso con una dosis sustancialmente reducida ($\geq 50\%$) y la intensidad de los efectos gastrointestinales provoca la retirada de metformina. Tras la suspensión del fármaco se comprueba que desaparecieron todos los síntomas gastrointestinales^{102 139}.

Título	Población	Dosis	Ratio de diarrea	Discontinuación por diarrea	Ratio de náuseas	Discontinuación por náuseas
Efficacy of metformin in type II diabetes: results of a double-blind, placebo-controlled, dose response trial	DM2 controlada de forma subóptima con dieta o previamente tratada con sulfonureas (n=372)	0,5-2,5g/d	8%, 21%, 12%, 19%, 14% para 0,5g, 1g, 1,5 g, 2 g y 2,5 g / día respectivamente	0,4%, 3%, 3%, 5% para 0,5g, 1g, 1,5g, 2g, y 2,5 g / día respectivamente	7%, 10%, 8%, 1%, 12% por 0,5 g, 1g, 1,5 g, 2g y 2,5 g / día respectivamente	0,3%, 3%, 1%, 5% por 0,5g, 1g, 1,5g, 2g y 2,5 g / día respectivamente
Glycemic durability of rosiglitazone, metformin or gluburide monotherapy	DM2 con terapia naive (n=1454)	1g dos veces al día	23,7%	No registrado	11,7%	No registrado
Efficacy, tolerability and safety of a novel once-daily extended-release metformin in patients with type 2 diabetes	Pacientes naive para el tratamiento (n=174)	1,5g dos veces al día	14,4%	1,2%	10,9%	1,7%
Effects of saxagliptin added to submaximal doses of metformin compared with uptitration of metformin in type 2 diabetes: the PROMP study	Tolerantes a la metformina (algunos con historia previa de intolerancia, n =139)	2,5g/d	12,2 %	No reportado	0,7%	No reportado

Tabla 3. Incidencia de los efectos adversos gastrointestinales recogidos en distintos estudios. Adaptado de ¹³⁹

En el año 2013 se publicó un estudio francés con la valoración fenotípica de los pacientes con DM2 e intolerancia gastrointestinal a metformina. En dicho trabajo se reclutaron a 83 sujetos a los que se le había suspendido metformina por intolerancia gastrointestinal, versus 332 controles tolerantes a la metformina; apareados por edad y género, con el objetivo de determinar los fenotipos cardiometabólicos. Los hallazgos principales del presente estudio fueron cuatro: la intolerancia gastrointestinal a la metformina se asoció con una menor prevalencia de ECV; un desequilibrio del grupo sanguíneo ABO (los casos de intolerantes tenían con mayor frecuencia grupo sanguíneo A y al subgrupo A Rh +), niveles más altos de ferritina y mayor población de zurdos (doble de población no diestra). Por otro lado, no hubo diferencias entre los grupos en cuanto a tabaquismo, duración de la diabetes, HbA1c, IMC, presión arterial, tamaño de la cintura, masa grasa, grasa visceral, esteatosis hepática, síndrome metabólico, eGFR, albuminuria, disfunción eréctil y microangiopatía¹⁴⁰

3.2. Mecanismos subyacentes que dan lugar a la intolerancia digestiva

Actualmente, aún se desconoce los mecanismos principales por los cuales sucede la intolerancia a la metformina, aunque si hay algunas hipótesis que orientan a su fisiopatología. Se considera que el intestino puede ser responsable de algunos de los efectos beneficiosos del fármaco, pero también causante de los efectos adversos gastrointestinales. Metformina ejerce modificaciones sobre la microbiana intestinal, cambios a nivel de la restitución de glucosa intestinal, efectos sobre el intercambio de las sales biliares y aumenta la concentración de los niveles de GLP-1¹⁰². La composición y la función del microbioma intestinal se modifica tras el tratamiento con metformina en pacientes con DM2¹⁴¹. La relación entre la metformina y el tracto gastrointestinal está siendo objeto de estudio de creciente interés¹⁴²¹⁴³. En el análisis metagenómico de pacientes con DM2 tratados con metformina se mostraron niveles aumentados de enterobacterias como *Escherichia*, *Shigella*, *Klebsiella* y *Salmonella*, y niveles disminuidos de *Clostridium* y *Eubacterium*. Curiosamente, también hubo una correlación significativa de los niveles de *E. coli* y de los niveles de GLP-1.

El suministro de polímeros de glucosa o la glucosa no absorbida que llega al colon proporciona un sustrato para las bacterias productoras de lactato; tales como especies de *Lactobacillus*, *Streptococcus bovis*, *Bifidobacterium spp* y *Eubacterium spp*. Las bacterias que producen ácido d-láctico y l-láctico generan acumulación de ácido láctico colónico que podría contribuir a la presencia de algunos o a todos los efectos secundarios gastrointestinales observados en los usuarios de metformina, especialmente aquellos que consumen dietas intensificadas con almidón y azúcares¹⁴⁴.

El grupo de *Dujic et al*⁹⁹¹⁴⁵ propuso que una reducción de la función de OCT1 podría incrementar el riesgo de intolerancia gastrointestinal en los pacientes tratados con metformina. Los datos analizados fueron extraídos de la base de datos Genetics of Diabetes Audit and Research Tayside Study (GoDARTS). El recurso GoDARTS incluye ADN de más 10,000 pacientes con DM2 desde octubre de 1997 para realizar estudios genéticos. Se han comparado diferentes fenotipos de variantes de OCT1 de función reducida y la prescripción concomitante de fármacos que inhiben el transporte de OCT1.

Concretamente, se compararon un total de 251 pacientes intolerantes gastrointestinales con 1915 pacientes tolerantes a metformina y los resultados mostraron que las mujeres y las personas mayores eran más propensas a ser intolerantes a la metformina. El uso concomitante de medicamentos conocidos por inhibir la actividad OCT1 incrementaba el riesgo de presencia de intolerancia gastrointestinal a metformina en un 63%. En el caso de mutaciones en OCT1 con función reducida en uno o dos alelos comparado con la presencia de ningún alelo afecto incrementaba el riesgo de presentar síntomas gastrointestinales en más del doble. Los individuos con dos alelos OCT1 de función reducida que fueron además tratados con inhibidores de OCT1 tenían cuatro veces más probabilidades de desarrollar intolerancia (OR = 4.13, IC 95% 2.09-8.16, $p < 0.001$). Si se confirma por un ensayo clínico, esto podría informar la aplicación clínica de metformina de tal manera que, por ejemplo, los fármacos que se sabe que interactúan con OCT1 podrían ser reemplazados por alternativas, permitiendo una tolerancia mejorada a metformina y permitiendo una dosificación óptima de metformina¹⁴⁵.

Metformina induce cambios en la secreción de serotonina en las células enterocromafines, esto ha incentivado el estudio del genotipo del transportador de recaptación de serotonina (SERT) como agente involucrado en la absorción intestinal de metformina y en la fisiología gastrointestinal. Además, sería interesante explorar el efecto del tratamiento concomitante de los inhibidores de la recaptación de la serotonina (ISRS) sobre la intolerancia a la metformina y su interacción con SERT. No obstante, los ISRS también podrían actuar como inhibidores de OCT1, ya que el citalopram ya se ha incluido como fármaco que inhibe OCT1¹⁴⁶. Previamente, ya se había valorado el efecto antagónico de ondansertrón en los receptores de serotonina con la hipótesis de que podría ser un atenuador de los efectos adversos gastrointestinales de metformina. Los resultados en este trabajo no mostraron diferencias significativas en la frecuencia y ni en la intensidad de los síntomas digestivos secundarios al tratamiento con metformina¹⁴⁷.

Hay otros factores que también modifican la tolerancia gastrointestinal a la metformina en DM2, entre ellos la cirugía bariátrica, la gastritis crónica asintomática o la infección por *Helicobacter Pylori*¹³⁹. Más específicamente, en un trabajo realizado con el objetivo de valorar la farmacocinética de metformina se recogieron 16 pacientes sin diabetes (diabetes en remisión) tras bypass gástrico y 16 sujetos como controles, emparejados por el IMC y el sexo. En ambos grupos se les administraba metformina por vía oral dosificada en dos comprimidos de 500 mg con la hipótesis de que el grupo con el antecedente de bypass gástrico reduciría aún más la absorción y la biodisponibilidad de la metformina que el grupo control. Durante la administración del fármaco se monitorizaron los niveles plasmáticos de metformina, glucosa y se muestrearon a 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8 y 24 h. Sin embargo, los resultados arrojados por este trabajo no fueron los esperados, puesto que los sujetos con el antecedente de bypass gástrico mostraron un AUC en 21% superior y la biodisponibilidad fue superior en un 50%, además de una mayor frecuencia de síntomas gastrointestinales. Por lo tanto, existen factores distintos a la disminución de la longitud del intestino delgado que influyen en la absorción total de metformina y en su tolerabilidad gastrointestinal. Esto tiene implicaciones potenciales para la dosificación de metformina después del bypass y para medicamentos con propiedades farmacológicas similares¹⁴⁸.

Con el objetivo de encontrar hipótesis más robustas sobre las causas de la intolerancia a metformina se publicó un estudio sobre la farmacocinética de metformina en 2018 y no hubo diferencias significativas en la absorción, distribución o eliminación del fármaco entre la población con tolerancia digestiva respecto a los intolerantes a metformina¹⁴⁹

3.3. Estrategias terapéuticas para corrección de la intolerancia digestiva

Una de las estrategias más usadas es la administración paulatina del fármaco y se realiza con el objetivo de evitar la suspensión prematura de metformina por eventos gastrointestinales. Sin embargo, en caso de efectos adversos gastrointestinales conocidos y detectados previamente se deberá iniciar metformina con una dosis más baja y adoptar un incremento más lento y progresivo hasta la dosis diaria deseada, siempre que sea posible. Además, algunos pacientes pueden mejorar con una combinación de dosis fija de metformina y sitagliptina en lugar del tratamiento con la monoterapia, aunque el mecanismo subyacente sigue siendo desconocido. El dolor abdominal (1.1 y 3.9%, $p = 0.002$) y la diarrea (12.0 y 16.6%, $p = 0.021$) ocurrieron significativamente menos frecuentemente con sitagliptina combinada con metformina versus monoterapia con metformina; la incidencia de náuseas y vómitos fue similar en ambos grupos^{82 139 150}. Por otro lado, según la experiencia clínica conocida la administración de metformina mezclada con las comidas o al final del desayuno o la cena puede aliviar algunos de los eventos gastrointestinales. De momento, sin embargo, existen pocos datos con suficiente evidencia para esta recomendación, dado que la mayoría de los ensayos clínicos con metformina incluyeron la administración del fármaco durante las comidas como parte de sus protocolos.

El uso de metformina XR ha demostrado ser tan eficaz como la metformina de liberación inmediata, pero sin la carga de tener que repartir el tratamiento entre dos a tres veces al día. Además, reporta tasas más bajas de eventos gastrointestinales y menores tasas de abandono debido a eventos gastrointestinales. Aproximadamente, produce la mitad de incidencia de diarrea o cualquier efecto adverso gastrointestinal tras el cambio de metformina de liberación inmediata a metformina XR. La adherencia en pacientes del paso de metformina de liberación inmediata a metformina XR mejoró significativamente (de 62% a 81%), lo cual se espera dado no solo por su formulación de una vez al día sino también por una mejor tolerancia gastrointestinal. Cuando el costo no es un problema, iniciar a los pacientes con metformina XR puede evitar la necesidad de cambiar y potencialmente evitar la interrupción como resultado de los eventos gastrointestinales^{139 151}. En el caso de la metformina DR podría haber mejoría de los efectos adversos a nivel gastrointestinal según los datos recogidos en el ensayo realizado por el grupo de *Fronzo et al*¹⁰⁵. El objetivo del estudio era evaluar los beneficios en la glucemia plasmática con la administración de metformina DR, pero se recogieron también la incidencia de efectos adversos asociados a la toma de metformina. La frecuencia de efectos adversos gastrointestinales recogidos durante el ensayo, fueron de un 7.3% en los pacientes con placebo, 12.8% en aquellos que recibieron 600 mg/d de metformina DR, 17.5% para los que recibieron 800 mg/d de metformina DR o 1000 mg/d de metformina XR, 15.0% si recibían 1000 mg/d de metformina DR y hasta un 12.5% recibiendo

2000 mg/d de metformina XR. No obstante, estas tasas bajas deben interpretarse con precaución, dado que el 88% de los pacientes habían recibido metformina antes de la inclusión en el estudio, lo que hace probable que ya fueran tolerantes a la metformina¹⁰⁵

Otro estudio de intervención desarrolló un modulador del microbioma para administrarlo en combinación con metformina con el objetivo de mitigar los efectos adversos gastrointestinales. El modulador contenía ingredientes alimentarios purificados con el objetivo de estimular microbiota comensal productora de ácidos grasos de cadena corta (SCFA). Los resultados tras la toma del modulador de microbiota en 10 sujetos con DM2 que habían experimentado efectos adversos gastrointestinales dio como lugar mejoría de los efectos secundarios gastrointestinales en comparación con placebo. Algunos sujetos solo pudieron aumentar a 500 mg de metformina con la toma el modulador del microbioma. Finalmente, se observaron niveles significativamente menores de glucosa en ayunas cuando los sujetos tomaron la combinación de metformina con el modular del microbioma. Los cambios producidos por el modulador microbioma son mediados por el retardo en la absorción de pequeñas moléculas al aumentar la viscosidad del contenido luminal, mejoría de la protección de la barrera mucosa, secuestro de ácidos biliares y la capacidad de ejercer como un potente antioxidante para combatir la creciente demanda de estrés oxidativo. Igualmente, se necesitan ensayos más grandes para replicar y expandir estos hallazgos puesto que estamos ante una población muy pequeña¹⁴⁴.

4. Microbiota intestinal

4.1. Definición. Evolución y desarrollo de la Microbiota Intestinal

El término “microbiota” hace referencia al complejo ecosistema microbiano del tracto gastrointestinal (TGI). Se incluyen especies nativas que colonizan permanentemente el TGI y una serie de microorganismos que transitan temporalmente por el tubo digestivo¹⁵²¹⁵³. La microbiota intestinal es heterogénea, compuesta mayoritariamente por bacterias, una minoría de virus, hongos y células eucariotas. El número de células microbianas en el lumen es 10 veces mayor que las células eucariotas del organismo lo que representaría alrededor de 1 kg del peso corporal. El conjunto de genes microbianos es 100 veces mayor que el genoma humano (aproximadamente 3 millones mientras que el genoma humano supone unos 27000 genes). Más del 99% de los genes proceden de bacterias y toda la cohorte alberga más 2000 especies bacterianas.

La adquisición de microbiota intestinal en el momento del nacimiento transmitida a partir de la microbiota de la madre puede considerarse como una herencia genómica en paralelo¹⁵⁴¹⁵⁵. El microbioma intestinal se considerada como un órgano virtual exteriorizado, metabólicamente adaptable, flexible y rápidamente renovable, que contribuye al metabolismo y tiene un papel importante en la obtención de energía a partir de la dieta

Inicialmente, se había defendido que la adquisición de microbiota intestinal aparece en el momento del nacimiento y se va modificando a lo largo de la vida del individuo. En líneas generales se

cree que el desarrollo de microbiota comienza desde el nacimiento, aunque este dogma se cuestiona por un número limitado de estudios en los que se detectaron bacterias en la placenta de la madre. Después del nacimiento el recién nacido se expone a una gran cantidad de microorganismos y la madre representa el factor externo más influyente para el desarrollo del microbioma del bebé, debido tanto a los contactos íntimos durante el parto como a la alimentación temprana¹⁵⁶. Se evidencian similitudes en microbiota vaginal materna respecto al microbiota neonatal, aunque aún se desconoce la importancia relativa del modo de administración de microbiota. Los recién nacidos por vía vaginal adquirieron comunidades bacterianas dominadas por *Lactobacillus*, *Prevotella* o *Sneathia spp.*, mientras que los recién nacidos por cesárea presentan comunidades bacterianas similares a las encontradas en la superficie de la piel, tales como *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, y *Propionibacterium spp*¹⁵⁷. La edad gestacional induce modificaciones en microbiota intestinal debido a que los recién nacidos prematuros hospitalizados presentan diferencias taxonómicas sobre los recién nacidos sanos y a término. Los bebés prematuros muestran una baja diversidad con una mayor colonización de especies potencialmente patógenas, bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* del filo Proteobacteria y niveles reducidos de anaerobios estrictos como *Bifidobacterium*, *Bacteroides* y *Atopobium*¹⁵⁸

El microbioma intestinal humano ha evolucionado juntamente con su huésped durante milenios. La constitución de microbiota intestinal se ve afectada por multitud de variables como son: tipo de parto (natural o cesárea), tipo de alimentación (leche materna o artificial), factores medioambientales, culturales y geográficos, fármacos, entorno familiar, etc.¹⁵⁴.

La lactancia natural es uno de los factores clave en el desarrollo de microbiota intestinal del neonato. Los siguientes grandes cambios en la composición de microbiota intestinal se producen tras la introducción de la alimentación sólida y el destete. Además, es en estos primeros meses donde se establecen las primeras y más importantes interacciones de la microbiota con el sistema inmune¹⁵⁹. Después de este periodo inicial, microbiota intestinal alcanza cierta estabilidad que se mantiene más o menos constante a lo largo de la vida. Entre las poblaciones microbianas encontradas durante el primer mes, *Bifidobacterium* y *Escherichia coli* (*E. coli*) son las bacterias predominantes, seguidas por *Lactobacillus*, *Bacteroides* y bacterias Gram-positivas, todas ellas en las mismas proporciones. El fuerte predominio de Bifidobacterias en heces de lactantes alimentados con leche materna es debido tanto al inóculo constante de los mismos a través de la lactancia natural, como a la presencia de diferentes componentes de la leche materna¹⁵⁶¹⁶⁰. Después del primer año de vida, *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Akkermansia muciniphila*, *Bacteroides*, *Veillonella* y *Clostridium cococoides spp* aumentan en número, mientras que las *Bifidobacterias* y *E. coli* disminuyen. La diversidad de microbiota intestinal aumenta con la edad adulta hasta que se convierte en una composición estable. Aproximadamente a los tres años de vida la composición y diversidad es muy parecida a la que presentará hasta la vejez, cuando de nuevo se reduce esta estabilidad. Las personas mayores de 70 años presentan cambios en la composición de microbiota intestinal que pueden ser secundarios a cambios en la inmunidad, hábitos alimenticios y a la exposición crónica a fármacos. Entre los cambios más relevantes que suceden en la vejez destaca la disminución de *Bifidobacterium spp* o *Faecalibacterium prausnitzii*, que presenta un papel relevante en la

estimulación del sistema inmunológico y procesos metabólicos, o aumento del género *Clostridium* y del filo Proteobacteria^{157 160}.

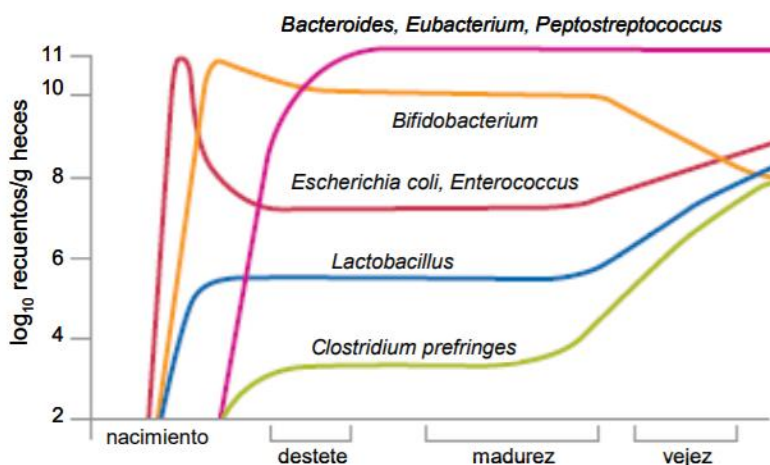


Figura 6. Cambios que sufre microbiota según la edad. Tomada de¹⁶¹

4.2. Composición y análisis de la microbiota intestinal

El componente bacteriano de microbiota ha sido tema de estudio intensivo en los últimos años, conducido por proyectos a gran escala como el Proyecto del Microbioma Humano (HMP) y el MetaHIT que se desarrolló a finales de 2007. Se trata de una extensión conceptual y experimental del proyecto del genoma humano. El HMP no es un proyecto único, sino más bien un resumen de múltiples proyectos que se lanzaron simultáneamente en diversas áreas del mundo, incluido EE. UU, la Unión Europea y Asia¹⁵³¹⁶²¹⁶³.

El desarrollo de las nuevas técnicas de secuenciación masiva del ADN y los avances bioinformáticos han llevado a realizar estudios extensos de las comunidades microbianas. La mayoría de los estudios realizados en microbiota humana se han basado en análisis de perfiles microbianos mediante genes de ARNr 16S de bacterias que residen en nuestra piel, boca, esófago, estómago, colon y vagina. El gen de ARNr 16S abarca nueve regiones variables diferentes, es decir, V1 a V9, cada una flanqueada por secuencias de ADN altamente conservadas que son adecuadas para la unión del cebador de Polimerasa en cadena (PCR). Inicialmente, para minimizar los riesgos de error del secuenciador en la secuenciación dirigida se desarrollaron enfoques de agrupación. Los enfoques de agrupamiento se basan en la idea de que los organismos relacionados o similares tendrán secuencias de genes diana similares y los errores de secuenciación tendrán una contribución mínima. Así pues, la secuencia de consenso para estos grupos se la denominó Unidades Taxonómicas Operativas (OTU). La información genética obtenida del microbioma se agrupa según el porcentaje de semejanza de sus ARNr 16S. En caso de existir una semejanza en el ARNr 16S del 95% se habla de género, y cuando la semejanza es del 97%, se habla de especie. En la búsqueda de minimizar los errores de la secuenciación aparecieron las Variante de Secuencia de Amplicón (ASV) que

van en la dirección opuesta a las OTUs. El ASV comenzará determinando qué secuencias exactas son leídas y cuántas veces son repetidas. Estos datos se combinan con un modelo de error para la ejecución de secuenciación, lo que permite la comparación de lecturas similares para determinar la probabilidad de que una lectura dada a una frecuencia determinada no se deba a un error del secuenciador. Los enfoques de ASV pueden proporcionar una ventaja significativa para una identificación más precisa y generan una imagen más detallada de la diversidad dentro de una muestra.

Se han descrito varios sistemas de clasificación de los reinos biológicos, pero el más utilizado es el introducido por *Woese et al.* Con el término dominio para sustituir al de reino como orden taxonómico superior, dividiendo a todos los seres vivos en Bacteria, Archaea y Eukarya¹⁶⁴. La gran mayoría de los 10-100 billones de bacterias que residen en el TGI humano viven en el colon. Más del 90% de todos los tipos filogenéticos bacterianos pertenecen a solo a dos de los doce filos bacterianos conocidos en los seres humanos, Bacteroidetes y Firmicutes, los siguientes filos más comunes son Actinobacteria, Proteobacteria y Verrucomicrobia.

Los Firmicutes son el filo más abundante y suponen un 60% de la proporción de bacterias e incluye alrededor de 200 géneros, los más representativos son: *Mycoplasma*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Faecalibacterium*, *Blautia* y *Ruminococcus*. El filo Bacteroidetes componen entre el 20-30 % de las bacterias donde destacan los géneros *Bacteroides*, *Prevotella* y *Xylanibacter* y en tercer lugar, el filo Actinobacteria, principalmente, representado por el género destacado *Bifidobacterium* comprenden el 10% de microbiota intestinal. En menor medida, se localiza el filo Proteobacterias caracterizados con géneros como *Escherichia* y la familia *Enterobacteriaceae*¹⁵³.

La composición de microbiota varía a lo largo del TGI en sus diferentes porciones y aumenta en cantidad y complejidad a medida que avanzamos por el TGI. Los continuos cambios en las poblaciones bacterianas son reflejo de un mecanismo de adaptación. El pH en la boca es casi neutro y la saliva contiene enzimas que inhiben el crecimiento bacteriano, mientras que el estómago es extremadamente ácido (pH 2). El pH aumenta gradualmente en el intestino delgado y el colon (pH 4-5 y 7 respectivamente). En el estómago y el intestino delgado del tracto digestivo superior, habitan abundantes especies aeróbicas y anaeróbicas facultativas, mientras que en el tracto gastrointestinal inferior residen especies anaeróbicas¹⁶⁵. En el estómago, como consecuencia de su pH ácido, se suponía que tenían una carga bacteriana limitada, sin embargo, se ha demostrado la existencia de una diversa comunidad bacteriana con más de 120 filotipos, siendo los más frecuentes Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes y Fusobacteria¹⁶⁵. En esófago los grupos más frecuentemente encontrados pertenecen a los géneros *Streptococcus*, *Prevotella* y *Veillonella*¹⁶⁶. Hay pocos estudios sobre microbiota del intestino delgado, debido a que se trata de una zona de difícil acceso para la toma de muestras. La mayoría de los estudios obtenidos a partir de muestras del lumen o de la mucosa del duodeno han determinado la presencia de bajas concentraciones de microorganismos, como consecuencia de su pH ácido, los movimientos peristálticos, y la secreción de jugos pancreáticos y biliares. Las especies aisladas más numerosas son ácido-tolerantes, principalmente *Lactobacillus* y *Streptococcus*, Sin embargo, aunque en menor medida se han visualizado los géneros *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Veillonella*, *Staphylococcus*,

enterobacterias y 76 levaduras¹⁶⁷.

En el colon existe un ambiente muy reductor y desprovisto de oxígeno por lo que la mayoría de las poblaciones son anaerobias estrictas y constituyen el microbioma dominante. El género *Bacteroides* es uno de los más abundantes seguidos de otros microorganismos Gram-positivos no esporulados pertenecientes a los géneros *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Peptostreptococcus* y *Ruminococcus*. Los bacilos Grampositivos esporulados están representados esencialmente por los *Clostridium*. En concentraciones inferiores aparecen poblaciones de bacterias anaerobias facultativas como enterobacterias, enterococos, lactobacillus y estreptococos¹⁶⁸. Las especies fúngicas asociadas a humanos incluyen *Saccharomyces*, *Candida* y *Cladosporium*, y varias cepas de baja abundancia. *M. smithii*, *Saccharomyces* y *Candida* se encontraron frecuentemente juntas en individuos que tenían dietas ricas en carbohidratos¹⁵³.

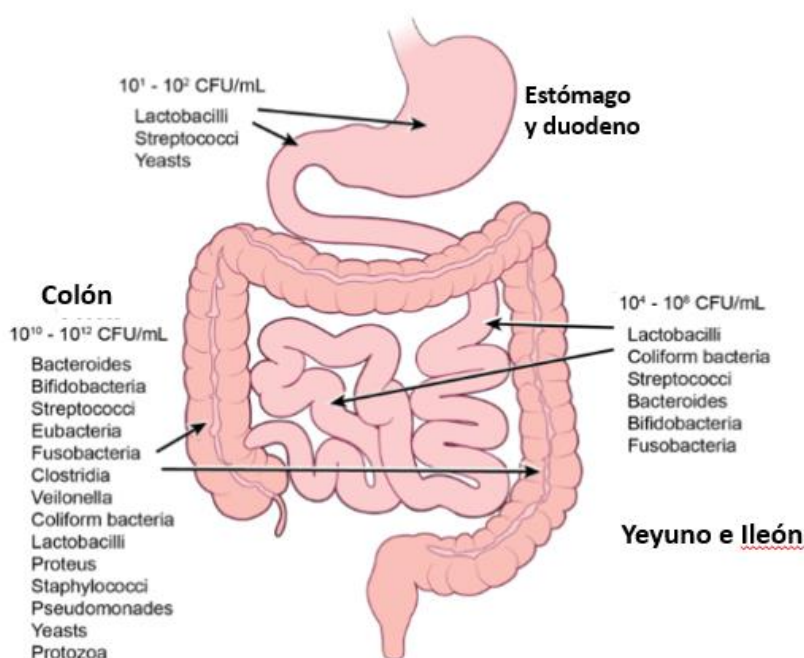


Figura 7. Microorganismos a través de TGI y su concentración. Adaptado de ¹⁶⁹

La composición de microbiota intestinal se está estudiando principalmente a partir de la observación de los microorganismos presentes en muestras de heces, debido, básicamente, a su facilidad de recolección. No obstante, cabe destacar que varios estudios demuestran que la microbiota presente en heces no es exactamente igual a la presente en el interior del intestino¹⁷⁰.

<i>Grupo microbiano</i>	<i>Número (ufc/g)</i>
<i>Bacteroides</i>	10^9-10^{12}
<i>Bifidobacterias</i>	10^9-10^{11}
<i>Eubacterias</i>	10^9-10^{11}
<i>Peptoestreptococos</i>	10^9-10^{11}
<i>Peptococos</i>	10^9-10^{11}
<i>Ruminococos</i>	10^5-10^{11}
<i>Fusobacterias</i>	10^6-10^{10}
<i>Clostridios</i>	10^6-10^9
<i>Lactobacilos</i>	10^5-10^8
<i>Enterobacterias</i>	10^5-10^8
<i>Enterococos</i>	10^5-10^7
<i>Streptococos</i>	10^3-10^5
<i>Levaduras</i>	10^2-10^5
<i>Estafilococos</i>	$0-10^4$

Tabla 4. Microorganismos copilados en heces humanas y su concentración que representan un reflejo de microbiota del colon. Adaptado de¹⁷¹

4.3. Factores modificadores de la microbiota intestinal

La diversidad y composición de microbiota intestinal son dinámicas y no sólo dependerán del estado físico del huésped, sino también están directamente impactados por los factores ambientales como la dieta, el uso de antibióticos y el estilo de vida. Estos factores ambientales pueden modificar adversamente el ecosistema intestinal, dando lugar a la disbiosis intestinal que se asocia frecuentemente con una mayor susceptibilidad a las infecciones y a enfermedades no transmisibles como la obesidad, síndrome metabólico, obesidad, DM2, alergias y otras enfermedades inflamatorias¹⁵⁴.

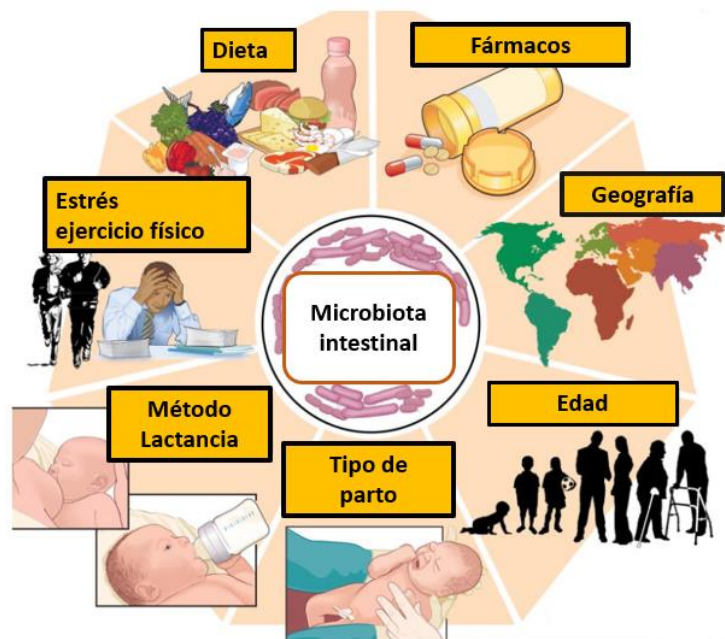


Figura 6. Factores que impactan en la microbiota intestinal. Adaptado de¹⁶⁹

4.3.1. Dieta y microbiota intestinal

Los cambios en la dieta podrían explicar el 57% de la variación estructural total en microbiota intestinal, mientras que los cambios en la genética representaron no más del 12%. Esto indica que la dieta tiene un papel dominante en la conformación de microbiota intestinal y los nutrientes no sólo son esenciales para la salud humana, sino también para la salud de microbiota intestinal. El cambio de poblaciones bacterianas claves transforma el microbiota intestinal saludable en una entidad inductora de enfermedades. La dieta "occidental" es rica en azúcares y en grasas saturadas y promueve la disbiosis intestinal que afecta tanto el metabolismo del tracto gastrointestinal del huésped como a la homeostasis del sistema inmune¹⁷². En los microbiomas intestinales ancestrales se caracterizaban por presentar una alta presencia de bacterias pertenecientes al género *Prevotella*. Actualmente, y, sobre todo, en poblaciones urbanas industrializadas se evidencia una menor riqueza microbiana en comparación con las personas que viven en entornos más rurales, siendo los géneros bacterianos *Bacteroides*, *Bilophila*, *Allistipes* los más predominantes entre los microbiomas intestinales urbano-industriales. Los componentes de la dieta más influyentes en la constitución de microbiota intestinal son la fibra, las grasas, proteínas, polifenoles y micronutrientes metabolizados¹⁷³. Las dietas con alto consumo de fibra dietética favorecen el incremento de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y *Ruminococcus*, además de especies concretas que estarían ampliamente representadas en la microbiota intestinal como *F. prausnitzii*, *E. rectale* y *C. coccoides*^{174 175}. En los sujetos que siguen una dieta alta en grasas está presente una disminución en el género *Lactobacillus* y un incremento en las poblaciones microbianas que secretan productos proinflamatorios con alteración de la barrera intestinal, tales como *Staphylococcus*, *E. coli* y

Enterobacterias. Como resultado, la disbiosis intestinal favorece un incremento de la endotoxemia sistémica e inflamación asociándose a balances energéticos positivos, RI y obesidad¹⁷⁶. Aunque existe escasez de datos sobre patrones dietéticos vegetarianos y microbiota intestinal, en individuos que sigue dietas ovo-lacto-vegetarianas como los veganos se han observado cambios globales en sus poblaciones bacterianas con niveles disminuidos de los géneros *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Enterobacterias* y la especie *E. coli*. Inicialmente, el consorcio MetaHIT propuso una clasificación de los sujetos en función de microbiota intestinal predominante, con objetivo de clasificar a los sujetos humanos de acuerdo con su microbiota y patrón dietético. Así pues, se desarrollaron los conceptos de enterotipos que consta de tres grupos diferentes según los géneros dominantes: *Bacteroides* (enterotipo I), *Prevotella* (enterotipo II) y *Ruminococcus* (enterotipo III). El enterotipo *Bacteroides* se asociaba con una dieta occidental alta en proteínas y grasas, mientras que el enterotipo *Prevotella* se asociaba a consumo de fibra vegetal. Aunque esta clasificación fue controvertida y no está aceptada globalmente, probablemente, es más realista pensar en términos de enterotipos discretos o de espectros continuos de composición microbiana^{177 178}.

El microbioma puede exhibir efectos beneficiosos sobre el organismo huésped, ya que desempeña un papel esencial en la síntesis de vitaminas como biotina, tiamina, cobalamina, riboflavina, nicotina y ácidos pantoténicos o vitamina K. Por otro lado, los polifenoles dietéticos que son compuestos naturales que se encuentra mayormente en plantas, incluyendo alimentos como frutas, verduras, cereales, té, café y vino contribuyen al mantenimiento de la salud del intestino mediante la modulación del equilibrio microbiano intestinal ejerciendo funciones prebióticas. Específicamente, *Clostridium* y *Eubacterium* son los principales géneros que participan en el metabolismo de muchos compuestos fenólicos¹⁷⁹. El consumo de aceite de pescado aumenta la presencia de *Akkermansia*, que está asociado con mejora del metabolismo lipídico e hidrocarbonado. *Akkermansia muciniphila* es una de las especies únicas y más abundantes en microbiota intestinal humana. Se trata de bacterias gramnegativas con actividad mucolítica, es decir, que utilizan mucina, y se relacionan inversamente con la obesidad, la diabetes y la enfermedad cardiovascular. La abundancia de *Akkermansia* disminuye en los adultos mayores, aunque el significado de este hallazgo no está claro¹⁸⁰.

Los beneficios potenciales de la suplementación prebiótica, especialmente, mediante la adición de polisacáridos derivados de plantas es uno de los pilares del tratamiento dirigido a la modificación del microbioma intestinal. Los prebióticos más ampliamente conocidos son la inulina, polisacáridos sin almidón encontrados en algunos granos de cereal, algas marinas, disacáridos, polisacáridos e incluso fructooligosacáridos y galactooligosacáridos. Los prebióticos son fermentados por bacterias del colon, generando productos finales tales como ácidos grasos de cadena corta (SCFA) que proporcionan nutrientes esenciales para el epitelio entérico. Los probióticos son formulaciones de organismos vivos que confieren efectos beneficiosos al destinatario cuando se entregan en cantidades adecuadas. Los organismos probióticos más comúnmente utilizados incluyen *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Otras bacterias que también son utilizadas incluyen *Bacillus* y *Streptococcus* y levaduras como *Saccharomyces boulardii*¹⁸¹.

4.3.2. Edad y Microbiota intestinal

El microbioma intestinal muestra una amplia variación interindividual, pero su variación intraindividual es relativamente estable a lo largo del tiempo. Se podría considerar que existe un microbioma central funcional, proporcionado por abundantes taxones bacterianos que parece ser común independientemente del género, ubicación geográfica y edad de los individuos. Esta microbiota central incluye las familias *Bacteroidaceae*, *Ruminococcaceae* y *Lachnospiraceae*, las dos últimas de las cuales pertenecen al filo Firmicutes. Sin embargo, en edades avanzadas el microbioma intestinal tiende a presentar una disminución de su diversidad, así como a un aumento de enteropatógenos que pueden conducir a la inflamación crónica. Por ejemplo, el Parkinson y el Alzheimer, conforman enfermedades propias de la edad geriátrica, que manifiestan cambios en la conformación de microbiota intestinal. Además, la evidencia científica ha demostrado que las personas con puntuaciones más altas en escalas de fragilidad muestran una reducción significativa en las especies de lactobacilos en comparación con las personas ancianas que obtuvieron puntuaciones más bajas. Dos de las especies más abundantes descritas en pacientes con fragilidad son *Eubacterium dolichum* y *Eggerthella lenta*^{182 183}.

4.3.3. Antibióticos

El tratamiento con antibióticos altera drásticamente el equilibrio de microbiota intestinal tanto a corto como a largo plazo, incluyendo disminuciones en la riqueza y diversidad de la comunidad o el crecimiento de agentes patógenos como *Candida Albicans* o *Clostridium Difficile*. La alteración de la composición del microbioma depende de la clase de antibiótico, dosis, período de exposición, acción farmacológica y bacterias diana. Un estudio exploratorio en humanos demostró que la administración intravenosa de β -lactámicos afecta tanto a la ecología bacteriana como a la producción de metabolitos clave, acetilfosfato y acetil-CoA, los cuales son esenciales para las funciones celulares. Las alteraciones de la comunidad microbiana intestinal pueden provocar una desregulación de la homeostasis inmunitaria del huésped y una mayor susceptibilidad a la enfermedad¹⁸⁴. Entre los cambios más destacables se incluyen la pérdida de ligandos bacterianos que son reconocidos por el huésped, la pérdida de señales bacterianas específicas y las alteraciones en los metabolitos producidos por microbiota, como los SCFAs. El uso temprano de macrólidos en niños parece generar un perfil microbiano distinto, caracterizado por una pérdida de *Actinobacteriaceae* y un aumento de Bacteroidetes y Proteobacteria. Como resultado se favorece la resistencia bacteriana a antibióticos, disminución de las hidrolasas de sales biliares y una correlación positiva con la presencia de asma o IMC elevado durante la infancia¹⁸⁵.

4.3.4. Demográficos

La proporción de cada filo de microbiota intestinal humana cambia según la ubicación geográfica. Estos cambios se basan en factores atmosféricos, genéticos, dietéticos y relacionados con diferentes estilos de vida. La literatura actual ha demostrado que los Firmicutes son más predominantes entre los adultos de los países no industrializados, mientras que las poblaciones occidentalizadas parecen mostrar

mayores concentraciones de Bacteroidetes sobre Firmicutes¹⁸⁶. En un estudio realizado con el objetivo de comparar el microbioma intestinal de bebés de diferentes etnias, caucásica versus bebés de ascendencia del sur de Asia, mostraron cambios en el patrón de microbiota atribuibles a la etnia. Los bebés del sur de Asia presentaban una mayor abundancia de varios miembros de bacterias del ácido láctico, específicamente *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Streptococcus* y *Enterococcus*. Sin embargo, en comparaciones del microbioma intestinal de niños africanos versus europeos hay una mayor abundancia de los filos Actinobacteria o Bacteroidetes entre la etnia africana, además de aumento de los géneros bacterianos *Prevotella* y *Xylanibacter*, mediado principalmente por una dieta más rica en fibra y carbohidratos procedentes de vegetales¹⁸⁷.

En otro trabajo realizado en Holanda, con 2.084 sujetos de diferentes etnias, que convivían en el mismo entorno urbano demostró que las personas que vivían en la misma ciudad tenderían a compartir características similares de microbiota intestinal con otros sujetos de su propia etnia. Por lo cual, la etnia contribuyó a explicar diferencias interindividuales en la composición de microbiota intestinal definidas por tres polos principales: género *Prevotella* (marroquíes, turcos, ghaneses), género *Bacteroides* (surinameses africanos, surinameses del sur de Asia) y género *Clostridiales* (holandeses)¹⁸⁸.

4.3.5. Otros factores

El estrés se define como la respuesta total de un organismo a las demandas o presiones ambientales. Hay varios tipos diferentes de factores estresantes, como agudo o crónico, agudo sobre crónico o agudo repetitivo. Los factores estresantes psicológicos y físicos activan el eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA) y como resultado hay una serie de respuestas hormonales que darán lugar a la estimulación de la síntesis de glucocorticoides en la corteza suprarrenal. El TGI en conjunto con el microbioma intestinal son dos órganos sensibles al estrés y a los mediadores del estrés. Las bacterias responden a la liberación de mediadores neuroquímicos relacionados con el estrés por parte del huésped que pueden influir en la respuesta a una infección bacteriana. Además, las bacterias actúan como vehículos de suministro de compuestos neuroactivos como el ácido gamma butírico o el triptófano. En cambio, el ejercicio físico de alta intensidad se ha correlacionado con un aumento de la diversidad bacteriana y una disminución de los parámetros inflamatorios. Los taxones bacterianos más relacionados y conocidos con la respuesta a la actividad física en atletas son el aumento de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Akkermansia*.¹⁸⁶ Asimismo, existe una creciente evidencia científica de que los niveles de hormonas esteroides sexuales están asociados con modificaciones en el microbioma intestinal y, concretamente, al sexo varón se le atribuye una diversidad microbiana inferior que a la mujer. Los niveles de estradiol se correlacionan positivamente con la clase Gammaproteobacteria y negativamente con que la familia bacteriana *Prevotellaceae*, pero tras la menopausia se produce un descenso de bacterias productoras de SCFAs¹⁸⁹.

4.4. Funciones de la microbiota intestinal

Los estudios en humanos y otros mamíferos han implicado al microbioma en una variedad de procesos fisiológicos que son vitales para la salud del huésped, incluyendo la homeostasis energética, el metabolismo, la salud epitelial intestinal, la actividad inmunológica y el desarrollo neuroconductual.

4.4.1. Función metabólica y trófica de la microbiota intestinal

Para colonizar con éxito el intestino los microorganismos deben resistir la alta osmolaridad y acidez a nivel estomacal, las sales biliares, el moco intestinal, la modificación de nutrientes y la competencia microbiana. Los antígenos detectados en bacterias desconocidas provocan fagocitosis en las células del huésped y si las bacterias logran evitar la fagocitosis pueden comenzar la colonización del huésped. Estas proliferaciones microbianas localizadas pueden causar competencia de recursos y alterar transitoriamente la ecología intestinal. La colonización exitosa de una especie adquirida del medio ambiente puede depender de la capacidad de utilizar fuentes diferenciales de nutrientes, realizar detección química y coordinar la expresión génica de manera favorable. En el ser humano, se estima que la liberación de energía por parte de la microbiota comensal es aproximadamente el 10% de la energía absorbida, pero depende en gran medida de la dieta consumida¹⁵³. El genoma de nuestra microbiota intestinal codifica numerosas funciones metabólicas que son únicas y no pueden ser llevadas a cabo por nosotros mismos. La digestión de una gran cantidad de polisacáridos vegetales no digeribles (celulosa, xilano, pectina, hemicelulosa, inulina) y el almidón parcialmente digerido llega a las comunidades microbianas en el intestino distal. Los mamíferos son capaces de hospedar un patrón de microbiota metabólicamente activa; capaz de hidrolizar carbohidratos complejos y evitan la necesidad de desarrollar enzimas complejas que se requieren para descomponer polisacáridos de la dieta. El microbioma humano contiene una gran variedad de genes que codifican enzimas para la degradación de carbohidratos. Los SCFAs se producen principalmente a través de la fermentación sacarolítica de carbohidratos que escapan a la digestión y absorción en el intestino delgado, y los productos principales son formiato, acetato, propionato y butirato. El epitelio del colon consume casi por completo el butirato formado, constituyendo la principal fuente de energía para los propios colonocitos. Además, el butirato ejerce un efecto trófico sobre la mucosa intestinal, regula el crecimiento o diferenciación celular y disminuye la producción de citocinas proinflamatorias por lo que se le atribuyen efectos anti-inflamatorios y anticarcinogénicos. Por otro lado, el acetato y el propionato acceden a través de la circulación portal, estando involucrados en la regulación tanto del metabolismo lipídico como hidrocarbonado hepático, mejorando la homeostasis de la glucosa y la sensibilidad a la insulina¹⁹⁰. Los SCFAs parecen jugar un importante papel en la regulación de la integridad de la barrera epitelial a través de una regulación coordinada de proteínas de unión celular. Estas últimas, a su vez, regulan las vías moleculares intracelulares entre el lumen y el sistema portal hepático. El aumento de la permeabilidad está asociado con translocación de bacterias y/o su pared celular, componentes que desencadenan una cascada inflamatoria que se ha asociado con la obesidad, la resistencia a la insulina y aumento del LPS¹⁹¹.

Además de los glicanos, el microbioma intestinal posee la capacidad de fermentar y sintetizar proteínas, transformar los xenobióticos, así como los ácidos biliares del huésped, y proporciona al cuerpo las vitaminas esenciales. Sin embargo, secundario al catabolismo proteico y del metabolismo de los SCFAs se generan una serie de compuestos secundarios en el colón que pueden ser potencialmente tóxicos y perjudiciales para la salud; se tratan mayormente de aminas, amonio, compuestos fenólicos, tioles, indoles y sulfurados volátiles^{153 192}.

4.4.2 Función inmunitaria de la microbiota intestinal

El microbioma intestinal es esencial para la maduración del sistema inmune, compuesto tanto por respuesta inmunitaria adaptadas e innatas. La estructura del intestino está conformada por una mucosa formada por una única capa de células constituida por células epiteliales intestinales y linfocitos intraepiteliales, lo cual facilita esta interacción con el sistema inmunológico. Las células del epitelio intestinal contienen células de Paneth que secretan péptidos antimicrobianos y células caliciformes que secretan moco, que a su vez recubren la capa epitelial con función protectora. Debajo de la capa mucosa se encuentra la lámina propia, una capa de tejido conectivo que contiene placas de Peyer y una serie de otras células inmunitarias, incluidas las células presentadoras de antígeno y las células linfoides innatas, así como las células T CD4 +, células T CD8 + y las células B o plasmáticas que secretan IgA en la luz del intestino. La IgA actúa principalmente bloqueando la adherencia bacteriana a las células epiteliales (aglutinación, atrapamiento y eliminación) y también tiene efectos directos sobre la virulencia bacteriana. Este tejido linfoide asociado al intestino (GALT) representa el componente más grande del sistema inmunológico en el cuerpo e influye en las respuestas inmunitarias tanto a nivel local como sistémico¹⁹³. Las moléculas bacterianas inducen la proliferación de GALT y, además, favorecen la activación de TLR estimulando la inmunidad intestinal mediada por células T-helper (células Th) o células efectoras Th17. Consecuentemente, estas células inmunitarias ingresan a la circulación sistémica con el objetivo de dirigirse al intestino para ayudar a destruir los agentes patógenos. Por otro lado, las células T CD4+ reguladoras desempeñan un papel fundamental en la tolerancia y homeostasis intestinal mediante la producción de citocinas inmunosupresoras como IL-10. Algunas especies bacterianas impulsan el desarrollo de células T CD4+ reguladoras a través de vías alternativas que dependen de la señalización del polisacárido A y TLR en las células dendríticas. *Bacteroides fragilis* puede producir polisacárido A con efectos antiinflamatorios o la colonización de otros grupos como *Clostridium IV y XIVa*, los cuales exhiben la capacidad en colón de incrementar los niveles de TGF-β1, promueven la expresión de IL-10 y se presentan discretamente disminuidos en los pacientes con enfermedad intestinal inflamatoria. En líneas generales, el microbioma de las criptas del intestino delgado modula la proliferación de enterocitos al influir en la replicación del ADN y la expresión génica, mientras que el microbioma en las puntas de las vellosidades regula la expresión de genes implicados en la función metabólica e inmune. Los animales libres de gérmenes exhiben constantemente un desarrollo deficiente de las placas de Peyer, tienen un número reducido de células Th 1 y Th17 y la respuesta inmune de las células T intestinales está controlada

principalmente por las células Th2^{153 194 195}.

4.5. Microbiota intestinal y las enfermedades metabólicas

La obesidad, la diabetes mellitus y el síndrome metabólico son el resultado de interacciones complejas entre factores genéticos y ambientales. La evidencia inicial de la relación entre la obesidad y la composición microbiana intestinal se informó hace unas 3 décadas, cuando la pérdida de peso inducida quirúrgicamente a través de la cirugía de derivación gástrica y el aumento de peso a través de lesiones del núcleo hipotalámico ventromedial se asociaron con cambios en la ecología microbiana intestinal¹⁹⁶.

4.5.1. Microbiota intestinal y obesidad

Varios mecanismos se han propuesto como enlace entre la microbiota intestinal y la obesidad, entre los que se incluyen: SCFAs, la estimulación de hormonas, la inflamación crónica de bajo grado, el metabolismo de las lipoproteínas, la influencia de los ácidos biliares y el aumento del tono del sistema endocannabinoide¹⁹⁷. Sin embargo, la evidencia científica procedente de estudios en animales y humanos presenta controversias para determinar de forma concluyente la relación de causa-efecto entre la microbiota intestinal y la obesidad. La mayoría de los trabajos, apuntan hacia una disminución relativa en la abundancia de Bacteroidetes junto con un aumento relativo en los Firmicutes como una característica típica de la "microbiota obesogénica". Más específicamente, sobre el filo Firmicutes se ha visualizado una correlación negativa con el gasto energético en reposo, así como una correlación positiva con el porcentaje de masa grasa, pero todos estos hallazgos están lejos de ser consistentes de forma universal. A nivel de géneros, la presencia de *Lachnospira*, *Acinetobacter*, *Shewanella*, *Aliivibrio*, *Citrobacter*, *Marinomonas*, *Shigella* y *Pseudoalteromonas* se han asociado positivamente con la obesidad. En las familias bacterianas la literatura conocida también hace referencia a una fuerte asociación entre presencia de la familia *Christensenellaceae* y una reducción del incremento de peso, tanto en modelos animales como en humanos. Sumatoriamente, las especies bacterianas *Akkermansia muciniphila*, *Lactobacillus plantarum* y *paracasei*, presentan una fuerte relación sobre el peso, encontrándose aumentadas en sujetos delgados, mientras que *L. reuteri* y *L. gasseri* predominan en población obesa¹⁹⁶¹⁹⁸¹⁹⁹²⁰⁰. Por último, dentro del dominio de las arqueas, *Methanobrevibacter smithii* está más representada en los individuos obesos, tras observarse una relación entre el IMC y el metano detectable en humanos debido al incremento de su abundancia²⁰¹.

El fenotipo obeso parece presentar tanto en modelos animales como en humanos niveles mayores de SCFA cecal total, a parte de una mayor expresión de genes bacterianos responsables del metabolismo de los polisacáridos y de genes relacionados con la extracción de energía de la dieta¹⁹⁷²⁰². El grado de aumento de los SCFAs está mayormente representado por el propionato, en segundo lugar, por el butirato, frente a un aumento moderado de valerato y acetato. Estos resultados parecen ser dependientes de un patrón dietético de elevada densidad energética y rica en carbohidratos. Si el

aumento de la producción de SCFA en fenotipos obesos da como resultado un mayor aprovechamiento de la energía procedente de la dieta depende de varios factores como la disponibilidad de sustrato, el tránsito intestinal, la absorción de la mucosa, la salud intestinal y las relaciones simbióticas entre diferentes grupos de microbiota intestinal²⁰³. En el hígado, el acetato es capaz de inducir lipogénesis de novo y la colesterogénesis, que además parecen inhibirse por el propionato, por lo que la relación propionato-acetato puede ser un determinante en el acúmulo de grasa corporal. El acetato posee la capacidad de estimular la secreción de leptina en los adipocitos, cuya principal función es regular el equilibrio del balance energético en el organismo²⁰⁴.

El factor adipocitario inducido por ayuno o la proteína angiopoiteína tipo 4 (Fiaf / ANGPTL4) es producido por las células epiteliales del intestino grueso y el hígado. La inhibición de fiaf por la microbiota intestinal interviene en un aumento de los niveles circulantes de LPL, mecanismo por el que el microbioma induce adiposidad en el huésped²⁰⁵.

El microbioma intestinal puede favorecer una disminución de la oxidación de los ácidos grasos en los músculos y el hígado al inhibir la acción de AMPK, permitiendo un exceso de tejido adiposo en el resto de los tejidos. Secundario a la inhibición de AMPK se favorece la desinhibición de carnitina palmitoiltransferasa-1, que cataliza el paso limitante de la entrada de los ácidos grasos de cadena larga en las mitocondrias para su oxidación. El aumento de la oxidación de ácidos grasos se asocia con un mayor estado de energía celular junto con la reducción de los niveles de glucógeno y el aumento de la sensibilidad a la insulina²⁰⁶.

Los ácidos biliares primarios (ácidos cólico y quenodesoxicólico) son ligandos para el receptor farnesoide X (FXR) y desempeñan un papel clave en el control de la lipogénesis hepática. Los ácidos biliares al unirse al FXR en células ileales pueden estimular la expresión de genes que actuarán sobre la absorción y transporte intracelular o sistémico de los ácidos biliares en la circulación enterohepática. Los ácidos biliares primarios que ingresan al intestino grueso se convierten en ácidos biliares secundarios (ácidos desoxicólico y litocólico) por microbiota intestinal. Los ácidos biliares secundarios son ligandos del receptor 5 acoplado a la proteína G (TGR5) que actúan sobre la homeostasis de la glucosa; estimulando la expresión GLP-1 o disminuyendo los niveles séricos y hepáticos de TGs. Por lo tanto, la microbiota intestinal afecta a la adiposidad hepática del huésped al alterar la circulación de ácidos biliares. Sin embargo, también se sugiere que los ácidos biliares pueden causar disbiosis recíprocamente a través de su actividad bactericida al dañar el fosfolípido de la membrana celular microbiana²⁰⁷.

La microbiota intestinal puede contribuir a la inflamación crónica de bajo grado de la obesidad mediante la absorción de LPS bacteriano, un componente de membrana externa de bacterias Gram negativas. En un estudio de ratones con disfunción inmune de la mucosa intestinal a los que se le administró durante 4 semanas una dieta rica en grasas mostraron niveles elevados de LPS. Se observaron valores doblados o triplicados de LPS en hígado, tejido adiposo y músculos, además de mayor masa grasa corporal. A este estado inflamatorio se le denominada " endotoxemia metabólica " y se le asocia una mayor presencia de *Bacteroides inferiores*, *Bifidobacterium spp* y *Eubacterium rectale-C coccoides*²⁰⁸

Los receptores cannabinoides 1 y 2 (CB1 y CB2) son proteínas G activadas por el sistema

endocannabinoide (eCB). El sistema eCB está compuesto de lípidos endógenos y ejercen un papel fundamental en la regulación de la adipogénesis. El nivel de componentes de eCB está inversamente relacionado con la presencia de obesidad o DM2, ya que ambas enfermedades presentan un tono más elevado del sistema eCB. La expresión de las enzimas que degradan tanto CB1 como CB2 se observan incrementadas en el tejido adiposo de ratones obesos ob / ob^{197 209}.

4.5.2 Microbiota intestinal y diabetes mellitus tipo 2

La DM2 aparece como resultado de complejas interacciones genético-ambientales y entre los factores de riesgo para su desarrollo se encuentran la edad, los antecedentes familiares de DM2, la dieta, el estilo de vida sedentario y la presencia de obesidad. No obstante, no todos los factores de riesgo contribuyen de la misma forma y la carga genética parece ser un factor de riesgo menos influyente que los factores de riesgo sociodemográficos o ambientales. La evidencia científica reciente sugiere que la microbiota intestinal se comporta como un factor ambiental en la aparición de enfermedades metabólicas como la DM2²¹⁰. El primer estudio de microbiota en DM2 llevado a cabo en humanos fue publicado en el 2010, por el grupo de *Larsen et al*, con el objetivo de valorar las diferencias taxonómicas entre microbiota intestinal de pacientes con DM2 y controles sanos. Así pues, se analizaron muestras fecales de 18 adultos con DM2 en diferentes grupos de edad e IMC, y se aparearon con 18 controles. Los resultados de este trabajo mostraron que los sujetos con DM2 tenían una representación inferior de la abundancia relativa del filo Firmicutes y Clase *Clostridiales*, con ligero enriquecimiento del filo Proteobacteria y la clase *Betaproteobacteria*. Las ratios de *Bacteroidetes/Firmicutes*, *Bacteroides/Prevotella* y *C. coccoides/Eubacterium rectale* se correlacionaron de forma positiva con los niveles elevados de glucosa en plasma, pero no con la variable IMC^{211 212}. Sin embargo, los cambios filogenéticos en la ratio *Bacteroides/Firmicutes* observados en este estudio no se han podido refutar de manera homogénea en otros estudios posteriores realizados en DM2^{213 214}.

En el año 2012 se publicó un trabajo con la secuenciación en escopeta de 145 muestras fecales de mujeres europeas con alguna alteración del metabolismo glucídico (DM2, intolerancia glucídica o normal), con el objetivo principal de analizar las características de microbiota intestinal de esta población y se compararon con los resultados conocidos de una cohorte china de 345 sujetos. En el grupo de DM2 se observaron 21 modificaciones taxonómicas secundarias a la disminución de la abundancia relativa de especies de *Roseburia*, *Clostridium*, *Clostridiales*, *Eubacterium eligens*, *Coriobacteriaceae* y *Bacteroides intestinalis*. Por otro lado, los niveles superiores observados de las especies de *Lactobacillus* en el grupo DM2 fueron discordantes a los datos previos recogidos en población china. Además, exhibieron una correlación positiva con Hb1 Ac y los niveles glucosa plasmáticos, en cambio, la reducción observada en las especies de *Clostridium* reflejaban una correlación negativa con los valores de Hb1Ac y los niveles de glucosa plasmática²¹⁵. Estas modificaciones en la ecología bacteriana parecen ser plausibles antes del diagnóstico de DM2, puesto que, tanto en prediabetes como en intolerancia glucídica se exhiben cambios en el microbioma intestinal. La abundancia relativa de bacterias productoras de butirato (*Akkermansia*

muciniphila ATCCBAA-835 y *Faecalibacterium prausnitzii* L2-6) o bacterias pertenecientes a la familia *Verrucomicrobiae* son inferiores en pacientes con prediabetes o DM2 de reciente diagnóstico, respecto a la población sana²¹². Los niveles más bajos de *Akkermansia muciniphila* en prediabetes o intolerancia glucídica se han contrastados en diferentes trabajos realizados con poblaciones de distintas etnias, desde europeos hasta poblaciones asiáticas, y sumatoriamente, *A. muciniphila* parece correlacionarse de forma negativa con los niveles de glucosa en sujetos con prediabetes o DM2^{216 217 218}. Sin embargo, en un estudio murino donde se llevó a cabo la transferencia de microbiota de sujetos prediabéticos a ratones alimentados con dieta diabetogénica no tuvo efecto en el metabolismo de la glucosa. Estos hallazgos indican que probablemente los cambios producidos en la microbiota durante la prediabetes no son suficientes para alterar la tolerancia a la glucosa²¹⁶. Uno de los mayores interrogantes en el estudio del microbioma intestinal en DM2 es si los cambios descritos podrían ser inducidos por fármacos hipoglucemiantes de uso común. Concretamente, se postuló que gran parte de las diferencias en la microbiota intestinal en la diabetes podrían ser explicadas por el tratamiento con metformina²¹⁹. El grupo de *Forslund et al* elaboró un elegante estudio dónde exponía que los pacientes con DM2 que no habían sido tratados con metformina presentaban una abundancia inferior en especies productoras de butirato. En este trabajo se esclareció la causa principal del incremento de las especies de *Lactobacillus* entre los individuos con DM2, dado que resultaron ser consecuencia del tratamiento con metformina²¹⁹.

En líneas generales, los cambios más frecuentes de la composición de la microbiota intestinal en DM2 son debido a un incremento de bacterias patógenas como las especies *Bacteroides caccae*, *Clostridium hathewayi*, *Clostridium ramosum*, *Clostridium symbiosum*, *Eggertherlla lenta*, *E. Coli*, con una reducción de las bacterias productoras de butirato como los géneros *Ruminococcus* y *Subdoligranulum*, o de especies como *Eubacterium rectale*, *Faecali prausnitzii*, *Roseburia intestinales* y *Roseburia inulinivorans*²²⁰. Como resultado final, la disbiosis intestinal en DM2 induce un aumento de genes microbianos con mayor capacidad de interactuar en el metabolismo de los hidratos de carbono y un sobrecrecimiento de bacteriano más eficiente para la extracción de energía desde la dieta, induciendo excesiva acumulación de tejido adiposo. Entre los principales mecanismos propuestos para explicar la influencia y los cambios en microbiota intestinal sobre la DM2 destacan cambios en la permeabilidad intestinal, endotoxemia metabólica, translocación bacteriana, interrelación con ácidos biliares, cambios en la proporción de tejido adiposo marrón, la producción de SCFAs, las modificaciones en la secreción de las incretinas y por último, cambios secundarios al tratamiento con metformina.

La **endotoxemia metabólica** es un estado proinflamatorio con un exceso moderado en la producción de citoquinas como IL6, IL1, o TNF α que dificultan la interacción de la insulina con su receptor y contribuye a la RI. Las bacterias Gram-negativas residentes secretan LPS y otras endotoxinas en el TGI. Estas endotoxinas pueden atravesar la barrera de la mucosa TGI a través de uniones estrechas de la mucosa o infiltrando quilomicrones. Una vez en el tejido extraintestinal, las endotoxinas desencadenan respuestas inmunitarias innatas activando CD14, el dominio de oligomerización de nucleótidos y TLR4 en la superficie de células dendríticas y macrófagos²²¹. Los estudios más recientes sugieren que la activación

del sistema inmune innato mediante el reclutamiento de moléculas efectoras (inflamomasas, peptidoglicanos, TNF- α , IL-1 β y flagelina) es secundario a la infiltración de LPS. La disbiosis microbiana causada por la suplementación con una dieta rica en grasas puede aumentar la permeabilidad intestinal, aumentar la infiltración de LPS, el estrés oxidativo, la infiltración de macrófagos y la inflamación del tejido adiposo^{196 222}.

La **translocación bacteriana** está adquiriendo cada vez más peso como una de las causas iniciales en la aparición de DM2 y obesidad, sobre todo, la aparición de bacterias en plasma sanguíneo. Las bacterias del intestino son translocadas activamente a través del epitelio intestinal hacia la sangre, tejido adiposo y otros tejidos metabólicamente activos, siendo considerada la presencia de ADN bacteriano en sangre un marcador de riesgo de DM2 y adiposidad abdominal. Además, microbiota tisular (sanguínea) se ha caracterizado principalmente por la presencia Proteobacteria (hasta 90%) tanto en individuos sanos como en pacientes diabéticos. La leptina podría constituir un factor protector porque inhibe la adherencia de la microbiota intestinal en la mucosa y con ello, la translocación de bacterias vivas desde el intestino hacia otros tejidos²²³

El **tejido adiposo marrón** promueve un fenotipo delgado, saludable y mejora la sensibilidad a la insulina. En respuesta al frío o al ejercicio, las células grasas marrones también emergen en el tejido adiposo blanco (llamadas células beige), un proceso conocido como browning. En los modelos murinos se ha mostrado que la grasa beige funcional es promovida por el agotamiento de microbiota, ya sea por tratamiento antibiótico o ratones libres de gérmenes. Esto conduce a una mejor tolerancia a la glucosa, a la sensibilidad a la insulina, disminución de la proporción de grasa blanca y tejido adiposo en ratones deficientes del gen leptina o alimentados con dieta rica en grasas. La microbiota intestinal obstaculiza la aparición de células de grasa marrón dentro de depósitos de grasa blanca a través de un mecanismo que implica el control de macrófagos e infiltrados de eosinófilos²²⁴.

Los **ácidos biliares primarios** conjugados se reabsorben por medio de la circulación enterohepática; y sólo un 5% escapa de este mecanismo alcanzando el intestino grueso y transformándose en ácidos biliares secundarios. Las bacterias en el íleon se componen principalmente de Enterobacterias, *Enterococcus*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Lactobacillus* y *Veillonella*, y en conjunto, son responsables de la desconjugación de los ácidos biliares, a través de la pérdida de glicina o la taurina por las hidrolasas y de la oxidación de los grupos hidroxilo. Una pequeña cantidad de estos ácidos biliares continúan hasta el colón donde sirven como sustratos para una variedad de reacciones de biotransformación por bacterias intestinales²²⁵. La posible asociación del perfil de ácidos biliares con la diabetes ha sido reconocida durante décadas, sin embargo, las consecuencias de esta interacción parecen haber sido relativamente subestimadas. Los ácidos biliares controlan el sobrecrecimiento de bacterias intestinales, mientras que microbiota intestinal regula la síntesis de ácidos biliares e incide tanto en sus tamaños como en la composición final. Además, a nivel de las células intestinales L parece mejorar el metabolismo glucémico estimulando la producción de péptidos como GLP-1 y promoviendo la secreción de insulina. Los ácidos biliares presentan la capacidad de actuar como moduladores de señalización con activación tanto de FXR como TGR5 para mantener la homeostasis metabólica. La activación de la

señalización FXR por agonistas específicos inhibe la síntesis de ácidos grasos, mejora la sensibilidad a la glucosa e insulina tanto en modelos de ratones obesos como diabéticos^{226,227}. Los ácidos biliares primarios como el taurocolato pueden proporcionar señales de orientación a las bacterias intestinales y promover la germinación de las esporas. Estas esporas pueden estar presentes en formas inactivas y no tóxicas, y a su vez, facilitar la recuperación de microbiota después de la disbiosis inducida por antibióticos o toxinas. Por tanto, los ácidos biliares primarios también pueden actuar como un mecanismo de control para prevenir el crecimiento de bacterias gramnegativas patógenas en el intestino delgado^{225, 228}. En último lugar, los ácidos biliares parecen estar implicados en la expresión y producción de la entero-hormona FGF19 que presenta la capacidad de estimular la síntesis de glucógeno en situación de postprandial, reduciendo los niveles de glucosa en sangre²²⁹.

La **producción de SCFAs** es secundaria a la fermentación bacteriana de los carbohidratos no digeribles que escapan de la digestión del tracto gastrointestinal superior y pueden interferir en el control del metabolismo hidrocarbonado. El acetato, propionato y butirato representan el 95% de los SCFAs y pueden ser absorbidos desde la luz intestinal al torrente sanguíneo. El butirato se considera la principal fuente de energía del epitelio intestinal, mientras que el acetato y el propionato funcionan principalmente como sustratos para la gluconeogénesis y la lipogénesis en el hígado. Curiosamente, se ha demostrado que tanto el butirato y el propionato activan la gluconeogénesis intestinal a través de mecanismos complementarios: el butirato ejerce sus efectos a través de un mecanismo dependiente de cAMP, mientras que la activación de la gluconeogénesis intestinal por el propionato implica la señalización de la vía intestino-cerebro²³⁰. Adicionalmente, el butirato se ha identificado como sustrato intermediario en la integridad de la barrera intestinal mediante el estímulo de las uniones estrechas, reduciendo los niveles de LPS y citocinas inflamatorias en plasma. Los mecanismos exactos por los cuales los SCFA actúan en el control de la adiposidad o ejercen sus efectos metabólicos beneficiosos no están claros completamente, pero se unen a receptores acoplados a proteína G (GPR) GPR41 (FFAR3) y GPR43 (FFAR2), que se expresan ampliamente en la mucosa intestinal, células inmunitarias, hígado y tejido adiposo²³¹. Concretamente, el receptor GPR43 también se puede localizar en la C β y su bloqueo en ratones alimentados con una dieta obesogénica se ha asociado al deterioro de la función de la C β y a un incremento en la masa pancreática de C β . La actividad del receptor GPR43 está íntimamente relacionada con la actividad metabólica y la homeostasis energética del huésped. Otro de los beneficios adicionales atribuidos al butirato es su capacidad de incrementar la secreción de GLP1 y péptido tirosina-tirosina (PYY) en las células L en el colon e inducir un retraso en el vaciamiento gástrico, lo que resulta en un tiempo adicional para la absorción de nutrientes por parte del huésped^{231, 232}. En la mayoría de los estudios una mayor concentración de butirato se asocia con la mejora de la salud metabólica, por ejemplo, la administración de butirato en modelos de ratón expuestos a una dieta rica en grasas, resistencia a la insulina y esteatosis hepática ocasiona una disminución de la esteatosis. Además, la administración de butirato puede reducir la expresión hepática de TNF- α , IL-1 β e IL-6 seguida de una disminución de la secreción de citoquinas proinflamatorias como IL-12, TNF- α y aumento de la liberación de la citocina antiinflamatoria IL-10 por los monocitos expuestos a las bacterias. Por otro lado, se ha comprobado que el propionato y el butirato son capaces de reducir

también la expresión de las citoquinas proinflamatorias TNF- α e IL-6 en el tejido adiposo humano. La capacidad de los SCFAs para mejorar la inflamación de bajo grado está relacionada con su capacidad para modular la función de los leucocitos y los adipocitos, reduciendo así, la expresión y la producción de citoquinas y quimiocinas inflamatorias^{233 234}. Recientemente, se ha descrito el rol del succinato en la homeostasis energética y se caracteriza por ser un intermediario de la síntesis microbiana de propionato. En ratones, la concentración cecal de succinato está incrementada tras la administración de fructoligosacáridos y a su vez, los niveles de succinato están significativamente incrementados en hiperglucemia o diabetes en modelos de humanos o ratones. El succinato presenta un impacto inflamatorio sobre el tejido adiposo al interactuar con su receptor lo que conduce a generar trastornos metabólicos asociados con la obesidad²³⁵

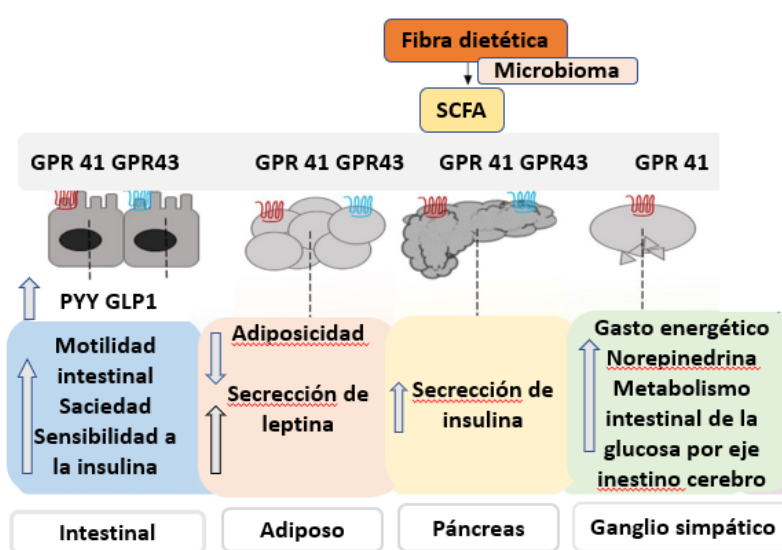


Figura 7. Principales mecanismos de acción de los SCFAs en los diferentes tejidos del organismo y su papel en la homeostasis metabólica del huésped.

La **liberación de hormonas gastrointestinales**, como GLP-1, PYY, ghrelina y otras hormonas peptídicas, tanto en humanos como en roedores, actúan aumentando la saciedad después de una comida y disminuyendo la ingesta de alimentos; aunque los mecanismos subyacentes son poco conocidos²³². En un estudio realizado en gatos los niveles de ghrelina han mostrado correlaciones negativas con la cantidad de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Blautia coccoides* y *Eubacterium rectale*. Las correlaciones positivas están presentes con la presencia de *Bacteroides*, *Bifidobacteriaceae* y *Prevotella*, lo que sugiere que la microbiota intestinal impacta en el control de la saciedad mediado por las hormonas reguladoras de la ingesta, leptina y ghrelina²³⁶. La modulación de la composición de microbiota intestinal mediante el consumo de probióticos estimula la producción de butirato, lo que favorece a su vez, la secreción de GLP-1 en las células L, induciendo mejoría del estado inflamatorio y de la RI del organismo. Otro de los metabolitos capaces de modular la secreción de GLP1 en las células entero-endocrinas son los indoles, productos de la degradación del aminoácido triptófano a nivel de la microbiota del huésped. Del mismo modo hay investigaciones recientes que sugieren que el microbioma interfiere en las células mesentéricas neuronales disminuyendo la expresión del receptor de GLP-1 y promoviendo el peristaltismo intestinal²³⁷.

Por otro lado, la ingestión de prebióticos (fructooligosacárido) en la dieta induce modificaciones a largo plazo en la cantidad de células L que expresan receptores GPR43 y GPR41²³⁸. El uso de probióticos se ha correlacionado con el aumento de *Bifidobacterium* y con aumento de los niveles plasmáticos de GLP-1 y PYY. A nivel experimental el aumento de *Bifidobacterium* es capaz de modular la inflamación en ratones obesos aumentando la producción de incretinas y reduciendo la permeabilidad intestinal^{239 240}.

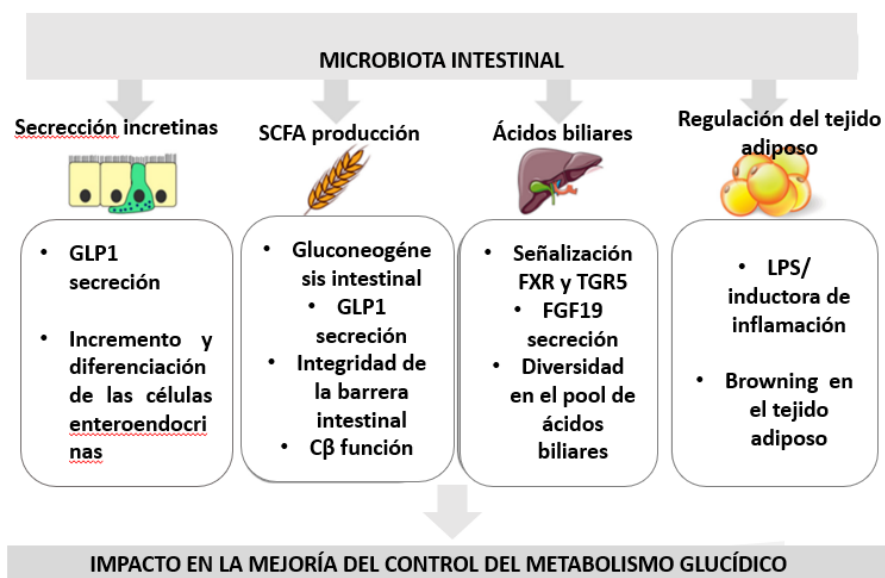


Figura 8. Mecanismos de control glucídico mediante la acción de microbiota intestinal del huésped

4.6. Metformina y su acción sobre el microbioma intestinal

En los últimos años han surgido numerosos estudios donde se postulan la capacidad de la metformina de modular o modificar microbiota intestinal en modelos animales y humanos. El primer estudio con metformina fue llevado a cabo en el modelo de gusano, *Caenorhabditis elegans*, con resultados favorables en la velocidad de envejecimiento. Consecuencia a su vez, de modificar el metabolismo microbiano, lo que sugirió la posibilidad de que este fármaco afecte de manera similar en el metabolismo y composición de microbiota intestinal de los mamíferos. Más tarde, se comprobó que exposición a metformina puede actuar modulando la funcionalidad del microbioma modificando la expresión de genes bacterianos que codifican metaloproteínas, la síntesis de LPS, la síntesis de SCFAs, el metabolismo de azúcares, nucleotídicos y de los aminoácidos. Desde entonces, la evidencia científica busca esclarecer los mecanismos subyacentes por los que metformina induce efectos antihiper glucémicos mediados por el microbioma²⁴¹.

4.6.1. Cambios en la composición de Microbiota Intestinal

En los últimos años la evidencia científica se ha centrado en la búsqueda y comprensión de la acción metformina modulando o ejerciendo sus efectos anti-hiperglucemiantes mediante la interacción con el microbioma intestinal. Así pues, hay trabajos publicados en modelos humanos, animales o in vitro

donde se evalúa el papel de metformina en el microbioma intestinal; además, gran parte de los hallazgos encontrados son reproducibles en los distintos modelos con DM2²⁴¹.

Los estudios **realizados en animales** con DM2 se han llevado a cabo principalmente en roedores. Concretamente, el análisis de 134 OTUs procedentes de muestras fecales de ratones tratados con metformina no exhibía cambios concluyentes en la proporción de Firmicutes y Bacteroidetes, pero sí de un enriquecimiento de la abundancia relativa de los filos Proteobacterias y Verrucomicrobia. A nivel de género bacteriano hubo un enriquecimiento de *Allobaculum*, *Akkermansia*, *Bacteroides*, *Blautia*, *Butyricoccus*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Parasutterella*, *Phascolaractobacterium* y *Provetella*, mientras que se producía una reducción de los géneros *Costridium XIVa*, *Flavonifractor*, *Lachnospiracea_incerta_sadis*, *Roseburia* y *Clostridium XI*²⁴². No obstante, hay otro estudio realizado en ratones obesos que asume que metformina podría ser la causante de la disminución del ratio Firmicutes/Bacteroidetes, junto con incremento de géneros *Bacteroides*, *Butyricimonas*, *Parabacteroides* y la especie de *Akkermansia muciniphila*²⁴³. En líneas generales, varios estudios experimentales en modelos murinos alimentados con una dieta rica en grasas mostraron que el tratamiento con metformina modulaba la microbiota intestinal del huésped, es decir, lograba amortiguar la disbiosis intestinal y fomentaba la aparición de un patrón de microbiota más saludable²⁴¹²⁴⁴²⁴⁵²⁴³. Uno de los taxones bacterianos más implicadas o conocidas para comprender el comportamiento beneficioso de metformina en el microbioma es la especie *Akkermansia muciniphila*, la cual se caracteriza por presentar la capacidad de estimular y degradar la mucina a nivel intestinal²⁴⁶. El aumento de la abundancia relativa del género *Akkermansia* conduce a su vez, a explicar el enriquecimiento observado en algunos trabajos del filo Verrucomicrobia, ya que son pertenecientes a dicho filo. En un estudio experimental en ratones alimentados con dietas ricas en grasas, pero tratadas con *A. muciniphila* o metformina no hubo diferencias significativas en el aumento de las células caliciformes intestinales productoras de mucina, ni en los niveles de IL-6 ni tampoco sobre la tolerancia a la glucosa. Se postula que es muy probable que *A. muciniphila* por sí sola, pueda explicar parte de los efectos beneficiosos de la metformina. No obstante, hay otros estudios que no encontraron cambios en la producción de *A. muciniphila* con metformina, pero estos resultados discordantes pueden ser secundarios al análisis de microbiota intestinal procedente del intestino delgado proximal, en vez de muestras cecales, dado que *A. muciniphila* se encuentra mayormente en colón y en ciego. Finalmente, algunos estudios realizados con la transferencia de microbiota expuesta a metformina a ratones libres de gérmenes han logrado resultados favorables en el control del metabolismo hidrocarbonado²⁴⁷.

En estudios **realizados in vitro** de la incubación de heces en contacto con metformina se ha visto un aumento en el crecimiento de *Bifidobacterium adolescentes* y *A. muciniphila*, que además, aparecen en estudios realizados en humanos²⁴⁸. Sin embargo, la metformina no es capaz de enriquecer *E. coli* in vitro, pese a su presencia repetida en estudios realizados en humanos²⁴⁹.

En los estudios **realizados en humanos** destaca el metaanálisis multicéntrico de *Forslund et al.* con datos metagenómicos elaborados en el 2015, que incluyeron a 199 pacientes con DM2, de los que se

disponía de información sobre el tratamiento antidiabético y de 554 controles (no diabéticos), que comprendían individuos suecos, daneses y chinos²¹⁹. El diseño principal del estudio contenía el objetivo de evaluar el efecto potencial de la dieta y los regímenes de tratamiento entre las poblaciones con DM2. Curiosamente, los resultados arrojados por este trabajo sólo encontraron marcadas relaciones significativas para los sujetos que tenían tratamiento con metformina. La presencia de géneros bacterianos productores de butirato fue menor en pacientes con DM2, independientemente del tratamiento, respecto a los controles no diabéticos. Entre las comunidades bacterianas incrementadas en pacientes diabéticos sin metformina cabe destacar la presencia de *Eubacterium*, *Clostridiaceae SMB53* y la reducción de otros géneros bacterianos como *Roseburia* y *Subdoligranulum*, lo que conlleva a una menor proporción total de bacterias productoras de butirato. En cambio, los pacientes con DM2 en tratamiento con metformina sí mantenían géneros bacterianos con íntima relación con la producción de butirato, tales como *Bifidobacterium*, *Prevotella*, *Megasphaera* y *Butyrivibrio*. Por otro lado, el aumento de *Lactobacillus* que aparecía de forma global en la población con DM2 desaparece tras relacionar estas poblaciones con sus respectivos regímenes de tratamiento^{219,248,249}. El estudio de los genes microbianos en la población sin metformina mostraba un enriquecimiento de genes implicados en la respuesta al estrés oxidativo y aumento de la actividad de rutas de degradación de ribosa, glicina y triptófano. Por el contrario, los genes implicados en la degradación de treonina, arginina y de la actividad piruvato sintasa estaban menos representados. Las consecuencias o implicaciones de estos cambios funcionales sobre la fisiología del huésped son desconocidos, aunque se hipotetiza que la actividad catalasa favorecería la reducción de las especies peróxido de oxígeno presentes en lumen intestinal^{142,219,247}. La comparación taxonómica de las muestras fecales de los sujetos con metformina mostraba una disminución de la abundancia relativa *Intestinibacter spp.* en todas las cohortes y un aumento en *Escherichia spp.* respecto al grupo sin metformina²¹⁹. Los efectos de la metformina sobre la abundancia de *Escherichia spp.* son, probablemente, indirectos, y posiblemente, los resultados de interacciones bacterianas modulan cambios fisiológicos o ambientales en el intestino tras el tratamiento con metformina. Metformina podría deteriorar el metabolismo del folato en *E.coli*, posiblemente, por la inhibición de la actividad reductasa de dihidrofolato²⁴⁸.

Más adelante, en 2017 se publicó un estudio randomizado cruzado en el que se administró a los pacientes una dieta hipocalórica acompañada de metformina 1700mg/d o placebo. La secuenciación de las muestras fecales se realizó en ambos grupos, tanto antes y como después de iniciar metformina o placebo. La toma de metformina durante dos meses inducía el aumento de 81 taxones bacterianos y se elevaba hasta 86 taxones tras cuatro meses, mientras que en el grupo con placebo sólo mostraron cambios en uno de los taxones bacterianos secuenciados. La mayoría de los cambios se centraron en la presencia de bacterias pertenecientes al filo Firmicutes y Proteobacteria, además de reafirmar los resultados previamente observados en el trabajo de *Forslund et al*, con el incremento de *Escherichia spp* y la reducción de *Intestinibacter*²⁵⁰. En otro ensayo clínico realizado en 27 hombres jóvenes sin diabetes metformina reducía también la abundancia de *Intestinibacter spp.* y *Clostridium spp.*, mientras que aumentó la abundancia de *Escherichia/Shigella spp* y *Bilophila wadsworthia*. La diversidad microbiana

disminuía tan solo 24 h después de iniciar el tratamiento, lo que indicaría que metformina tiene un efecto inmediato en la remodelación de microbiota, y que estos cambios se acompañan con incrementos progresivos de patógenos oportunistas como *Escherichia/Shigella spp.* Estos resultados han postulado a *Escherichia spp.* como plausibles biomarcadores interrelacionados con los efectos adversos gastrointestinales de metformina²⁵¹. Otros estudios con metformina sobre microbiota intestinal de sujetos sanos también han observado modificaciones a corto plazo en las familias bacterianas *Peptostreptococcaceae* y *Clostridiaceae_1*²⁵².

En otro estudio llevado a cabo en humanos el tratamiento con metformina da lugar a una mayor abundancia relativa de la especie *Akkermansia muciniphila*. La población estudiada incluía a 28 sujetos diagnosticados con diabetes, de los cuales sólo 14 tomaban metformina y se emparejaron con 84 sujetos sin diabetes por sexo, edad e IMC. Los participantes con diabetes sin metformina tenían una mayor abundancia relativa de *Clostridiaceae O2d06* y una menor abundancia de *Enterococcus casseliflavus*. La mayor abundancia de las bacterias degradantes de mucina, *A. muciniphila* y *B. bifidum*, estaban presentes entre las muestras fecales de los usuarios de metformina, lo que sugiere que los beneficios derivados del fármaco pueden ser secundarios al fortalecimiento de la barrera mucosa intestinal²⁵³. *A. muciniphila* desempeña un papel crucial en el mantenimiento de la integridad de la capa de mucina, lo que reduce la translocación de lipopolisacáridos proinflamatorios y el control del almacenamiento de grasa, el metabolismo del tejido adiposo y la homeostasis de la glucosa. Del mismo modo, *B. bifidum* puede crecer en la mucina gástrica como única fuente de carbono, y el análisis del genoma bacteriano reveló que esta bacteria puede interferir en las mucinas del huésped, lo que podría contribuir a la salud gastrointestinal de la misma manera que *A. muciniphila*²⁴⁶.

En la búsqueda de la caracterización de microbiota intestinal con metformina se han realizado otros estudios con tiempos de exposición al fármaco diferentes, con otros fármacos asociados y con poblaciones de distintas etnias o grados de progresión de la DM2. Específicamente, un trabajo publicado en 2020 describía las diferencias en la composición de microbiota intestinal de pacientes con DM2 en tratamiento sólo con metformina (no más de dos años desde el inicio del fármaco) o asociado a polifarmacia versus controles sanos o prediabéticos. Los resultados mostraron niveles inferiores de la abundancia relativa del filo Firmicutes en el grupo de DM2 con metformina²¹⁷.

4.6.2. Efectos metabólicos de la metformina mediados por microbiota intestinal

En líneas generales podemos incidir que la interacción de metformina en el microbioma favorecerá la absorción de glucosa intestinal, aumentará el número de bacterias productoras de SCFAs y de bacterias degradadoras de mucinas, incrementa la secreción de péptidos intestinales, mejora la integridad de la barrera intestinal y la regulación de la producción de los ácidos biliares. En conjunto, todos estos mecanismos podrían participar en los efectos reductores de glucosa de la metformina y la homeostasis del metabolismo hidrocarbonado.

La modificación de la **absorción de glucosa intestinal** por metformina es conocida desde hace tiempo, puesto que hay un aumento de la captación y la utilización de la glucosa en el intestino, lo que

resulta en un aumento del lactato dentro de los enterocitos. Curiosamente, el efecto de la metformina sobre la utilización de la glucosa intestinal era ya bien conocido por los radiólogos, debido a que la toma de metformina interfiere con las imágenes por tomografía de emisión de positrones. Así pues, se traslada a que el incremento de captación intestinal visualizada en estas pruebas de imagen está mediado por el aumento de la absorción de glucosa intestinal. Por otro lado, el papel del cotransportador-1 de la glucosa-sodio (SGLT1) en el intestino proximal es fundamental para controlar la homeostasis del metabolismo hidrocarbonado. En modelos murinos la detección de glucosa en el intestino delgado superior desencadena habitualmente una vía dependiente de SGLT1 para reducir la producción de glucosa. La administración de una dieta rica en grasas a los roedores reduce la detección de glucosa y, consecuentemente, la expresión de SGLT1 en el intestino delgado superior. Sin embargo, con la administración de metformina se vuelve a restaurar la expresión de SGLT1 en el intestino delgado superior. El aumento de la abundancia de *Lactobacillus* secundario a la exposición a metformina parece ser el agente implicado para la recuperación del equilibrio a nivel de la absorción de glucosa. No debemos olvidar que metformina de liberación retardada se conserva en gran parte en el intestino, con absorción sistémica mínima y es tan efectiva para reducir la glucosa en sangre como la formulación estándar de liberación inmediata. En definitiva, podríamos concluir que metformina altera la absorción y utilización de la glucosa en el intestino y a nivel hepático^{141 242}

Los géneros **bacterianos productores de SCFAs** más representativos incrementados con la exposición a metformina en los estudios humanos son: *Akkermansia*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Prevotella*, *Megaphaera*, *Shewanella*, *Blautia* o *Butyrivibrio*. En el caso de modelos ratón o rata las bacterias productoras de butirato asociadas al tratamiento con metformina: *Allobaculum*, *Bacteroides*, *Blautia*, *Butyricoccus*, *Lactobacillus*, *Akkermansia*, *Phascolarctobacterium*, *Butyricimonas*, *Coprococcus* y *Ruminococcus*. Los SCFAs pueden ejercer efectos beneficiosos sobre los tejidos periféricos, como el tejido adiposo, el músculo esquelético y el hígado, al controlar el metabolismo energético y la homeostasis del metabolismo glucídico²⁵⁴.

El filo Bacteroidetes es el que contiene mayor número géneros bacterianos productores de butirato y propionato, en la mayoría de los estudios realizados en modelos animales hay un enriquecimiento de este filo, aunque estos resultados no se han podido ratificar de forma homogénea en los estudios realizados en humanos. El aumento de los niveles de SCFAs fecales tampoco han sido respaldados en todas las poblaciones, ya que en población nórdica no hay aumento de la producción de SCFAs mediado por metformina y se postula que podrían estar interferidos por la dieta o la etnia²⁵⁵. Los cambios en la diversidad en la producción de butirato y propionato se han atribuido parcialmente a una mayor abundancia de *Subdogranulum Variabile*, un anaerobio productor de butirato. Por ello, se han realizado estudios en busca de la relación entre *Escherichia sp*, *A muciniphila*, *S variable* y *Intestinobacter bartletti* en la contribución de la creación extracelular de SCFAs y aminoácidos²⁵⁶²⁵⁷. Además, se ha postulado que *A muciniphila* podría interactuar con *Escherichia sp* favoreciendo en el huésped la producción de sulfuro de hidrógeno. Se trata de un compuesto con varios efectos beneficiosos tanto para los microbios del huésped, como del intestino, mostrando propiedades antiinflamatorias; promoviendo

la relajación del músculo liso y acción antioxidante²⁵⁶. Como conclusión, la abundancia de bacterias productoras de SCFAs pueden considerarse un mecanismo antidiabético regulado por metformina, pero los mecanismos por los que metformina afecta a la composición de microbiota intestinal aún no están esclarecidos.

Las **bacterias productoras de moco** aumentan después de la administración de metformina, tales como *A. muciniphila*, descrita anteriormente, podrían explicarse por la regulación en el número de células caliciformes productoras de mucina en el intestino, lo que proporciona más sustrato para el crecimiento de *A. muciniphila*. No obstante, el uso de *A. muciniphila* en los humanos se ve obstaculizados por su alta sensibilidad al oxígeno y su requisito para un medio a base de moco que es incompatible. Una proteína específica de la membrana externa de *A. muciniphila*, Amuc_1100, demostró que consigue en humanos efectos beneficiosos a nivel de la barrera intestinal o de la interacción con TLR-2. La administración de dos semanas de tratamiento no produjo efectos adversos indeseados, aunque la eficacia de las preparaciones de *A. muciniphila* como una herramienta terapéutica potencial para la diabetes quedarían aún por demostrar^{253,258}. Sumatoriamente, en modelos de ratones tratados con dietas ricas en grasas y metformina se aumenta la expresión de los genes MUC2 y MUC5 que contribuyen a aumentar los niveles de mucina. El aumento de la expresión de MUC2 potencia la presencia de las proteínas de uniones estrechas como la Zonulin-1 o la ocludina y se reduce la permeabilidad intestinal²⁴³.

El incremento de **péptido intestinales** como el GLP-1 con la exposición a metformina ha sido estudiado en modelos de animales y humanos donde se observa un aumento de sus niveles plasmáticos circulantes. Los efectos pleiotrópicos que ejerce el aumento de GLP1 secundario al tratamiento con metformina en DM2 son secundarios a la inhibición de la secreción de glucagón, incremento de la secreción de insulina en estímulo de glucosa, disminución del vaciamiento gástrico, reducción del apetito e interacción con el eje intestino-cerebro. Los cambios en la secreción de ácidos biliares producidos por metformina mejoran la secreción de GLP1, sumatoriamente, en modelos murinos diabéticos se ha podido observar que la infusión de glucosa en duodeno incrementa los niveles de GLP1 y activa a la AMPK a nivel intestinal. Este último efecto es independiente del intestino delgado proximal y actúa a nivel del eje cerebro intestino por la vía receptor GLP1-PKA, se trata de un mecanismo dependiente de la activación de los receptores de GLP1 en las neuronas vagales aferentes secundado por la acción de metformina. No obstante, los mecanismos que unen la activación del AMPK y la activación de GLP1 no están aclarados completamente²⁵⁹.

El efecto en el PYY a nivel del metabolismo hidrocarbonado es similar a GLP1, pero son menos pronunciados. Hay autores que correlacionan los niveles de Firmicutes y Bacteroidetes con los valores de PYY en plasma. Datos recientes obtenidos en ratas muestran que existen diferentes poblaciones de células L y que estas poblaciones presentan la capacidad de secretar diferentes proporciones de PYY y GLP-1. Asimismo, metformina disminuye los niveles de GIP plasmático (polipéptido insulínico dependiente de la glucosa) en ratas alimentadas con una dieta alta en grasas y alta en sacarosa. Los niveles elevados de GIP se asocian con intolerancia a la glucosa e hiperinsulinemia, y los autores encontraron que una acción combinada de metformina y oligofructosa atenúa la liberación de GIP. Estos nuevos hallazgos

confirman que la metformina regula fuertemente las hormonas intestinales GLP-1, PYY y GIP involucradas en la secreción de insulina y este mecanismo podría participar en los efectos de reducción de la glucosa por la metformina²⁶⁰.

La producción de los **ácidos biliares** es modificable por la presencia de metformina, además de ser objetivo del metabolismo microbiano dentro del tracto gastrointestinal. En varios estudios realizados en ratas diabéticas en tratamiento con metformina se cuantificaban niveles de ácidos biliares plasmáticos más elevados. Con tan sólo un día de administración se lograba producir un aumento de concentración total de ácidos biliares. Los más notablemente incrementados fueron los niveles de 7-oxodeoxicólico y 3-ácido deshídrocólico. En otro trabajo en modelo de ratón donde se cuantificaron los ácidos biliares durante cuatro semanas de tratamiento hubo un aumento plasmático de los ácidos biliares totales, primarios, secundarios y no conjugados, aunque no hubo cambios en los niveles cuantificados en heces²⁶⁰²⁶¹. Metformina parece actuar indirectamente estimulando la secreción GLP-1 a través de alteraciones en la reserva de ácidos biliares. Más concretamente, con la inhibición de FXR a nivel de los enterocitos se produce una disminución de la absorción ileal de los ácidos biliares. El aumento de la reserva de ácidos biliares puede estimular los receptores de ácidos biliares TGR5 en las células L y la secreción de GLP-1¹⁰². No obstante, el efecto modulador de glucosa mediado por FXR aún es controvertido y aún no está aceptado por toda la comunidad científica, hay trabajos publicados que tras la inactivación de FXR da como resultado un mejor control de la glucosa y aumento de la secreción de GLP-1. En última instancia, los efectos moduladores del metabolismo glucídico por parte de los ácidos biliares y metformina han revelado que *Bacteroides fragilis* actúa directamente sobre el ácido glicoursodeoxicólico (GUDCA). Metformina inhibe la desconjugación de GUDCA mediante la actividad de la hidrolasa de sales biliares (BSH) de *B. fragilis*, que, a su vez, es promovida por la presencia de metformina²⁶².

La integridad de la **barrera intestinal** se produce a través de una reducción de la producción de LPS. En ratones alimentados con dietas ricas en grasas a los que se le administra metformina reducen los niveles de LPS en plasma, probablemente, por cambios en microbiota intestinal. La administración exógena de LPS bloquea los efectos potenciadores de la metformina sobre el control de la glucosa y la señalización de la insulina. Estos resultados sugieren un papel de la metformina en la modulación de los niveles de LPS en sangre para mejorar la señalización de la insulina y reducir el nivel de glucosa. Otro de los mecanismos estudiados recientemente por dos equipos de investigación considera que AMPK podría desempeñar un papel en el mantenimiento de la integridad de la barrera intestinal. Por lo tanto, la activación mediada por metformina de AMPK podría participar en la disminución de la fuga de LPS desde el intestino⁹⁴²⁵⁷.

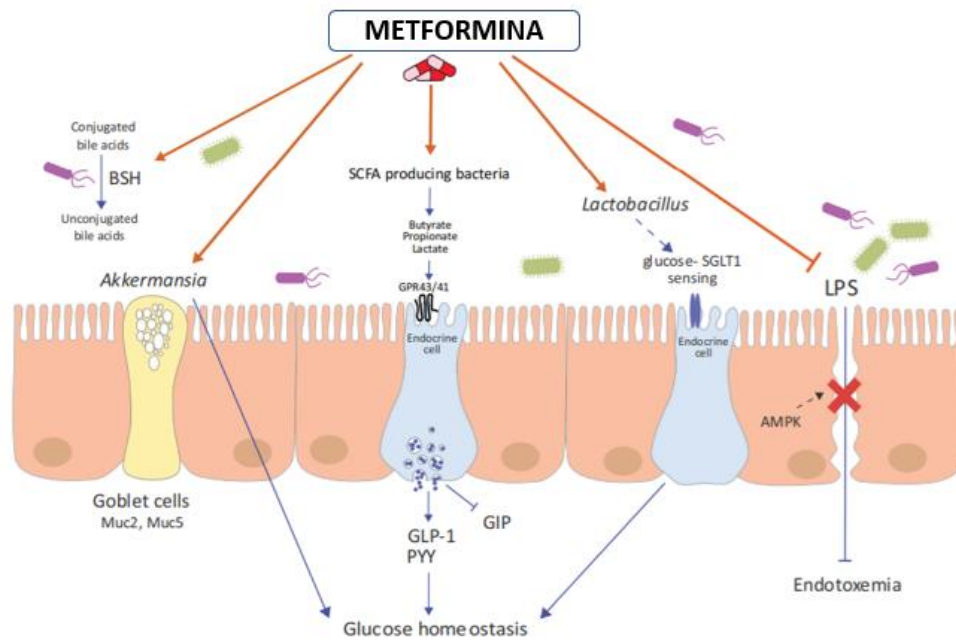


Figura 9. Los principales mecanismos de acción metabólicos de metformina en el control glucídico mediante microbiota intestinal: aumento de bacterias productoras de SFCAs, secreción de péptidos gastrointestinales, regulación de los ácidos biliares, aumento de las células caliciformes, sensor de glucosa SGLT1 y protección de la barrera intestinal. Tomado²⁶³

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1.Hipótesis

La composición de microbiota intestinal en DM2 está alterada, con una disminución de la diversidad bacteriana e incremento de agentes patógenos. El uso de metformina es capaz de inducir modificaciones en el patrón de microbiota intestinal mitigando la disbiosis intestinal. Un porcentaje considerable de pacientes (5-25%) en tratamiento con metformina tienen algún síntoma asociado a los efectos adversos gastrointestinales, pero entre el 1 al 5% terminan discontinuando el tratamiento por intolerancia gastrointestinal. En base a estos supuestos, los pacientes que no toleran la metformina podrían presentar un perfil de microbiota pretratamiento diferente de los que la toleran.

2.Objetivos

2.1.Objetivo general

Evaluar si los pacientes que presentan antecedentes de efectos adversos gastrointestinales por metformina presentan un perfil de microbiota diferente a aquellos pacientes que toleran la metformina durante la titulación del fármaco.

2.2. Objetivos específicos

Objetivo 1. Describir las características basales en composición y funcionalidad de microbiota intestinal de los pacientes con DM2 con antecedentes de intolerancia gastrointestinal a metformina. Comparar con dos grupos controles: pacientes DM2 en tratamiento con metformina de larga data sin sintomatología digestiva asociada y grupo control con síndrome metabólico sin diagnóstico de DM2.

Objetivo 2. Comparar las diferencias en la composición y funcionalidad de microbiota intestinal entre los pacientes que toleran el fármaco en dosis progresivas respecto los que continúan con intolerancia gastrointestinal de forma precoz o durante la titulación del fármaco.

Objetivo 3. Comparar las variables clínica-analíticas de los distintos grupos de estudio durante la reintroducción de metformina.

Objetivo4. Determinar qué porcentaje de pacientes con historia registrada de intolerancia gastrointestinal vuelven a discontinuar el tratamiento por intolerancia gastrointestinal con la reintroducción del fármaco a dosis progresivas.

DISEÑO Y METODOLOGÍA

1. Diseño del estudio

Estudio de intervención prospectivo no aleatorizado donde se han reclutado pacientes con DM2 sin tratamiento con metformina debido a intolerancia gastrointestinal al fármaco. En esta población a estudio se reintroduce metformina en dosis progresivas para reevaluar si hay presencia o ausencia de nuevos síntomas digestivos que obliguen a la discontinuación del tratamiento. La dosis de inicio de metformina se estableció en 425 mg/día, con incremento de dosis de 425 mg/día cada dos semanas hasta llegar a dosis de 1700gr/día; completando 8 semanas de seguimiento. En caso de aparición de diarreas, náuseas, flatulencia, indigestión, vómitos y molestias abdominales de intensidad moderada o grave durante el seguimiento del estudio se procedía a suspender el tratamiento. Se catalogaron como síntomas gastrointestinales leves-moderados si el paciente podía controlar los síntomas sin dificultad para su rutina diaria y se mantenía el tratamiento con metformina. Los efectos adversos gastrointestinales severos se consideraron a la presencia de diarrea persistente asociada con otros síntomas menores en la esfera gastrointestinal (náuseas, dispepsia, meteorismo...) tras iniciar metformina o incrementar dosis y desaparición de estos tras la discontinuación del fármaco (grupos de pacientes con intolerancia gastrointestinal a metformina).

Todos los participantes fueron informados verbalmente de las características y objetivos del estudio previamente a la firma de los formularios de consentimiento informado, participando en el proyecto con pleno conocimiento y aceptación. Además, en la documentación se les cedía teléfonos de contacto para informar a los investigadores la presencia o ausencia de efectos adversos gastrointestinales durante el seguimiento. En todos los casos se recogieron muestras basales de heces (antes de iniciar el fármaco) en conjunto con variables clínicas-analíticas basales. Tras la reintroducción del fármaco en la dosis máxima tolerada (intolerancia gastrointestinal confirmada o tolerancia a metformina) se recogieron de nuevo muestras de heces, además de la evaluación de las variables clínico-analíticas. Sin embargo, en caso de aparición de síntomas gastrointestinales moderados/graves durante los primeros 5 días de inicio de metformina, con dosis de 425 mg/día, se realizaba una única valoración clínica-analítica basal en conjunto con el análisis de las muestras de heces basales, conformando de este modo, el grupo de estudio que denominaríamos intolerancia gastrointestinal temprana. Al grupo de pacientes reclutados en el estudio que presentaron sintomatología gastrointestinal con la exposición más prolongada de metformina o durante la titulación de dosis se les denominó no tolerantes. No se realizaron registro de frecuencias de alimentos, pero todos los pacientes incluidos en el estudio recibieron educación diabetológica antes de iniciar metformina.

2. Ámbito de trabajo

Los pacientes incluidos en el estudio eran DM2 atendidos en las consultas de endocrinología del Hospital Virgen de la Victoria. Se trata de un hospital de tercer nivel con un Centro Periférico de Especialidades asociado. Es centro de referencia del área de la provincia de Málaga y asiste a una población aproximada de 750000 habitantes. En estos pacientes se buscaba en la historia clínica el registro de antecedente de intolerancia a la metformina. El seguimiento de pacientes y controles se ha llevado a

cabo en las consultas de Endocrinología y Nutrición de acuerdo con la práctica clínica habitual.

3. Criterios de inclusión

- Grupo de intervención: sujetos con edades comprendidas entre 18 a 75 años con diagnóstico de DM2, IMC comprendido entre 18,5 kg/m² a 40 kg/m² y ausencia de metformina como tratamiento antidiabético debido a antecedente intolerancia gastrointestinal al fármaco. Los tratamientos antidiabéticos aceptados eran los grupos farmacológicos conformados por aGLP, iSGLT-2, pioglitazona, iDDP4 y/o tratamiento insulínico (tanto sólo insulina basal o como terapia bolo basal).
- Grupo control con DM2: Sujetos con edades comprendidas entre 18 a 75 años con diagnóstico de DM2, IMC entre 18.5 kg/m² a 40 kg/m² en tratamiento con metformina en monoterapia o asociada a otros tratamientos hipoglucemiantes. Los tratamientos antidiabéticos aceptados eran los grupos farmacológicos conformados por aGLP, iSGLT-2, pioglitazona, iDDP4 y/o tratamiento insulínico (tanto sólo insulina basal o como terapia bolo basal).
- Grupo control con síndrome metabólico: Sujetos con edades comprendidas entre 18 a 75 años con diagnóstico de síndrome metabólico sin diagnóstico de DM2 e IMC entre 18.5 kg/m² a 40 kg/m².
- Firma del consentimiento informado evaluado y aprobado por el comité de ética de nuestro centro bajo la conformidad con la declaración de Helsinki (Anexo I)

4. Criterios de exclusión

- Todos los pacientes con diagnóstico de diabetes mellitus tipo 1, diabetes MODY o diabetes LADA.
- Alcoholismo.
- Alergia a metformina.
- Tratamiento concomitante con bloqueadores del receptor H2
- Insuficiencia renal con eGFR < 60 ml/min
- El uso de tratamiento antibiótico de forma concomitante tres meses antes de la inclusión al estudio.
- La toma de probióticos o laxantes que puedan modificar microbiota de los pacientes seleccionados.
- Insuficiencia hepática aguda.
- Insuficiencia cardíaca aguda descompensada.
- Enfermedad inflamatoria intestinal
- Cirugía gastrointestinal (apendicectomía) con una data inferior a tres meses previo a la

inclusión.

- Ninguno de los pacientes incluidos fueron tratados con fármacos que se sabe que afectan la farmacocinética de la metformina in vivo: acarbosa, cefalexina cimetidina, dolutegravir, pirametamina; ranolazine, trimethoprim e inhibidores de la tirosina quinasa
- Revocación del consentimiento informado.

5. Tamaño muestral

Dada la naturaleza exploratoria de este estudio (no hay estudios previos disponibles en alfabetización acerca de la literatura que evalúe las diferencias en microbiota intestinal entre pacientes intolerantes a metformina versus tolerantes), no se realizó una estimación del tamaño de la muestra a priori. Sin embargo, suponiendo que la población de nuestro estudio ya había presentado intolerancia gastrointestinal la incidencia de intolerancia gastrointestinal podría ascender o alcanzar la mitad de los pacientes reclutados. Consideramos que una muestra de 40 pacientes nos permitiría visualizar diferencias preliminares entre los grupos con tolerancia versus intolerancia a metformina. Así pues, se reclutaron un total de 40 pacientes como población control del estudio: 20 controles con DM2 en tratamiento con metformina y 20 controles con síndrome metabólico.

6. Variables del estudio

6.1. Variable principal

- Análisis de las muestras de heces basales y finales

6.2. Variables clínico-demográficas

- Edad
- Sexo
- Alergias medicamentosas
- Años de evolución de la diabetes
- Antecedentes de hábitos tóxicos y de hipertensión arterial
- Complicaciones crónicas de la diabetes
- Tratamiento habitual (número de antidiabéticos orales y uso o no de terapia insulínica)
- Talla (m)
- Peso (Kg)

- Índice de masa corporal (IMC): peso (Kg)/talla (m)²
- Circunferencia abdominal y circunferencia de cadera (cm)
- Presión arterial sistólica y diastólica. Las mediciones de la presión arterial se tomaron tras cinco minutos de reposo, con el paciente sentado y con el brazo derecho colocado a la altura del corazón, (esfigmomanómetro aneroide ELKA®).

6.3. Variables analíticas

Tras un ayuno nocturno mínimo de 8 horas, se obtendrán muestras sanguíneas basales (8:00 horas) de la vena antero cubital, ubicadas en tubos vacuette®, para la determinación de glucosa, HbA1c, creatinina, urea, filtrado glomerular, colesterol total, HDL-c, LDL-c, triglicéridos y función hepática. Para la extracción de bioquímica básica se usaron tubos vacuette® 9ml (Z Serum Clot Activator), para la determinación de glucemia tubos vacuette® 4 ml (FX Sodium Fluoride/Potassium Oxalate).

- Glucosa (mg/dl): se determina en suero mediante el método hexoquinasa en un auto analizador Dimension Vista (Siemens AG). El intervalo de referencia para sujetos sanos es 70-110 mg/dl.
- Creatinina (mg/dl): se determina en suero mediante método picrato alcalino cinético en un autoanalizador Dimension Vista (Siemens AG). El intervalo de referencia para sujetos sanos es 0.5-1.3 mg/dl.
- Colesterol total, HDL-c y LDL-c (mg/dl): se determinan en suero mediante método colesterol oxidasa-esterasa-peroxidasa en un autoanalizador Dimension Vista (Siemens AG). Los niveles de colesterol LDL se calcularon según la ecuación de Friedewald. Los intervalos de referencia para sujetos sanos son 136-270, 32-77 y 74-176 mg/dl, respectivamente
- Triglicéridos (mg/dl): se determinan en suero mediante método punto final bicromático en un autoanalizador Dimension Vista (Siemens AG). El intervalo de referencia para sujetos sanos es 30-200 mg/dl.
- GOT, GPT y GGT (UI/L): se determinan en suero mediante método UV (ultra violeta) P5P para GOT y GPT y método glutamil carboxi nitroanilida para GGT, en un autoanalizador Dimension Vista (Siemens AG). Los intervalos de referencia para sujetos sanos son 10-37, 12-78 y 3-35 UI/L para mujeres y 15-45, 12-78 y 9-69 UI/L para hombres, respectivamente.
- HbA1c (%): se determina en sangre total con EDTA como anticoagulante mediante el método HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) en un autoanalizador Variant Turbo de Bio-Rad. El intervalo de referencia para sujetos sanos es <5.7%.
- PCR (mg/dl): se determina en suero mediante el método de inmunonefelometría en un autoanalizador Dimension Vista (Siemens AG). El intervalo de referencia para sujetos sanos es 3.1- 5.0 mg/dl.

6.4 Análisis bioinformático

Se recolectaron muestras fecales y se almacenaron inmediatamente a - 80 ° C hasta su análisis. La extracción de ADN de las heces se realizó con el kit QIAamp DNA stool Mini (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las concentraciones de ADN se determinaron por absorbancia a 260 nm (A260) y la pureza determinando la relación A260 / A280 con un espectrofotómetro Nanodrop (Nanodrop Technologies). Las secuencias del gen ribosómico 16S rRNA se amplificaron a partir de ADN utilizando el kit 16S Metagenomics Kit (Thermo Fisher Scientific, Italia). El kit incluye dos primeros conjuntos que amplifican selectivamente las regiones hipervariables correspondientes de la región 16S en bacterias: conjunto V2–4–8 y conjunto V3–6, 7–9. Las bibliotecas se crearon utilizando el kit de biblioteca de fragmentos Ion Plus (Thermo Fisher Scientific). Se agregaron códigos de barras a cada muestra utilizando el kit de adaptadores de códigos de barras Ion Xpress (Thermo Fisher Scientific). La PCR en emulsión y la secuenciación de las bibliotecas de amplicones se realizaron en un chip Ion 530 (Ion 530TM Chip Kit) utilizando el sistema Ion Torrent S5TM y el Ion 510 / 520TM / 530TM Kit-Chef (Thermo Fisher Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de la secuenciación, las lecturas de las secuencias individuales se filtraron utilizando Ion Reporter Software V4.0 para eliminar las secuencias policlonales y de baja calidad. Las secuencias que cumplen con nuestros estándares de calidad se tradujeron en variantes de secuencia de amplicones (ASV) utilizando DADA2 con parámetros adaptados para los datos de Ion Torrent dentro del paquete de análisis de microbioma QIIME2 “ Quantitative Insights Into Microbial Ecology”, que también se utilizará para el análisis de diversidad con el complemento de diversidad. El análisis taxonómico se evaluó mediante el ARNr 16S, la creación de perfiles dentro de la herramienta Ion Reporter (Ion Reporter Software 5.12, Thermo fFisher), la agrupación con la base de referencia Greengenes versión 13_5 al 99% de identidad y la biblioteca de referencia seleccionada MicroSEQ® 16S V2013.1 . Las tablas de características en los diferentes niveles de taxones se introdujeron dentro de la herramienta basada en la web MicrobiomeAnalyst tool, donde se realizaron los pasos de normalización y filtrado de datos. Los análisis de abundancia diferencial se evaluaron con LEfSe dentro de MicrobiomeAnalyst con los parámetros predeterminados del desarrollador. Se utilizó el complemento Investigación filogenética de comunidades mediante la reconstrucción de estados no observados (PICRUST2) para predecir la función del metagenoma dentro de QIIME2. Las vías MetaCyc se normalizaron dentro de QIIME2 y se analizaron después con STAMP .

6.5 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos de las variables clínico-analíticas se realizó en el programa SPSS (versión 22.0.0, para Windows; SPSS Ibérica, España). Así pues, se utilizaron la prueba de Wilcoxon por pares para diferenciar entre dentro del mismo grupo, y la prueba de Kruskal-Wallis con la prueba post hoc de Bonferroni para distinguir entre los tres grupos diferentes. La evaluación de las diferencias entre las variables cualitativas se realizó con la prueba de Chi-cuadrado o exacta de Fisher. Para el análisis de microbiota, las diferencias de diversidad beta se establecieron con las distancias UniFrac seguidas de la prueba de análisis de varianza multivariante permutacional (PERMANOVA) utilizando 999 permutaciones en QIIME2. Para el análisis de diversidad alfa, se utilizaron pruebas no paramétricas U de Mann-Whitney

U o Kruskal-Wallis para encontrar diferencias entre los índices: una serie de ASV observados para la riqueza, el índice de Pileau para la uniformidad y, finalmente, el índice de Shannon y Índice de diversidad filogenética de Faith. La abundancia diferencial en cada nivel taxonómico se evaluó con un tamaño de efecto de análisis discriminante lineal (LEfSe). Específicamente, primero usamos la prueba de rango de suma de Kruskal Wallis para detectar características con abundancia diferencial significativa con respecto a la clase de interés. La consistencia biológica es posteriormente evaluada usando la prueba de suma de rangos de Wilcoxon (no emparejada). Como último paso, LEfSe utiliza LDA score para estimar el tamaño del efecto de cada característica diferencialmente abundante. Los taxos que se consideraron con diferencias estadísticamente significativas entre grupos se determinaron con p-valor $<0,05$ y valores LDA score ≥ 2 . Por otro lado, las abundancias de las vías metabólicas de Metacyc (base de datos de enzimas y vías metabólicas aclaradas experimentalmente) entre los grupos de estudio fueron inferidas con PICRUST (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserve States), para seguidamente ser identificadas dentro de STAMP mediante la prueba H de Kruskal-Wallis, la prueba t de Welch o prueba Wilcoxon signed test, según el momento y los grupos evaluados. Se utilizó el p valor $<0,05$ en el análisis longitudinal o transversal en la población de intervención para definir diferencias. En el análisis transversal con los grupos de control se consideraron diferencias significativas las vías metabólicas que alcanzaron p valor $<0,005$. En cambio, para definir diferencias estadísticamente significativas en el análisis de las vías por pares dentro de la población de intervención definimos p valor $<0,10$. Por último, se desarrolló un análisis adicional de diferencias por pares con taxones y vías de interés mediante el uso del complemento longitudinal en QIIME2.

6.7. Plan de trabajo

El plan de trabajo se dividió en una valoración basal; contacto telefónico cada 2 semanas con la población reclutada para determinar si había presencia de síntomas gastrointestinales tras inicio de metformina; o hasta cumplimentar 60 días, en caso de tolerancia a dosis de 1700mg/día.

- **Valoración basal:** Información sobre el estudio y obtención del consentimiento. Anamnesis. Tomas de variables y muestras biológicas. Educación diabetológica. Asignación terapéutica: se inició el tratamiento con metformina 425mg/día y se aumentó en dosis progresivas según tolerancia en aquellos sujetos con antecedentes de síntomas gastrointestinales con el uso del fármaco.
- **Valoración final:** Tras los 60 días dónde se iba escalando la dosis de metformina iniciando con medio comprimido de 850 mg y aumentando cada 2 semanas hasta llegar a 1700mg/día o en el momento en que los síntomas gastrointestinales impidieran continuar con el tratamiento

RESULTADOS

1. Características generales de la población a estudio

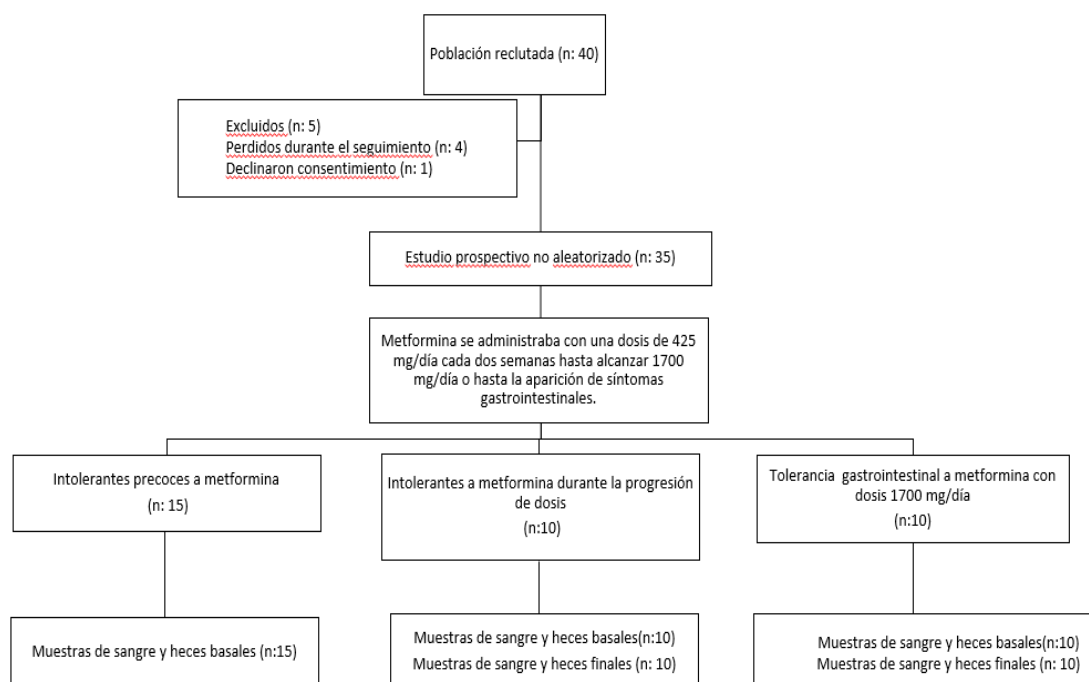


Figura 10. Diagrama de flujo del estudio de intervención

Se incluyeron un total de 40 pacientes DM2 con antecedentes de intolerancia gastrointestinal a metformina con el objetivo de introducirla de nuevo en dosis crecientes. Al final de la intervención, una vez eliminadas las pérdidas del estudio, obtuvimos a 25 pacientes con intolerancia a metformina confirmada. Sólo 10 pacientes pudieron progresar hasta la dosis de metformina 1700mg/d, por lo cual a este grupo se los clasificó en falsos intolerantes o tolerantes a metformina (TOL). Por otro lado, se dividieron a los intolerantes a metformina en dos subgrupos según la inmediatez de los síntomas gastrointestinales. Si los síntomas gastrointestinales severos comenzaron con las dosis iniciales durante los primeros cinco días se clasificaron como intolerantes a precoces o tempranos a metformina (INT), se incluyeron 15 pacientes en este grupo. Sin embargo, si toleraron la dosis inicial de 425 mg/día, pero no progresaron hasta la dosis de 1700 mg/día por aparición de síntomas compatibles con intolerancia gastrointestinal se clasificaron en el grupo intolerantes a metformina durante la titulación o progresión de dosis (NOTOL) y conformaron una población de 10 pacientes. Se incluyeron 6 pacientes con intolerancia gastrointestinal a la metformina al iniciar la dosis de 850mg/día, 3 pacientes que discontinuaron al alcanzar la dosis de 1275 mg/día y uno solo paciente tuvo que discontinuar el fármaco con la dosis de 1700 mg/día. En los subgrupos de pacientes TOL y NOTOL se tomaron muestras de sangre y de microbiota intestinal tanto antes de iniciar el fármaco (visita basal) como al finalizar la titulación de dosis (visita final). En el subgrupo de INT solo recogimos muestras de sangre y microbiota basal hipotetizando que no habría suficiente exposición al tratamiento con metformina como para visualizar diferencias significativas.

1.1. Variables cualitativas

Visita basal	TOL (1)	INT (2)	NOTOL (3)	P (1-2)	P (1-3)	P (2-3)
n	10	15	10			
Sexo(M/H)	5/5	11/4	8/2	0,397	0,355	1
Hábito tabáquico(%)						
No Fumador	80(8)	86,7(13)	70(7)			
Exfumador	10(1)	6,7(1)	0	0,906	0,233	0,233
Fumador	10(1)	6,7(1)	30(3)			
Hipertensión arterial (%)						
No	90(9)	53 (8)	70(7)	0,088	0,528	0,678
Sí	10 (1)	47(7)	30(3)			
Retinopatía diabética (%)						
No	80(8)	80(12)	90(9)	1	1	0,626
Sí	20(2)	20 (3)	10(1)			
Nefropatía diabética (%)						
No	70(7)	86,7 (13)	100(10)	0,358	0,218	0,500
Sí	30 (3)	13,3 (2)	0			

Tabla 5. Diferencias en las variables clínicas cualitativas entre los grupos de pacientes tolerantes a metformina (TOL), intolerantes precoces a metformina (INT) e intolerantes a metformina durante la progresión de dosis (NOTOL).

La evaluación de las diferencias entre las variables cualitativas entre los grupos de estudio mediante la prueba de Chi-cuadrado o exacta de Fisher no obtuvo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

Visita basal	TOL	INT y NOTOL	P
n	10	25	
Sexo(M/H)	5/5	19/6	0,138
Hábito tabáquico(%)			
No Fumador	80(8)	80(20)	
Exfumador	10(1)	4(1)	0,73
Fumador	10(1)	16(4)	
Hipertensión arterial (%)			
No	90(9)	60(15)	0,12
Sí	10 (1)	40(10)	
Retinopatía diabética (%)			
No	80(8)	84(21)	1
Sí	20(2)	16(4)	
Nefropatía diabética (%)			
No	70(7)	92 (23)	0,128
Sí	30 (3)	8(2)	

Tabla 6. Diferencias en las variables clínicas cualitativas entre los grupos de pacientes tolerantes a metformina (TOL) respecto al conjunto total de pacientes incluidos como intolerantes a metformina (INT y NOTOL).

La evaluación de las diferencias entre las variables cualitativas entre los grupos de estudio mediante la prueba de Chi-cuadrado o exacta de Fisher no obtuvo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

Visita basal	TOL (1)	INT (2)	NOTOL (3)	P (1-2)	P (1-3)	P (2-3)	P (1-2-3)
n	10	15	10				
aGLP1(%)							
Sí	40(4)	40(6)	40(4)	1	1	0,69	0,86
No	60(6)	60(9)	60(6)				
Glinidas (%)							
Sí	20(2)	0	10(1)	1	0,1	0,345	0,15
No	80(8)	100(15)	90(9)				
Glitazonas (%)							
Sí	0(0)	6,7(1)	0(0)	0,53	1	0,53	0,33
No	100(10)	93,3(14)	100(10)				
iDPP4 (%)							
Sí	20(2)	26,7(4)	20(2)	0,628	0,667	0,86	0,57
No	80(8)	73,3(11)	80(8)				
Insulina (%)							
Sí	50(5)	40(6)	30(3)	0,65	0,65	0,7	0,71
No	50(5)	60(9)	70(7)				
iSGLT2 (%)							
Sí	20(2)	40(6)	40(4)	0,628	0,402	0,69	0,62
No	80(8)	60(9)	60(6)				
Sulfonilureas (%)							
Sí	40(4)	26,7(4)	40(4)	1	1	0,7	0,11
No	60(6)	73,3(11)	60(6)				
Número ADO (%)							
Ninguno	10(1)	13,3(2)	30(3)				
Uno	50(5)	46,7(7)	50(5)	0,307	0,807	0,26	0,46
Dos	40(4)	33,3(5)	20(2)				
Tres	0(0)	6,7 (1)	0(0)				

ADOs: antidiabéticos orales

Tabla 7. Diferencias en los tratamientos antidiabéticos entre los grupos de pacientes tolerantes a metformina (TOL), intolerantes precoces a metformina (INT) e intolerantes a metformina durante la progresión de dosis (NOTOL).

La evaluación de las diferencias en la distribución de antidiabéticos entre los grupos de estudio mediante la prueba de Chi-cuadrado o exacta de Fisher no obtuvo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

Visita basal	TOL	INT y NOTOL	P
<i>n</i>	10	25	
aGLP1(%)			
Sí	40(4)	40(10)	1
No	60(6)	60(15)	
Glinidas(%)			
Sí	20(2)	4(1)	
No	80(8)	96 (24)	0,19
Glitazonas(%)			
Sí	0(0)	4(1)	1
No	100(10)	96(24)	
iDPP4(%)			
Sí	20(2)	26,7	0,686
No	80(8)	83,3	
Insulina (%)			
Sí	50(5)	36(9)	0,474
No	50(5)	64(16)	
iSGLT2(%)			
Sí	20(2)	40(10)	0,432
No	80(8)	60(15)	
Sulfonilureas (%)			
Sí	40(4)	40(10)	1
No	60(6)	60(15)	
Número de ADOs (%)			
Ninguno	10(10)	8(2)	
Uno	50(5)	40(10)	0,847
Dos	30(3)	40(10)	
Tres	0(0)	12(3)	

ADOs: antidiabéticos orales

Tabla 8. Diferencias en los tratamientos antidiabéticos entre los grupos de pacientes tolerantes a metformina (TOL) respecto al conjunto total de pacientes incluidos como intolerantes a metformina

La evaluación de las diferencias en la distribución de antidiabéticos entre los grupos de estudio mediante la prueba de Chi-cuadrado o exacta de Fisher no obtuvo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

1.2. Variables cuantitativas

Visita basal	TOL (1)	INT (2)	NOTOL (3)	P (1-2)	P (1-3)	P (2-3)	P (1-2-3)
	Media±SD	Media±SD	Media±SD				
n	10	15	10				
Edad(años)	63,8±11,05	61,93±8,09	63,6±13,72	0,605	1	0,461	0,74
Evolución(años)	13,8±10,43	10,53±8,77	11,4±5,17	0,912	0,912	0,531	0,65
Peso(kg)	80,59±8,8	81,75±21,08	84,75±13,78	0,807	0,481	0,849	0,77
IMC (kg/m2)	30,2±4,10	31,6±7,81	33,8±4,76	0,849	0,063	0,495	0,67
Cintura(cm)	105,25±9,168	106,37±19,35	109,95±10,46	0,807	0,436	0,723	0,2
Cadera(cm)	109,95±10,237	126,07±21,57	117,6±8,17	0,683	0,105	0,397	0,57
PAS (mmHg)	141,6±22,27	142,73±29,97	124,4± 15,82	0,144	0,105	0,807	0,75
PAD (mmHg)	72,75±8,9	70,1±14,12	69,7±9,55	0,605	0,436	0,935	0,77

SD: Desviación estándar

PAS: Presión arterial sistólica; PAD: Presión arterial diastólica.

Evolución: Tiempo desde el diagnóstico de DM hasta la inclusión del estudio.

Tabla 9. Variables clínico-antropométricas recogidas en la visita basal. Comparación entre los grupos de pacientes catalogados durante el estudio de intervención como tolerantes a metformina (TOL), intolerancia temprana a metformina (INT) e intolerantes a metformina durante la progresión de dosis del fármaco (NOTOL).

En el análisis no paramétrico de los grupos por parejas dos a dos (test U- Mann Whitney) o los tres subgrupos de estudio (test Kruskal-Wallis) no hubo diferencias estadísticamente significativas en las variables clínico-antropométricas analizadas ($p < 0,05$).

	NOTOL		TOL		P	P	P
	V. Basal (A)- V. Final (B)		V. Basal (C)-V. Final (D)		A-B	B-D	C-D
	Media±SD	Media±SD	Media±SD	Media±SD			
n	10	10	10	10			
Peso (kg)	80,59±8,8	80,47±8,52	84,75±13,78	84,55±14,31	0,767	0,579	0,760
IMC (kg/m²)	30,2±4,10	30,34±4,19	33,8±4,76	33,53±5,19	0,674	0,123	0,721
Cintura (cm)	105,25±9,168	104,5±11,71	109,95±10,46	108,4±11,65	0,207	0,529	0,601
Cadera (cm)	109,95±10,237	110,15±11,43	117,6±8,17	116,4±10,07	0,27	0,315	0,67
PAS (mmHg)	141,6±22,27	138,55±24,62	124,4± 15,82	130±12,89	0,161	0,218	0,241
PAD (mmHg)	72,75±8,9	73,1±9,93	69,7±9,55	78,15±11,46	0,092	0,796	0,813

SD: Desviación estándar

PAS: Presión arterial sistólica; PAD: Presión arterial diastólica.

Tabla 10. Comparación de las variables analíticas en el análisis longitudinal de los grupos tolerante a metformina (TOL) versus intolerante durante la progresión de dosis (NOTOL) y comparación del punto final entre ambos grupos.

En el análisis no paramétrico de los grupos de forma longitudinal no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en las variables analíticas analizadas (test Wilcoxon) y ni tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos en la visita final (test U- Mann Whitney)

Visita basal	TOL	INT	NOTOL	P	P	P	P
	(1)	(2)	(3)	(1-2)	(1-3)	(2-3)	(1-2-3)
	Media±SD	Media±SD	Media±SD				
n	10	15	10				
Glucosa(mg/dl)	148,2±44,13	142,73±29,97	159,5±45,53	0,605	0,579	0,723	0,88
Cr(mg/dl)	0,89±0,187	0,85±0,23	1,1±0,47	0,723	0,393	0,144	0,33
Urea (mg/dl)	39,2±10,18	40,8±14,31	55,5±26,81	0,807	0,218	0,196	0,56
FG (ml/min)	60,7±13,59	61,59±15,23	55,86±7,5	0,978	0,481	0,461	0,69
GOT(UI/L)	26,4±5,94	24,07±6,19	21,4±3,37	0,397	0,063	0,216	0,55
GPT(UI/L)	44,2±8,12 ^a	34,33±9,98 ^b	28,8±6,8 ^{ab}	0,026	0,000	0,16	0,004
GGT(UI/L)	47,2±22,74	38,47±47,89	31,6±21,44	0,08	0,143	0,605	0,16
TG (mg/dl)	145,3±95,04	187,47±92,83	200,4±119,15	0,177	0,280	0,280	0,35
Colesterol(mg/dl)	178,9±24,46	186,13±44,06	162,3±42,21	0,461	0,436	0,177	0,34
LDL (mg/dl)	96,26±13,9	98,16±37,09	80,74±32,3	0,849	0,315	0,177	0,92
HDL (mg/dl)	53,5±10,4	50,4±15,22	46,7±8,96	0,495	0,105	0,723	0,38
Hb1Ac (%)	7,35±0,89	7,54±0,93	7,43±0,64	0,605	0,912	0,892	0,91

SD: Desviación estándar.

GOT: aspartato aminotransferasa; GPT: alanina aminotransferasa; GGT: gamma glutamil transferasa; Cr: creatinina, FG: filtrado glomerular; TG: triglicéridos; HDL: lipoproteínas de alta densidad; LDL: lipoproteínas de baja densidad.

El p-valor se basó en el test de U -Mann Whitney en la comparación a dos grupos y la prueba de Kruskal Wallis en para la comparación entre los tres grupos con análisis post hoc de Bonferroni. Letras diferentes en una misma fila indican diferencias entre grupos con una p<0.05

Tabla 11. Variables analíticas recogidas en la visita basal. Comparación entre los grupos de pacientes catalogados durante el estudio de intervención como tolerantes a metformina (TOL), intolerancia temprana a metformina (INT) e intolerantes a metformina durante la progresión de dosis del fármaco (NOTOL).

En la comparación a tres grupos solo se observaron diferencias a nivel de los valores de GPT, que fueron significativamente superiores en el grupo TOL (44,2±8,12 vs 34,33±9,98 vs 28,8±6,8 UI, p= 0,004). Las diferencias se mantuvieron en el análisis por parejas entre TOL vs INT o TOL vs NOTOL (p=0,026 y p=0,00), sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre las muestras de los dos subgrupos de intolerantes a metformina (p=0,16)

	NOTOL		TOL		P	P	P
	V. Basal (A)-V. Final(B)		V. Basal (C)-V. Final (D)		A-B	B-D	C-D
	Media±SD	Media±SD	Media±SD	Media±SD			
n	10	10	10	10			
Glucosa(mg/dl)	159,5±45,53	149,22±28,36	148,2±44,13	130,7±28,03	0,788	0,278	0,126
Cr(mg/dl)	1,1±0,47	1,04±0,34	0,89±0,187	0,85±0,21	1	0,815	0,172
Urea (mg/dl)	55,5±26,81	42±18	39,2±10,18	42±12,89	0,116	0,529	0,105
FG (ml/min)	55,86±7,5	62,14±7	60,7±13,59	53,0±17,3	0,163	1	0,161
GOT(UI/L)	21,4±3,37	24,33±1,78	26,4±5,94	28,4±13,47	0,075	0,666	0,724
GPT(UI/L)	28,8±6,8	27,33±7,48	44,2±8,12	44,3±18,89	0,916	0,035	0,859
GGT(UI/L)	31,6±21,44	31,78±20,22	47,2±22,74	43±28,7	0,462	0,400	0,455
TG (mg/dl)	200,4±119,15	188,11±103	153±95,7	145,3±95,04	0,866	0,400	0,386
Colesterol(mg/dl)	162,3±42,21	175,56±49,5	178,9±24,46	168,3±27,78	0,018	0,661	0,169
LDL (mg/dl)	80,74±32,3	86,76±39,86	96,26±13,9	84,6±21,65	0,043	0,968	0,032
HDL (mg/dl)	46,7±8,96	41,8±15,96	53,5±10,4	53±17,3	0,353	0,278	0,475
Hb1Ac (%)	7,43±0,64	7,38±0,43	7,35±0,89	7,12±0,78	0,833	0,549	0,495

SD: Desviación estándar

El p-valor se basó en la prueba de U -Mann Whitney en la comparación a dos grupos y la prueba de Wilcoxon para las comparaciones en el mismo grupo. El valor $p < 0,05$ indica diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

Tabla 12. Comparación entre las variables analíticas basales y finales de los grupos TOL e intolerantes que sí superaron dosis mínimas del fármaco (A-B y C-D).

El grupo de pacientes con tolerancia metformina en el análisis longitudinal de las variables analíticas solo mostraron cambios estadísticamente significativos en el metabolismo lipídico (LDL basal 96,26±13,9 mg/dl vs LDL final 84,6±21,65 mg/dl, $p=0,035$). Sin embargo, en el metabolismo glucídico los valores medios de glucemia media en ayunas y Hb1Ac se muestran menores en la extracción sanguínea final respecto a visita inicial sin ser estadísticamente significativos. En el grupo de intolerantes a metformina que sí toleraron dosis mínimas del fármaco y finalizaron el estudio con extracción sanguínea y muestras de heces finales se observan también cambios en el metabolismo lipídico presentando niveles superiores en la visita final (LDL basal 80,74±32,3 mg/dl vs LDL final 86,76±39,86 mg/dl y colesterol total basal 162,3±42,21 mg/dl vs colesterol total final 175,56±49,5 mg/dl). En este grupo tampoco se observan cambios en metabolismo glucídico debido a que las dosis toleradas a metformina o la discontinuación del fármaco impidieron la acción terapéutica del fármaco. Por último, al visualizar la presencia de cambios en las variables analíticas en visita final de ambos grupos se vuelven a observar niveles superiores de GPT entre los tolerantes versus a los dos subgrupos de pacientes con intolerancia a metformina (GPT 27,33±7,48 Ui vs GPT 44,3±18,89, $p=0,035$).

2. Comparación de variables clínicas-analíticas entre todos los intolerantes a metformina y los grupos controles: diabetes mellitus tipo 2 en tratamiento con metformina y controles sin diabetes.

	Intolerantes a metformina	DM2 con metformina	Controles sin diabetes	p
	Media±SD	Media±SD	Media±SD	
n	25	20	20	
Hombre (%)	24(6)	50(10)	50(10)	0,115
Mujer(%)	76(19)	50(10)	50(10)	
Peso(kg)	82,95±18,24	92,81±14,7	90,295±11,27	0,214
IMC (kg/m2)	32,48±6,73	34,38±2,79	32,98±3,2	0,4
Cintura(cm)	107,8±16,1	114,8±8,86	112±7,22	0,291
Cadera(cm)	114,16±13,47	115,99±8,16	112,07±7,22	0,217
PAS (mmHg)	125,4± 19,13 ^a	139±22,12 ^{ab}	140,9±14 ^b	0,03
PAD (mmHg)	77,48±12,12	72,45±8,9	77,05±9,53	0,121

SD: Desviación estándar.

PAS: Presión arterial sistólica; PAD: Presión arterial diastólica.

El p-valor en las variables cuantitativas se basó en la prueba de Kruskal Wallis o ANOVA de un factor según normalidad y homogeneidad de las varianzas de las variables con análisis post hoc de Bonferroni. Letras diferentes en una misma fila indican diferencias entre grupos con una $p < 0.05$. En la variable sexo se utilizó test Chi-cuadrado.

Tabla 13. Comparación de variables clínico-antropométricas entre todos los pacientes intolerantes a metformina respecto a los grupos controles.

Las cifras de PAS fueron numéricamente diferentes entre los tres grupos ($p=0,03$) y en el análisis post-hoc el grupo control presentaba valores medios mayores respecto a los pacientes con intolerancia a metformina (140,9±14 mmHg vs 125,4± 19,13 mmHg)

	Intolerancia a metformina	DM2 con metformina	Controles sin diabetes	p
	Media±SD	Media±SD	Media±SD	
n	25	20	20	
Glucosa(mg/dl)	149,44±37 ^a	127,65± 28,75 ^a	101,9±8,7 ^b	0,000
Cr(mg/dl)	0,95±0,36	0,8± 0,26	0,85±0,185	0,492
Urea (mg/dl)	46,68±21,05	42,55±10,65	35,15±8,42	0,101
FG (ml/min)	59,30± 2,8	50,94±9,56	67,02±2,84	0,33
GOT(UI/L)	23±5,33 ^a	18,6±4,91 ^b	21,7±8,74 ^{ab}	0,022
GPT(UI/L)	32,12±9,11	31,15±11,26	32,7±14,92	0,839
GGT(UI/L)	35,72±39	50,2±108	59,4±68,45	0,054
TG (mg/dl)	192,64±101,95 ^{ab}	135,5±52,53 ^a	201±88 ^b	0,016
Colesterol(mg/dl)	176,6± 44,07 ^a	181,75±36,147 ^a	215±34,63 ^b	0,003
LDL (mg/dl)	91,19±35,54 ^a	105±32,7 ^a	131,55±32,28 ^b	0,003
HDL (mg/dl)	48,92±12,98	49,6±12,45	45,46±10,76	0,57
Hb1Ac (%)	7,54±0,87 ^a	6,81±0,87 ^a	5,57±0,269 ^b	0,000

SD: Desviación estándar

GOT: aspartato aminotransferasa; GPT: alanina aminotransferasa; GGT: gamma glutamil transferasa; Cr: creatinina, FG: filtrado glomerular; TG: triglicéridos; HDL: lipoproteínas de alta densidad; LDL: lipoproteínas de baja densidad

El p-valor se basó en la prueba de Kruskal Wallis o ANOVA de un factor según normalidad y homogeneidad de las varianzas de las variables con análisis post hoc de Bonferroni. Letras diferentes en una misma fila indican diferencias entre grupos con una $p < 0.05$

Tabla 14. Comparación de variables analíticas entre todos los pacientes intolerantes a metformina respecto a los grupos controles.

El metabolismo hidrocarbonado presenta diferencias significativas con valores medios mayores en glucemia plasmática en ayunas entre los dos grupos con diabetes (intolerantes y diabéticos con metformina) respecto al grupo control (149,4±44 mg/dl vs 127,65± 28,75 mg/dl vs 101,9±8,7 mg/dl, $p=0,000$). Los niveles de Hb1Ac también se muestran significativamente mayores respecto al grupo control (7,54±0,87% vs 6,81±0,87% vs 5,57±0,269 %, $p=0,000$). En el metabolismo lipídico el grupo diabéticos con metformina y el grupo de intolerantes a metformina presentan valores significativamente más bajos de colesterol total (176,6±44,07 mg/dl vs 181,75±36,147 vs 215±34,63 mg/dl, $p=0,003$) y LDL (91,19±35,54 mg/dl vs 105±32,7mg/dl vs 131,55±32,2 mg/dl, $p=0,003$), respecto al grupo control sin diabetes. Sin embargo, los niveles de TG se mostraron inferiores en el grupo con metformina respecto al

grupo control (192,64±101,95 mg/dl vs 135,5±52,53 mg/dl vs 201±88 mg/dl, p=0,016). Por último, a nivel del metabolismo hepático los niveles medios de GOT difieren entre los grupos. Los valores medios son numéricamente mayores y estadísticamente significativos entre los intolerantes a metformina sobre los diabéticos con metformina (23±5,33 vs UI 18,6±4,91vsUI 21,7±8,74UI, p = 0,022).

3.Diferencias basales en microbiota intestinal según tolerancia a metformina en el estudio de intervención: tolerantes a metformina, intolerancia gastrointestinal precoz a metformina e intolerantes a metformina durante la progresión de dosis

3.1 Filos

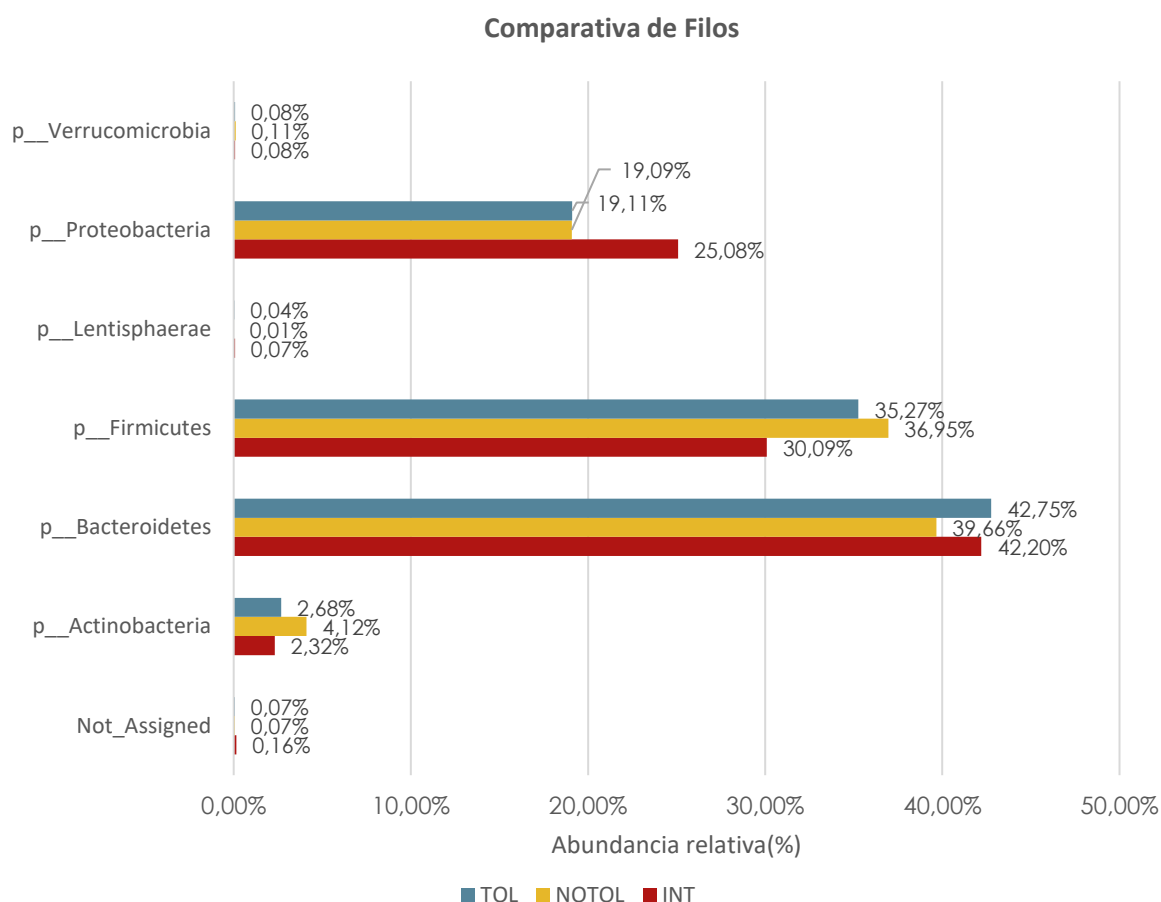


Figura 11. Filos bacterianos secuenciados en las muestras de los grupos: tolerantes (TOL), intolerantes a dosis iniciales o temprana (INT) e intolerantes a metformina que sí superan dosis iniciales del fármaco (NOTOL) en situación basal. Los datos se muestran en % de abundancia relativa.

En la figura 11 se muestran los Filos más abundantes secuenciados en los tres grupos. El Filo Bacteroidetes presentó valores medios de abundancia relativa de 37,96% en el grupo TOL, 41,58% entre los INT y 43,6% en el grupo NOTOL; sin alcanzar diferencias estadísticamente significativas (p=0,67). El Filo Firmicutes presentó una abundancia relativa del 34,2% en el grupo TOL, 35,95% dentro del grupo INT y 38,2% en el grupo NOTOL; sin diferencias estadísticas significativas entre grupos (p=0,64). El Filo Actinobacteria tuvo

una presencia de abundancia relativa entre las muestras fecales del grupo TOL del 2,24%, 2,14% en el grupo INT y 3,14% en el grupo NOTOL; sin diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p=0,98$). E filo Proteobacteria presenta una abundancia relativa en el grupo TOL de 18,5%, 16,9% en el grupo INT y 18,4% en el grupo NOTOL; sin diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p=0,95$). Lentisphaerae presenta valores medios de abundancia relativa de 0,03% en el grupo TOL, 0,05 % en el grupo INT y 0,04% en el grupo NOTOL; sin diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p=0,94$). Por último, Verrucomicrobia presenta una abundancia relativa del 0,03% en las muestras fecales del grupo TOL, 0,05% en el grupo INT y 0,11% en el grupo NOTOL; sin diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p=0,89$).

Abundancia relativa: Filos	INT		NOTOL		p	LDA score
	Media	SD(\pm)	Media	SD(\pm)		
<i>n</i>	15		10			
<i>p__Actinobacteria</i> (%)	2,24	2,16	3,14	4,36	0,956	
<i>p__Bacteroidetes</i> (%)	41,58	12,93	37,96	11,43	0,318	
<i>P__Cyanobacteria</i> (%)	0,35	0,88	0,02	0,04	0,047	-3,15
<i>p__Firmicutes</i> (%)	34,22	7,66	38,21	13,54	0,657	
<i>p__Lentisphaerae</i> (%)	0,05	0,11	0,04	0,04	0,738	
<i>p__Proteobacteria</i> (%)	18,45	15,43	18,59	9,68	0,579	
<i>p__Verrucomicrobia</i> (%)	0,03	0,09	0,11	0,2	0,700	
<i>P__Not Assigned</i> (%)	2,23	5,65	1,2	1,47	1	

SD: Desviación estándar

Tabla 15. Comparativa de la abundancia relativa de Filos presentes en las muestras fecales basales entre los dos subgrupos de intolerancia a metformina confirmada tras la introducción del fármaco según protocolo. El LDA score es el valor otorgado por el LEfSe (análisis discriminante lineal, efecto-tamaños) que se expone sólo en los casos de Filos que hayan arrojado un $p<0,05$ y $LDA\geq 2$.

La herramienta del LEfSe determina las características (organismos, clases, unidades taxonómicas operativas, genes o funciones) que tienen más probabilidades de explicar las diferencias entre clases mediante el acoplamiento de pruebas estándar de significación estadística con pruebas adicionales que codifican la consistencia biológica y la relevancia del efecto. Los resultados arrojados en la tabla 1 determinan que el Filo Cyanobacteria presenta una abundancia relativa superior a nivel del grupo de INT ($0,35\pm 0,88\%$ vs $0,02\pm 0,04\%$, $p=0,47$) con un LDA score -3,15.

Abundancia relativa: Filos	INT		TOL		p
	Media	SD(±)	Media	SD(±)	
<i>n</i>	15		10		
<i>p__Actinobacteria</i> (%)	2,24	2,16	2,14	1,77	0,956
<i>p__Bacteroidetes</i> (%)	41,58	12,93	43,62	7,78	0,579
<i>P_Cyanobacteria</i> (%)	0,35	0,88	0,15	0,37	0,160
<i>p__Firmicutes</i> (%)	34,22	7,66	35,94	7,97	0,244
<i>p__Lentisphaerae</i> (%)	0,05	0,11	0,03	0,05	0,541
<i>p__Proteobacteria</i> (%)	18,45	15,43	16,99	8,44	0,824
<i>p__Verrucomicrobia</i> (%)	0,03	,09	0,05	0,09	0,700
<i>P_Not Assigned</i> (%)	2,23	5,65	0,92	1,34	0,08

SD: Desviación estándar

Tabla 12. Comparativa de la abundancia relativa de FILOS presentes en las muestras fecales basales entre los intolerantes a metformina precoces (INT) y los tolerantes a metformina durante el estudio de intervención (TOL).

No se expone el valor de LDA score extraído del LEfSe porque no ha habido diferencias significativas ($p < 0,05$) durante el análisis no paramétrico entre los grupos.

3.2 Familias

Abundancia relativa:Familia	INT		TOL		NOTOL		P
	Media	SD(±)	Media	SD(±)	Media	SD(±)	
<i>n</i>	15		10		10		
<i>Acidaminococcaceae</i> (%)	3,08	4,33	2,69	2,47	1,57	1,63	0,680
<i>Bacillaceae</i> (%)	0,10	0,21	0,02	0,04	0,03	0,07	0,862
<i>Bacteroidaceae</i> (%)	24,95	13,98	20,87	14,26	27,73	13,09	0,495
<i>Bifidobacteriaceae</i> (%)	1,35	1,76	1,27	1,28	2,13	3,53	0,831
<i>Brucellaceae</i> (%)	0,10	,29	0,22	0,66	0,36	0,91	0,882
<i>Christensenellaceae</i> (%)	0,07	,17	0,08	0,20	0,07	0,13	0,949
<i>Clostridiaceae</i> (%)	2,73	1,89	1,71	1,76	1,90	1,21	0,068

<i>Coriobacteriaceae</i> (%)	0,74	0,84	0,71	0,65	0,87	1,34	0,733
<i>Desulfovibrionaceae</i> (%)	3,98	3,09	5,16	4,01	4,08	3,03	0,748
<i>Enterobacteriaceae</i> (%)	10,78	19,01	5,55	6,64	9,52	10,88	0,372
<i>Erysipelotrichaceae</i> (%)	,50	,88	,47	,76	1,38	2,22	0,217
<i>Eubacteriaceae</i> (%)	2,46	1,84	3,27	2,17	4,48	4,30	0,475
<i>Gracilibacteraceae</i> (%)	0,26	0,73	0,06	0,07	,43	1,16	0,278
<i>Hyphomicrobiaceae</i> (%)	1,35	1,84	0,85	1,16	1,01	1,30	0,907
<i>Lachnospiraceae</i> (%)	9,05	3,38	10,91	5,25	10,67	10,19	0,507
<i>Lactobacillaceae</i> (%)	1,33	2,98	1,43	1,98	1,02	1,12	0,670
<i>Magnetococcaceae</i> (%)	0,06	0,16	0,04	0,11	0,20	0,44	0,379
<i>Oscillospiraceae</i> (%)	0,52	0,56	0,63	0,89	0,54	0,69	0,999
<i>Oxalobacteraceae</i> (%)	0,19	0,37	0,34	0,52	0,09	0,16	0,468
<i>Pasteurellaceae</i> (%)	0,41	1,14	1,12	2,35	0,91	1,70	0,779
<i>Peptococcaceae</i> (%)	0,23	0,38	0,03	0,07	0,32	0,85	0,418
<i>Peptostreptococcaceae</i> (%)	0,08	0,16	0,12	0,19	0,14	0,23	0,490
<i>Porphyromonadaceae</i> (%)	8,83	7,20	5,62	3,64	5,98	5,35	0,524
<i>Prevotellaceae</i> (%)	9,50	12,40	16,79	17,27	4,51	10,00	0,102
<i>Rhodospirillaceae</i> (%)	0,87	1,97	0,51	1,47	1,48	3,70	0,280
<i>Rikenellaceae</i> (%)	2,76	2,56	4,15	5,65	2,45	2,13	0,972
<i>Ruminococcaceae</i> (%)	7,79	6,04	8,59	4,04	10,44	12,52	0,844
<i>Streptococcaceae</i> (%)	1,40	1,93	0,70	1,07	1,15	1,92	0,766
<i>Sutterellaceae</i> (%)	3,36	2,69	4,20	3,08	3,26	2,77	0,779
<i>Synergistaceae</i> (%)	0,20	0,66	0,02	0,03	0,08	0,20	0,895
<i>unclassified_Clostridiales</i> (%)	0,15	0,26	0,10	0,23	0,37	0,50	0,553
<i>Veillonellaceae</i> (%)	0,76	1,16	1,70	2,29	0,65	0,54	0,508

SD: Desviación estándar

Tabla 13 Comparativa de la abundancia relativa de las Familias secuenciadas en las muestras fecales basales de los tres subgrupos clasificados según la tolerancia a la metformina tras su introducción. Los datos de abundancia relativa se expresan media y desviación típica. El LDA score es el valor otorgado por el LEfSe (análisis discriminante lineal por efectos de tamaño) que se expone sólo en las Familias que hayan arrojado un $p < 0,05$ y $LDA \geq 2$.

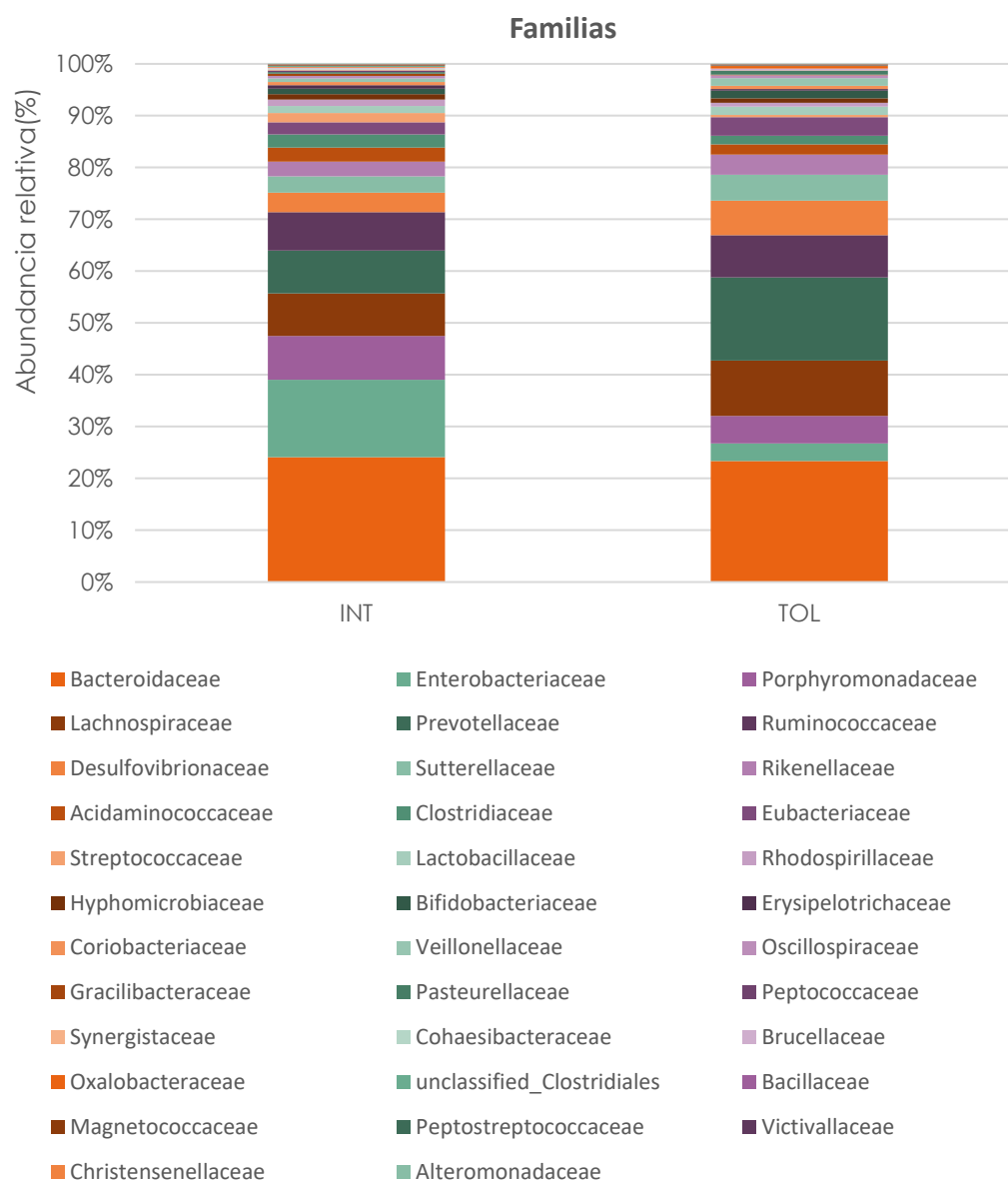
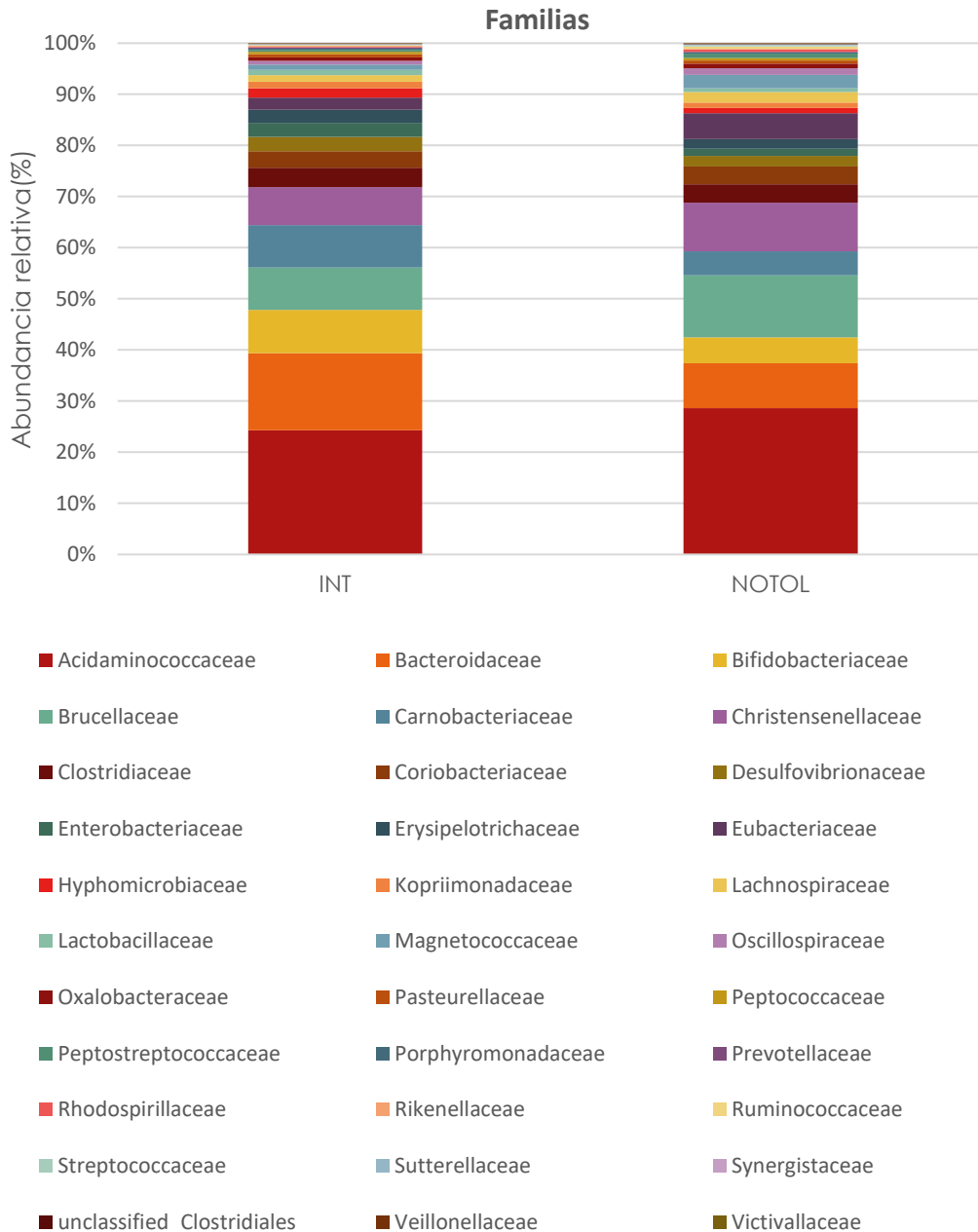


Figura 12. Comparativa de abundancia relativa a nivel de Familia entre los intolerantes precoces (INT) respecto al grupo que toleraran metformina durante la intervención (TOL), en las muestras fecales basales. Las familias que arrojaron $p < 0,05$ y LDA score ≥ 2 se consideraron con diferencias estadísticamente significativas.

Al comparar la abundancia relativa de ASV presentes entre el subgrupo de intolerantes que supera dosis mínimas del fármaco y los que toleran metformina a nivel de Familia bacteriana no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los ASV más predominantes como *Bacteroidaceae* (24,11% INT vs 23,33%, $p=0,9$), *Enterobacteriaceae* (14,96% INT vs 3,41% TOL, $p=0,54$), *Prohyromonadaceae* (8,43% INT vs 5,31% TOL, $p=0,38$), *Lachnospiraceae* (8,23% INT vs 10,72% TOL, $p=0,381$), *Ruminococcaceae* (7,43% INT vs 8,14% TOL, $p=0,9$), *Desulfovibrionaceae* (3,74% INT vs 6,71% TOL, $p=0,435$), *Sutterellaceae* (3,18% INT vs 4,99% TOL, $p=0,523$), *Rikenellaceae* (2,82% INT vs 3,85% TOL, $p=0,911$), *Acidaminococcaceae* (2,73% INT vs 2,02% TOL, $p=0,77$), *Eubacteriaceae* (2,36% INT vs 3,55%

TOL, $p=0,405$) *Streptococcaceae* (1,79% vs 0,45%, $p=0,523$) *Lactobacillaceae* (1,31% INT vs 1,62% TOL, $p=0,345$) *Rhodospirillaceae* (1,24% vs 0,72%, $p=0,38$), *Hyphomicrobiaceae* (1,05% INT vs 0,89 TOL, $p=0,617$), *Bidobacteriaceae* (1,04% INT vs 1,5 % TOL, $p=0,58$) . Sin embargo, si hubo diferencias estadísticamente significativas en la Familia *Clostridiaceae* que se encuentra aumentado dentro del grupo intolerantes (2,53% INT vs 1,64% TOL, $p=0,03$ y LDA score-4,7). El resto de Familias bacterinas secuencias en las muestras fecales presentaron un porcentaje inferior de 1% en ambos grupos y no hubo diferencias



estadísticamente significativas entre grupos.

Figura 13. Comparativa de abundancia relativa a nivel de Familia entre los intolerantes precoces (INT) y los que toleraran metformina durante la intervención (TOL) en las muestras fecales basales. Las familias que arrojaron un $p < 0,05$ y LDA score ≥ 2 se consideraron con diferencias estadísticamente significativas.

Entre los dos subgrupos de intolerantes no se observaron diferencias estadísticamente significativas a nivel de Familia. Las familias bacterianas con mayor predominancia fueron Acidominococcaceae (24,27%INT vs 28,64%NOTOL), Bacteroidaceae(15,07%INT vs 8,77%NOTOL), Bifidobacteriaceae(8,48%INT vs 5,05% NOTOL)Brucellae(8,29%INT vs 12,15%NOTOL),Carnobacteriaceae(8,28%INTvs4,66%NOTOL),Christensesnellaceae(7,48%INT vs 9,55%NOTOL) y Clostridiaceae(3,77%INT vs 3,58% NOT)

3.3 Géneros

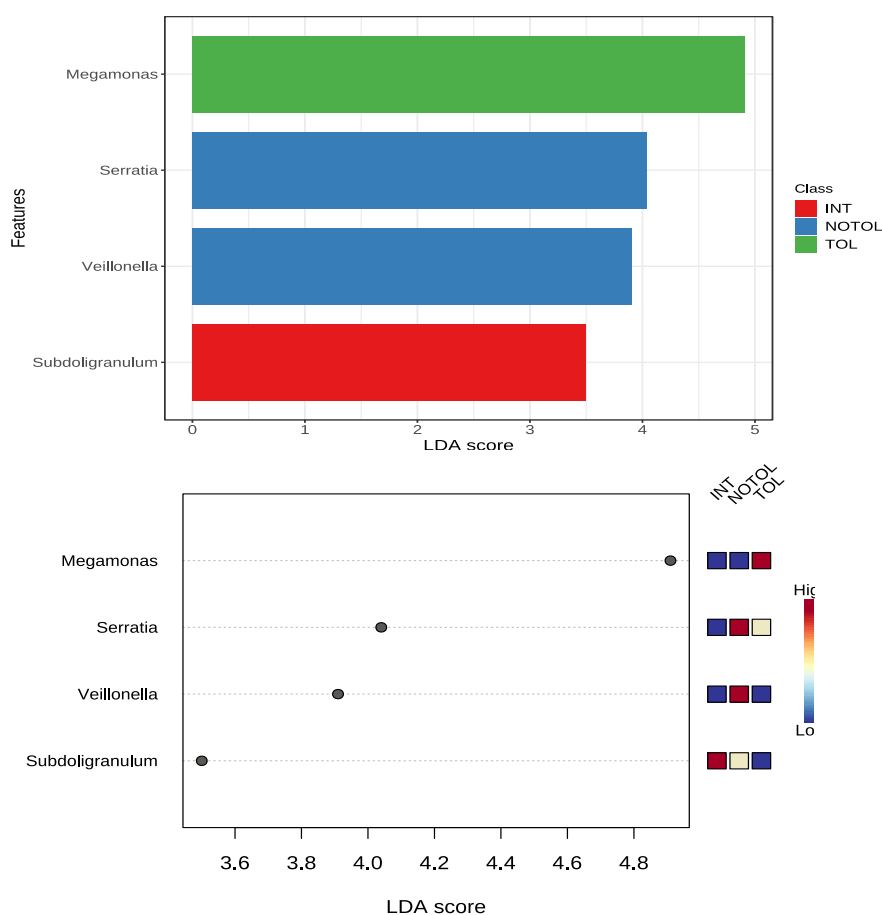


Figura 14. Gráficos con los resultados del LefSe en comparativa de Géneros en las muestras fecales basales de los tres subgrupos clasificados según la tolerancia a la metformina tras su introducción (TOL, INT y NOTOL). Se muestran los Géneros que arrojaron p valor $< 0,05$ y LDA score ≥ 2 en las pruebas de Kruskal-Wallis y de Wilcoxon por pares, respectivamente. Cuanto mayor es el valor de LDA score mayor la contribución a las diferencias entre grupos.

Entre todos los géneros secuenciados en las muestras fecales basales tan solo el género *Megamonas* presenta diferencias estadísticamente significativas, siendo más predominante en muestras fecales de tolerantes a metformina ($0,27\pm 1,06$ %TOL vs $1,7\pm 2,56$ % INT vs $0,11\pm 0,35$ % NOTOL, $p= 0,031$ y LDA score 4,91) y se comporta como el marcador con mayor contribución en el análisis discriminante lineal. Asimismo, *Serratia* presenta diferencias estadísticamente diferentes entre los grupos con valores inferiores entre las muestras de tolerantes ($0,01\pm 0,03$ % TOL vs $0,11\pm 0,23$ % INT vs $0,23\pm 0,46$ % NOTOL, $p=0,044$ y LDA score 4,04). *Subdoligranulum* presenta diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos, siendo superior en abundancia relativa a nivel del grupo de intolerantes temprana o precoz ($0,06\pm 0,12$ % TOL vs $0,00\pm 0,00$ % INT vs $0,05\pm 0,15$ % NOTOL, $p=0,035$ y LDA score 3,5). Por último, el género *Veillonella* presenta diferencias significativas entre los tres grupos con valores medios superiores entre los intolerantes a metformina durante la progresión de dosis ($0,01\pm 0,04$ % TOL vs $0,06\pm 0,2$ % INT vs $0,17\pm 0,4$ % NOTOL, $p= 0,03$ y LDA score 3,91)

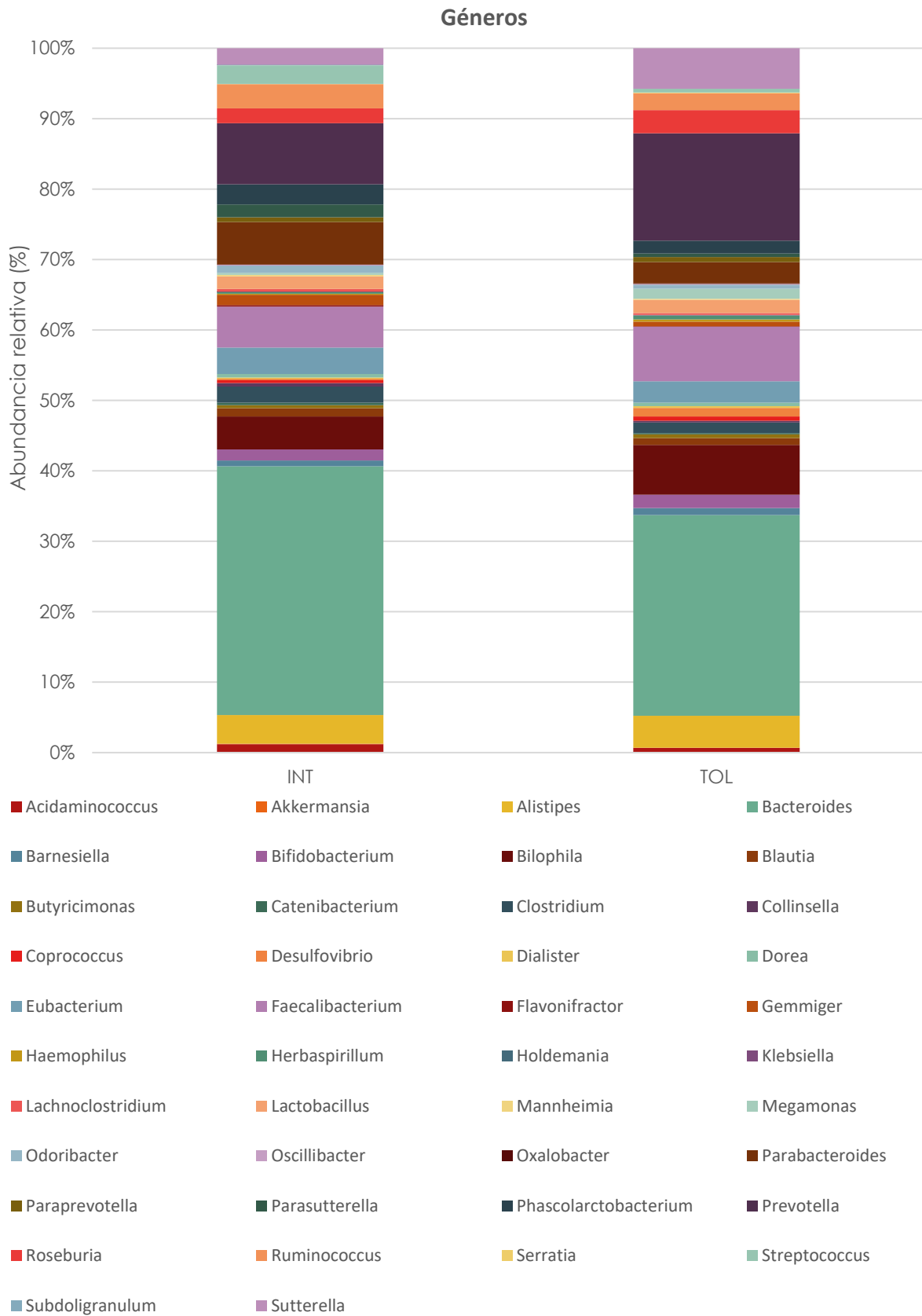


Figura 15. Comparativa de abundancia relativa a nivel de géneros bacterianos entre los intolerantes a dosis mínimas del fármaco (INT) y los que toleraran metformina durante la intervención (TOL) en las muestras fecales basales. Los datos se expresan en % de abundancia relativa.

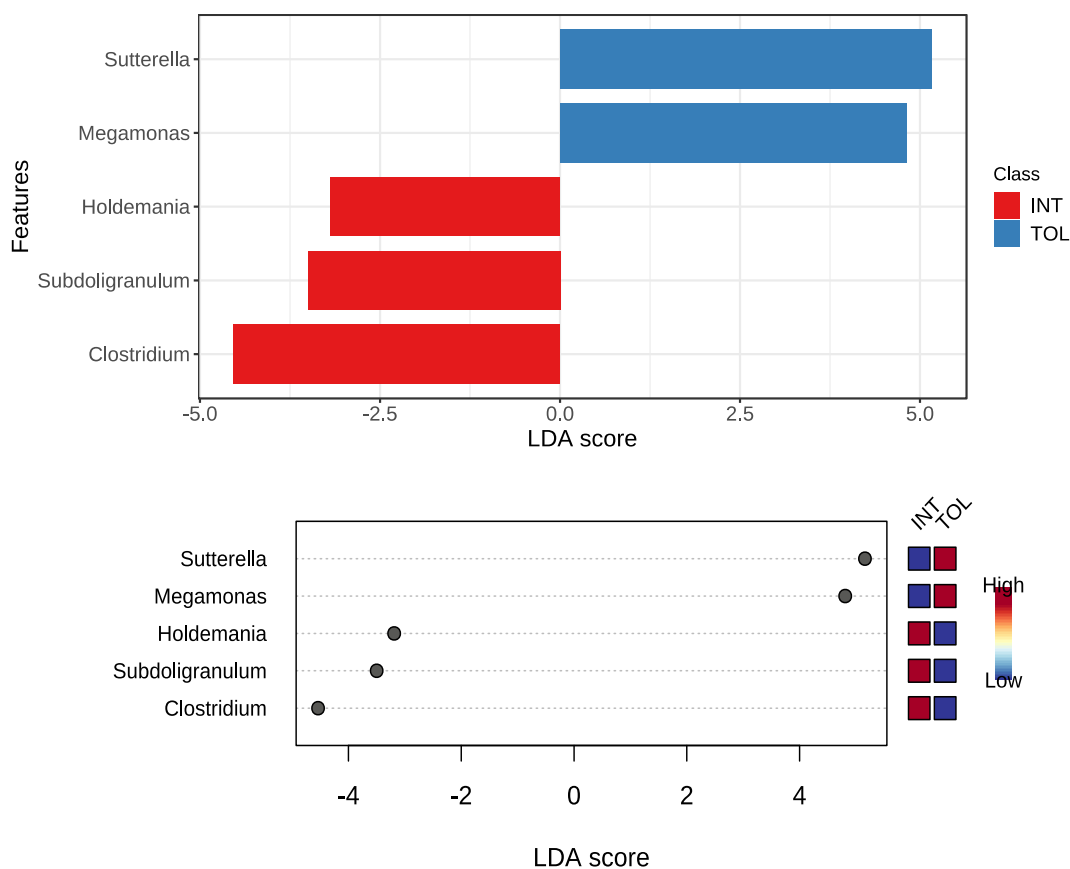


Figura 16. Gráficos con el resultado del LefSe (análisis discriminante lineal por efecto de tamaños) en comparativa de Géneros bacterianos de microbiota intestinal de tolerantes a metformina (TOL) e intolerantes precoces a metformina (INT). Se muestran los géneros que arrojaron p valor <0,05 y LDA score ≥ 2 en las pruebas de Kruskal-Wallis y de Wilcoxon por pares, respectivamente. Cuanto mayor es el valor de LDA score mayor la contribución a las diferencias entre grupos

El género *Clostridium* se muestra enriquecido entre los intolerantes precoces a metformina (2,28 % INT vs 1,48% TOL, $p=0,039$ y LDA score -4,5), además, los géneros *Holdemania*(0,03%INT vs 0,00%TOL, $p=0,047$ y LDA score -3,19) y *Subdoligranulum* también son numéricamente superiores entre intolerantes precoces a metformina (0,03% INT vs 0,00% TOL, $p=0,014$ y LDA score -3,5). En cambio, *Megamonas*(0,26%INT vs1,43% TOL, $p=0,026$ y LDA 4,81) y *Sutterella* (2,37% INT vs 5,74%TOL, $p=0,033$, LDA score 5, 14) presentan valores medios superiores entre el grupo de pacientes tolerantes a metformina.

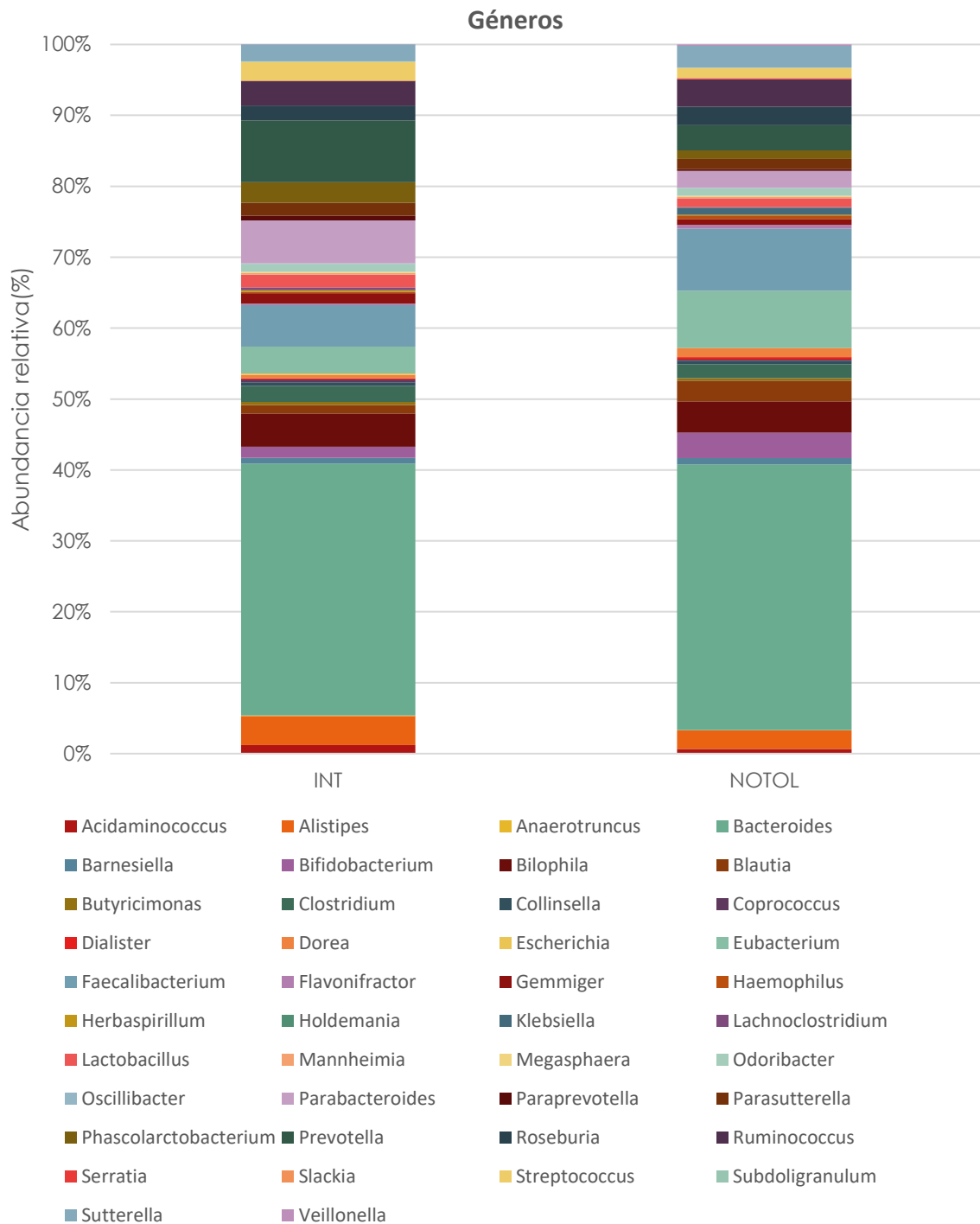


Figura 17. Comparativa de abundancia relativa a nivel de Géneros bacterianos en las muestras fecales basales entre los intolerantes a dosis mínimas del fármaco (INT) y el grupo de intolerantes que sí superaron dosis mínimas, pero no toleraron durante la progresión de dosis (NOTOL). Los datos se expresan en % de abundancia relativa.

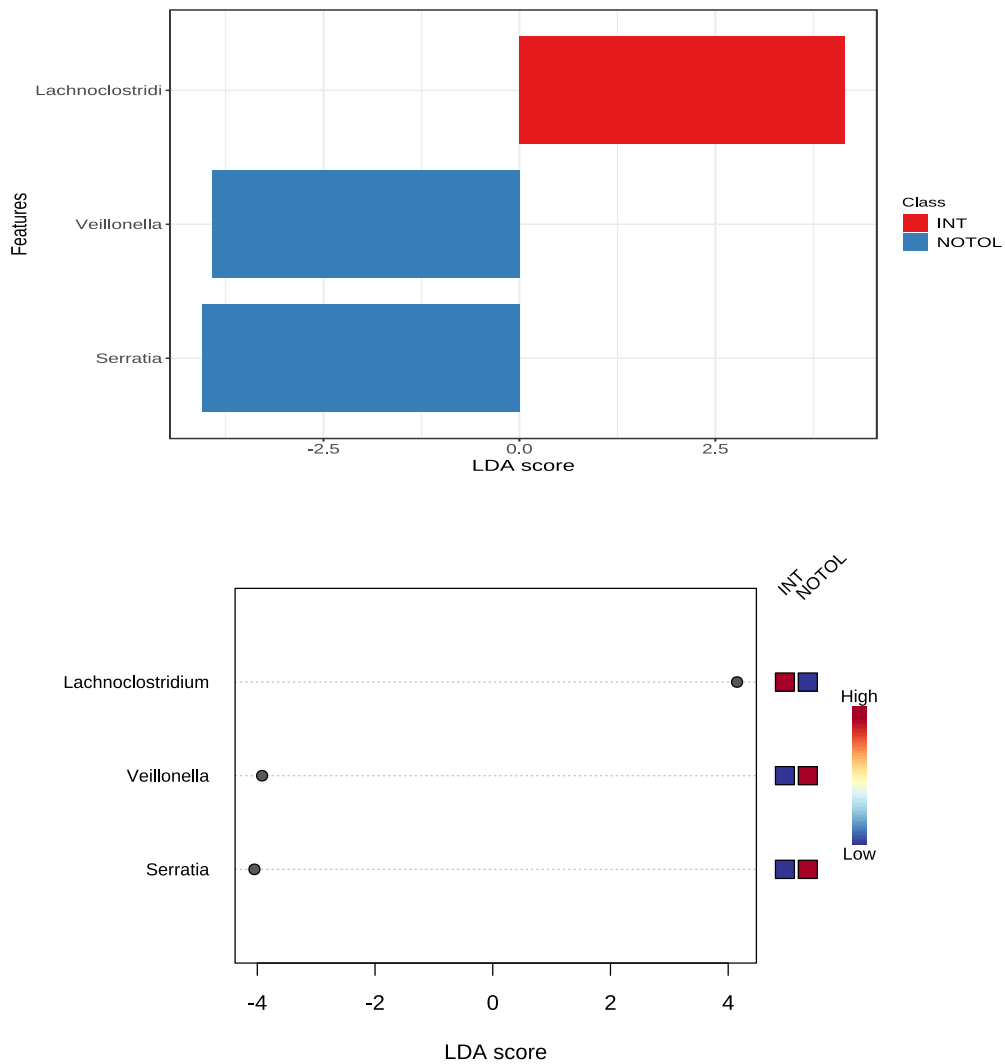


Figura 11. Gráficos con el resultado del LefSe (análisis discriminante lineal, efecto-tamaños) en comparativa de Géneros a nivel de los dos subgrupos de intolerantes a metformina (INT y NOTOL). Se muestran los Géneros que arrojaron p valor $< 0,05$ y LDA score ≥ 2 en las pruebas de Kruskal-Wallis y de Wilcoxon por pares, respectivamente. Cuanto mayor es el valor de LDA score mayor la contribución a las diferencias entre grupos.

Veillonella (0,01%INT vs 0,19% NOTOL, $p= 0,018$ y LDA score 3,92) y *Serratia* (0,02% INT vs 0,17% NOTOL, $p=0,014$ y LDA score -4,05) son los dos géneros bacterianos más predominantes entre las muestras fecales del grupo de intolerantes a metformina durante la progresión de dosis. *Lachnospirillum* presenta niveles superiores entre los intolerantes precoces (0,4%INT vs 0,07% NOTOL, $p=0,039$ y LDA score 4,15).

3.4 Especies

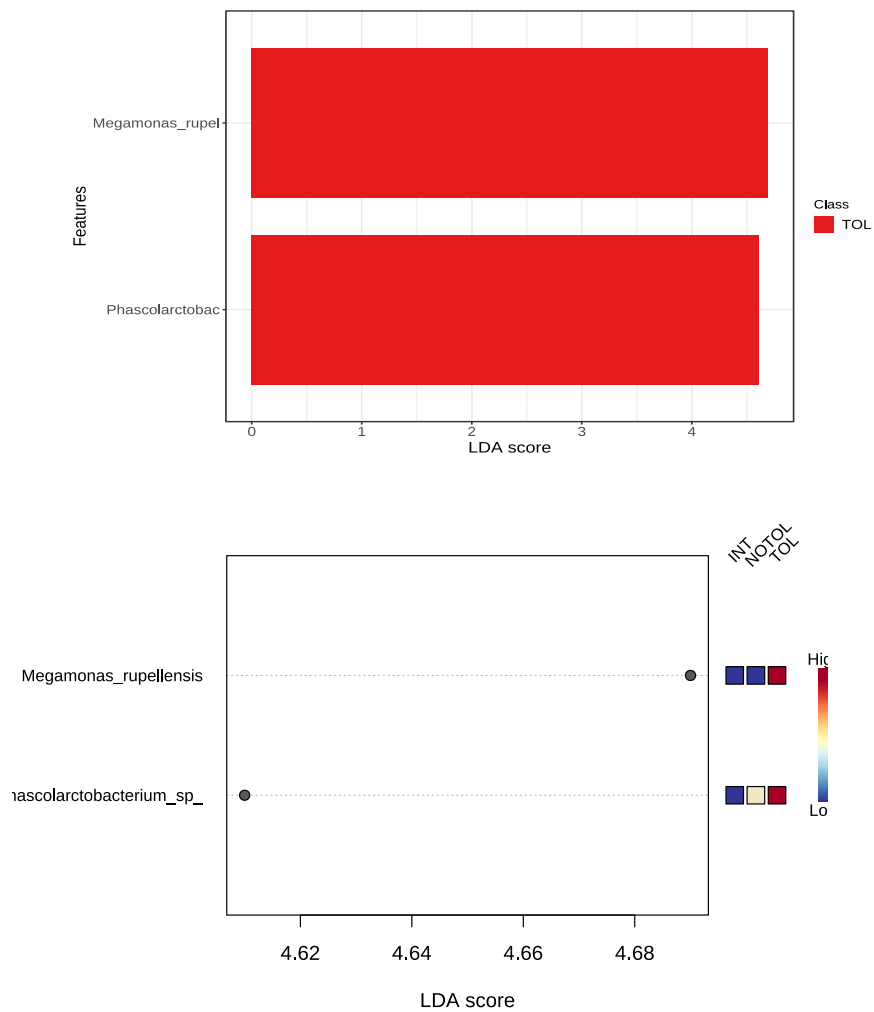


Figura 12. Gráficos con el resultado del LefSe (análisis discriminante lineal, efecto-tamaños) en comparativa de Especies bacterianas de microbiota intestinal de tolerantes a metformina (TOL), intolerantes a metformina precoces (INT) e intolerantes a metformina en dosis progresivas (NOTOL). Se muestran las especies que arrojaron p valor $< 0,05$ y LDA score ≥ 2 en las pruebas de Kruskal-Wallis y de Wilcoxon por pares, respectivamente. Cuanto mayor es el valor de LDA score mayor la contribución a las diferencias entre grupos.

En el análisis taxonómico de especies bacterianas se observaron diferencias estadísticamente significativas en abundancia relativa de la especies bacterianas *Megamonas rupellensis* ($0,11 \pm 0,044\%$ TOL vs $0,97 \pm 1,65\%$ INT vs $0,03 \pm 0,1\%$ NOTOL, $p=0,023$ y LDA score 4,69) y *Phascolarctobacterium sp* ($0,00 \pm 0,01\%$ TOL vs $0,74 \pm 1,38\%$ INT vs $0,05 \pm 0,12\%$ NOTOL, $p=0,029$ y LDA score 4,61) en el grupo de tolerantes a metformina

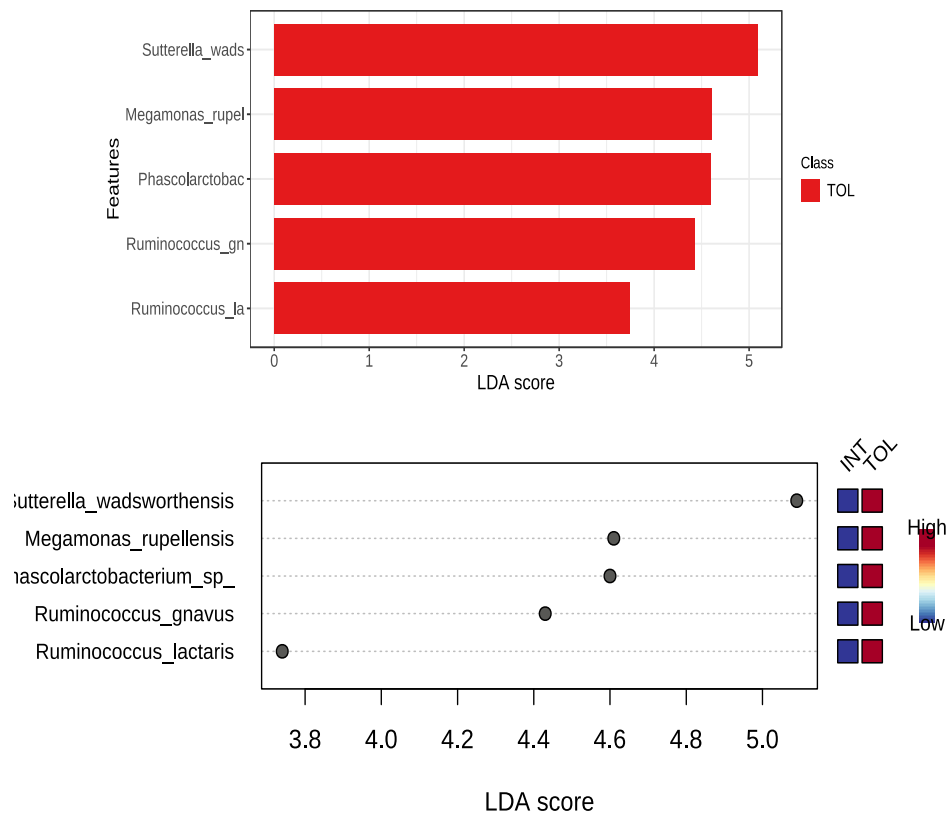


Figura 13. Gráficos con el resultado del LEfSe (análisis discriminante lineal, efecto-tamaños) en el análisis comparativo basal de las especies bacterianas secuenciadas entre los grupos intolerantes precoces (INT) y tolerantes a metformina (TOL). Se muestran las especies bacterianas que arrojaron $p < 0,05$ y LDA score ≥ 2 en las pruebas de Kruskal-Wallis y de Wilcoxon por pares, respectivamente. LDA score es el valor otorgado por el LEfSe y los valores numéricamente superiores suponen mayor contribución de los biomarcadores en las diferencias entre grupos.

En los resultados del análisis lineal discriminante se observa que los biomarcadores que han presentado diferencias estadísticamente significativas se encuentran incrementados numéricamente entre el grupo TOL. En el histograma de barras se representan LDA score de mayor a menor puntuación, es decir, de mayor a menor peso en la contribución de la diferencias entre grupos medidas por Especies secuenciadas en las muestras fecales: *Sutterella_wadsworthensis* (3,18 \pm 2,48% TOL vs 0,83 \pm 1,59% INT, $p=0,015$ y LDA score 5,09), *Megamonas_rupellensis* (0,97 \pm 1,65% TOL vs 0,11 \pm 0,44% INT, $p=0,018$ y LDA score 4,61), *Phascolarctobacterium_sp* (LDA score 4,6), *Ruminococcus_gnavus*(1,51 \pm 1,21% TOL vs 0,9 \pm 0,88% INT, $p=0,046$ y LDA score 3,74) y *Ruminococcus_lactaris* (0,13 \pm 0,19% TOL vs 0,03 \pm 0,11% IMT, $p=0,047$ y LDA score 3,74)

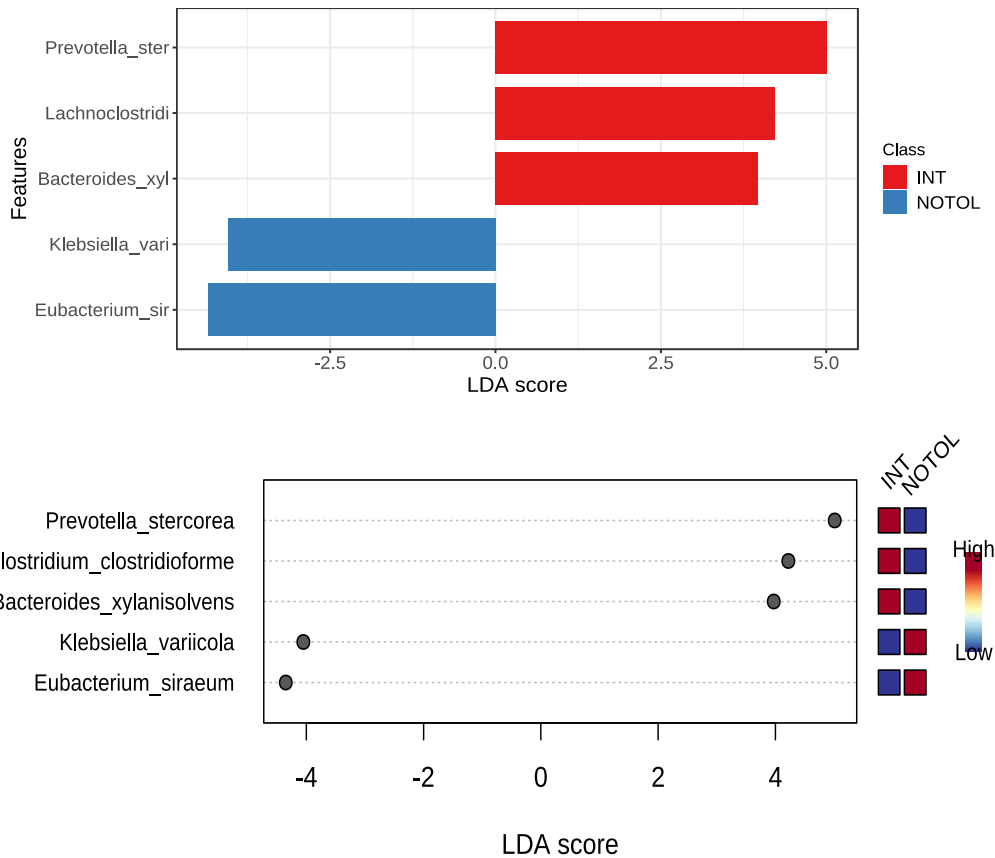


Figura 14. Gráficos con representación de los resultados del LefSe (análisis discriminante lineal, efecto-tamaños) en el análisis comparativo basal de las especies bacterianas secuenciadas entre los grupos intolerantes precoces (INT) e intolerantes a metformina durante la progresión de dosis (NOTOL). Se muestran las especies bacterianas que arrojaron $p < 0,05$ y LDA score ≥ 2 en las pruebas de Kruskal-Wallis y de Wilcoxon por pares, respectivamente. LDA score es el valor otorgado por el LefSe y los valores numéricamente superiores suponen mayor contribución de los biomarcadores en las diferencias entre grupos.

En la figura 14 se extraen que dentro de las muestras fecales del grupo INT se muestran valores superiores de abundancia relativa de *Prevotella stercorea* ($0,00 \pm 0,0$ INT vs $1,9 \pm 3,7\%$ NOTOL, $p=0,047$ y LDA score $5,01$), *Lachnociostridium clostridioforme* ($0,06 \pm 0,05\%$ INT vs $0,37 \pm 0,44\%$ NOTOL, LDA score $4,22$) y *Bacteroides xylanisolvens* ($0,10 \pm 0,16\%$ INT vs $0,27 \pm 0,34\%$ NOTOL, $p=0,037$ y LDA score $3,97$), respecto al grupo NOTOL. Sin embargo, las especies bacterianas enriquecidas entre el grupo NOTOL fueron *Klebsiella variicola* ($0,3 \pm 0,35\%$ INT vs $0,0 \pm 0,01\%$ NOTOL, $p=0,032$ y LDA score $-4,05$) y *Eubacterium siraeum* ($0,43 \pm 0,63\%$ INT vs $0,01 \pm 0,03\%$ NOTOL, $p=0,045$ y LDA score $-4,35$)

4. Cambios de la microbiota intestinal en el análisis longitudinal y transversal de los grupos tolerantes a metformina versus intolerantes a metformina durante la progresión de dosis.

4.1 Filos

Abundancia relativa: Filos	TOL BASAL		NOTOL BASAL		p
	Media	SD(±)	Media	SD(±)	
<i>n</i>	10		10		
<i>p__Actinobacteria</i> (%)	2,5	2,1	3,3	4,4	0.820
<i>p__Bacteroidetes</i> (%)	38,7	13,1	40,1	11,7	0.762
<i>p__Firmicutes</i> (%)	39,0	9,6	36,6	15,0	0.45
<i>p__Lentisphaerae</i> (%)	0,0	0,0	0,0	0,0	0.519
<i>p__Proteobacteria</i> (%)	19,6	10,7	19,9	14,1	0.650
<i>p__Verrucomicrobia</i> (%)	0,1	0,1	0,1	0,2	0.963
<i>p__Not_Assigned</i> (%)	0,1	0,1	0,0	0,1	1

SD: Desviación estándar

Tabla 14. Comparación de la abundancia relativa entre los filos presentes en las muestras fecales basales de los tolerantes a metformina (TOL basal) e intolerantes a metformina durante la titulación o progresión de dosis (NOTOL basal). Los datos se expresan en media y desviación estándar.

No se expone el valor de LDA score extraído de LEfSe porque no ha habido diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en ninguno de los Filos secuenciados en las muestras fecales durante el análisis no paramétrico. Los valores de abundancia relativa se expresan en media y desviación

Abundancia relativa: Filos	TOL FINAL		NOTOL FINAL		p
	Media	SD(±)	Media	SD(±)	
<i>n</i>	10		10		
<i>p__Actinobacteria</i> (%)	1,8	1,9	3,5	5,4	0.597
<i>p__Bacteroidetes</i> (%)	48,9	14,4	38,6	19,3	0,326
<i>p__Firmicutes</i> (%)	31,5	10,0	39,3	18,6	0,496
<i>p__Lentisphaerae</i> (%)	0,0	0,1	0,0	0,0	0,744
<i>p__Proteobacteria</i> (%)	17,5	10,4	18,6	14,6	0,880
<i>p__Ternicutes</i> (%)	0,1	0,2	0,0	0,0	0,304
<i>p__Verrucomicrobia</i> (%)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,216
<i>p__Not_Assigned</i> (%)	0,1	0,1	0,1	0,1	1

SD: Desviación estándar

Tabla 15. Comparación de la abundancia relativa entre los filos presentes en las muestras fecales finales de los tolerantes a metformina (TOL final) e intolerantes a metformina durante la titulación o progresión de dosis (NOTOL final). Los datos se expresan en media y desviación estándar.

No se expone el valor de LDA score extraído de LEfSe porque no ha habido diferencias significativas ($p < 0,05$) en ninguna de los Filos secuenciados en las muestras fecales durante el análisis no paramétrico.

Abundancia relativa:Filos	TOL BASAL		TOL FINAL		p
	Media	SD(±)	Media	SD(±)	
<i>n</i>	10		10		
<i>p__Actinobacteria</i> (%)	24	2,1	17	1,8	0,496
<i>p__Bacteroidetes</i> (%)	39	14,3	48,6	13,6	0,112
<i>p__Firmicutes</i> (%)	39,5	8,8	33,0	10,1	0,112
<i>p__Lentisphaerae</i> (%)	0,0	0,0	0,0	0,1	0,508
<i>p__Proteobacteria</i> (%)	18,8	9,9	16,5	9,6	0,597
<i>p__Verrucomicrobia</i> (%)	0,1	0,1	0,1	0,2	0,52
<i>p__Not_Assigned</i> (%)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,93

SD: Desviación estándar.

Tabla 16. Comparación de la abundancia relativa de los filos presentes antes y tras la introducción de metformina en el grupo de pacientes tolerantes (TOL basal). Los valores de abundancia relativa se expresan en media y desviación estándar (SD)

No se expone el valor de LDA score extraído de LEfSe porque no ha habido diferencias significativas ($p < 0,05$) en ninguno de los Filos secuenciados en las muestras fecales durante el análisis no paramétrico.

Abundancia relativa:Filos	NOTOL BASAL		NOTOL FINAL		p
	Media	SD(±)	Media	SD(±)	
<i>n</i>	10		10		
<i>p__Actinobacteria</i> (%)	3,4	4,5	3,5	5,5	0,940
<i>p__Bacteroidetes</i> (%)	39,1	14,3	48,6	13,6	1,000
<i>P__Cyanobacteria</i> (%)	39,5	8,8	33,0	10,1	0,304
<i>p__Firmicutes</i> (%)	0,0	0,0	0,0	0,1	0,762
<i>p__Fusobacteria</i> (%)	18,8	9,9	16,5	9,6	0,487
<i>p__Lentisphaerae</i> (%)	0,1	0,1	0,1	0,2	0,321
<i>p__Proteobacteria</i> (%)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,545
<i>P__Tenericutes</i> (%)	0,1	0,1	0,1	0,2	0,963
<i>p__Verrucomicrobia</i> (%)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,816
<i>p__Not_Assigned</i> (%)	0,2	0,3	0,2	0,3	0,596

Tabla 17. Comparación de la abundancia relativa de los filios presentes antes y tras la introducción de metformina en el grupo de pacientes tolerantes (NOTOL).

No se expone el valor de LDA score extraído de LEfSe porque no ha habido diferencias significativas ($p < 0,05$) en ninguna de los Filios secuenciados en las muestras fecales durante el análisis no paramétrico. Los valores de abundancia relativa se expresan en media y desviación estándar (SD)

4.2 Familias

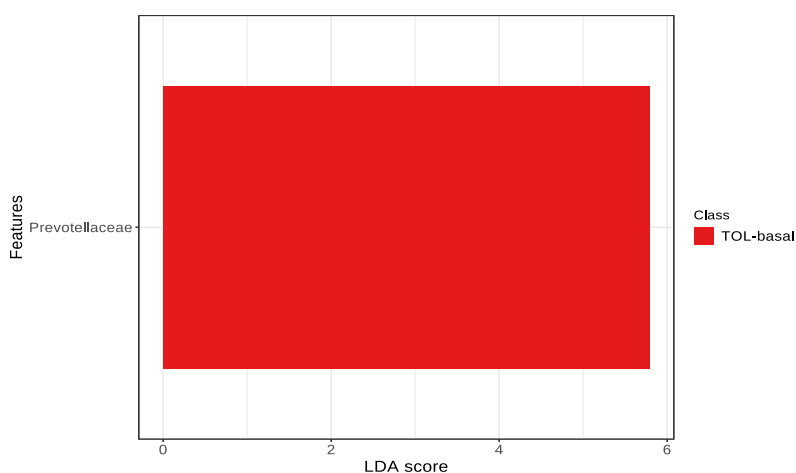


Figura 15. Histograma con representación de los resultados del LEfSe (análisis discriminante lineal, efectos-tamaños) en el análisis comparativo basal de las familias bacterianas en los grupos TOL basal versus NOTOL basal. Se muestran las especies bacterianas que arrojaron $p < 0,05$ y LDA score ≥ 2 en las pruebas de Kruskal-Wallis y de Wilcoxon por pares, respectivamente. LDA score es el valor otorgado por el LEfSe y los valores numéricamente superiores suponen mayor contribución de los biomarcadores en las diferencias entre grupos.

La familia bacteriana *Prevotellaceae* fue el biomarcador que mostró diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos en situación basal mediante el análisis LEfSe. El grupo de TOL muestra un enriquecimiento de este taxón bacteriano en las muestras fecales basales ($0,1 \pm 0,1$ TOL% vs $0,1 \pm 0,2$ % NOTOL, $p = 0,034$ y LDA score 5,79). En cambio, en la comparación de las diferencias entre las Familias secuenciadas entre los grupos TOL final versus NOTOL final no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el análisis de LEfSe.

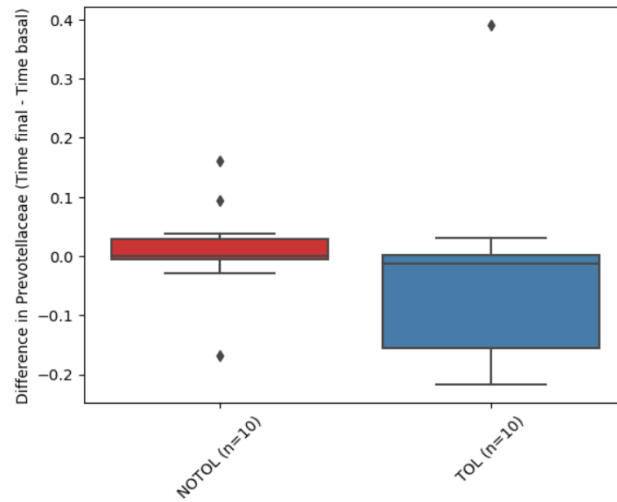


Figura 16. Gráfico de cajas y bigotes con el diferencial de cambio en la abundancia relativa de la Familia *Prevotellaceae* entre las muestras fecales basales y finales de los grupos tolerantes a metformina (TOL) e intolerantes a metformina en la progresión de dosis (NOTOL).

No se observan diferencias estadísticamente significativas en el diferencial de cambio de abundancia relativa de la Familia *Prevotellaceae* ($p=0,33$) entre los grupos TOL versus NOTOL.

Familias bacterianas : TOL basal y TOL final



Figura 17. Abundancia relativa de las familias bacterianas presentes fecales basales y finales del grupo de pacientes clasificados como tolerantes durante la intervención (TOL).

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el análisis de LEfSe entre las familias bacterianas secuenciadas en el punto final del grupo TOL.

Familias bacterianas : NOTOL basal y NOTOL final

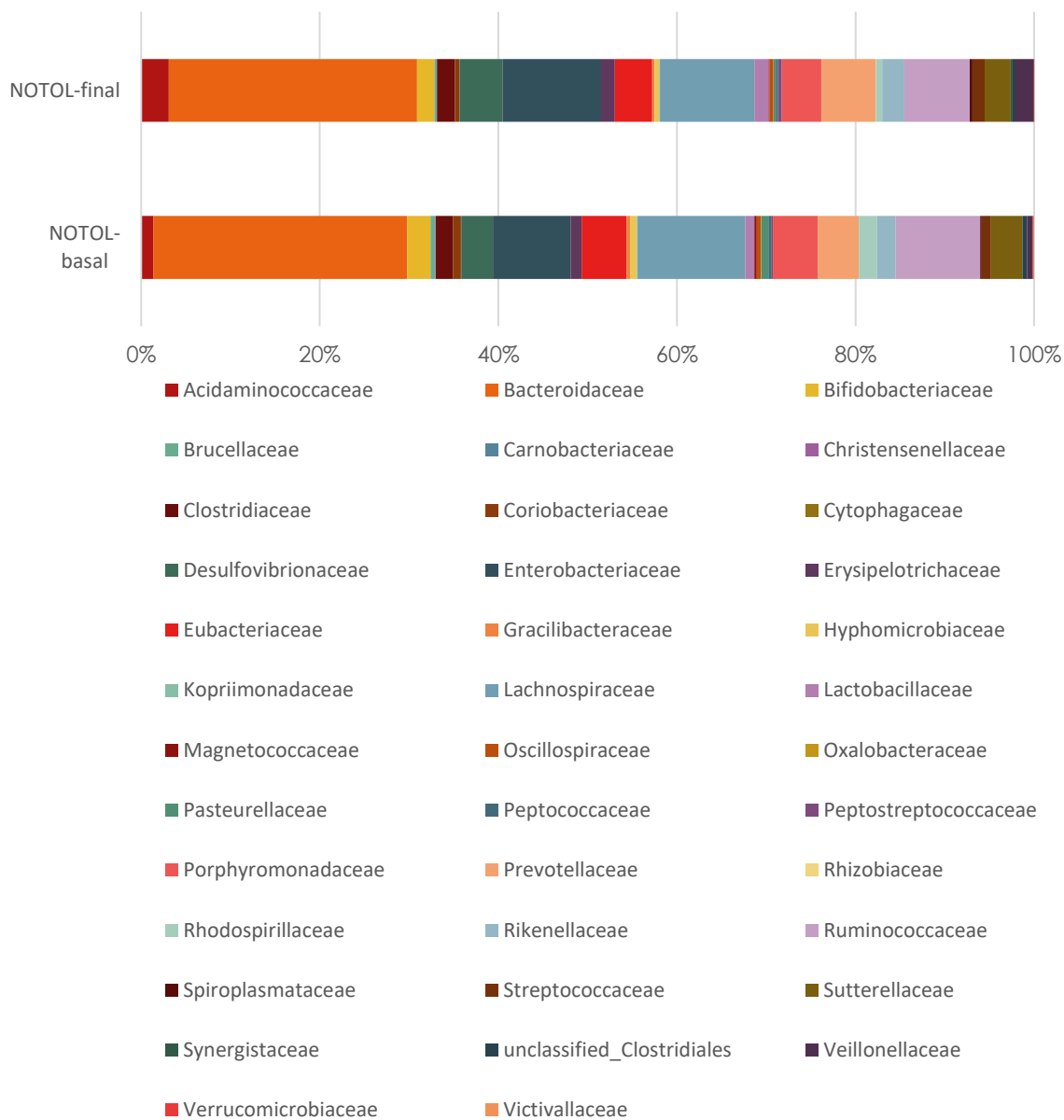


Figura 18. Abundancia relativa de las familias bacterianas presentes en las muestras fecales basales y finales del grupo de pacientes clasificados como intolerantes a metformina durante la progresión de dosis (NOTOL).

No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre las familias bacterianas secuenciadas en el punto final del grupo NOTOL.

4.3 Géneros

El género bacteriano *Subdoligranulum* fue el biomarcador que mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en situación basal mediante el análisis del LEfSe. El grupo NOTOL basal mostró un enriquecimiento de este género bacteriano en comparación con las muestras fecales de TOL basal ($0,0 \pm 0,00$ TOL basal % vs $0,05 \pm 0,1$ %NOTOL basal, $p = 0,013$ y LDA score $-3,44$). El género bacteriano *Eubacterium* fue el biomarcador que mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en situación final mediante el análisis del LEfSe. El grupo NOTOL muestra enriquecimiento de este taxón bacteriano en las muestras fecales finales ($3 \pm 2,55\%$ TOL final vs $7,35 \pm 5,6\%$ NOTOL final, $p = 0,049$ y LDA score $-5,31$)

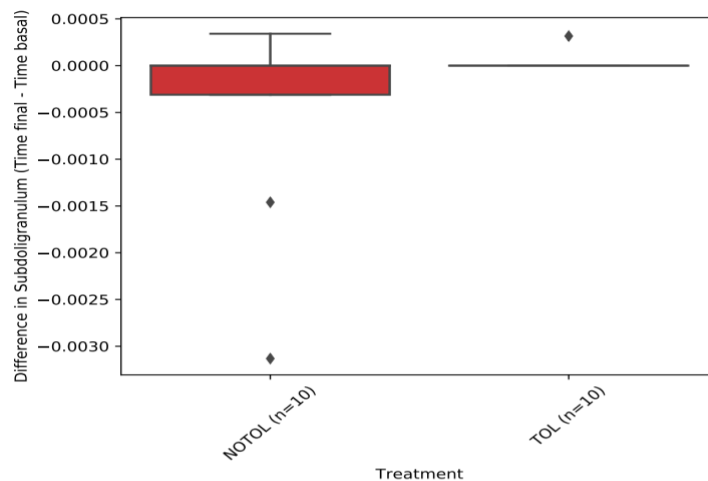


Figura 19. Gráfico de cajas y bigotes con el diferencial de cambio en la abundancia relativa del Género *Subdoligranulum* entre las muestras fecales basales y finales de los grupos tolerantes a metformina (TOL) e intolerantes a metformina en la progresión de dosis (NOTOL).

No se observan diferencias estadísticamente significativas en el diferencial de cambio de la abundancia relativa del género *Subdoligranulum* ($p = 0,24$) entre los grupos TOL y NOTOL.

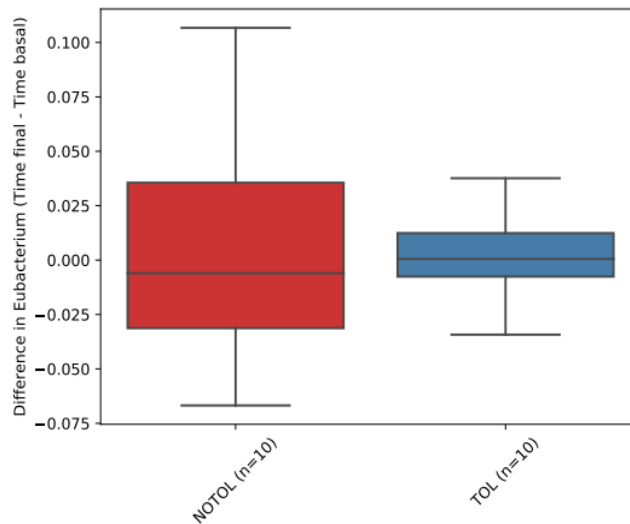


Figura 20. Gráfico de cajas y bigotes con el diferencial de cambio en la abundancia relativa del Género *Eubacterium* entre las muestras fecales basales y finales de los grupos tolerantes a metformina (TOL) e intolerantes a metformina en la progresión de dosis (NOTOL).

No se observan diferencias estadísticamente significativas en el diferencial de cambio de la abundancia relativa del género *Eubacterium* ($p=0,85$) entre los grupos TOL y NOTOL.

Géneros bacterianos NOTOL : basal y final

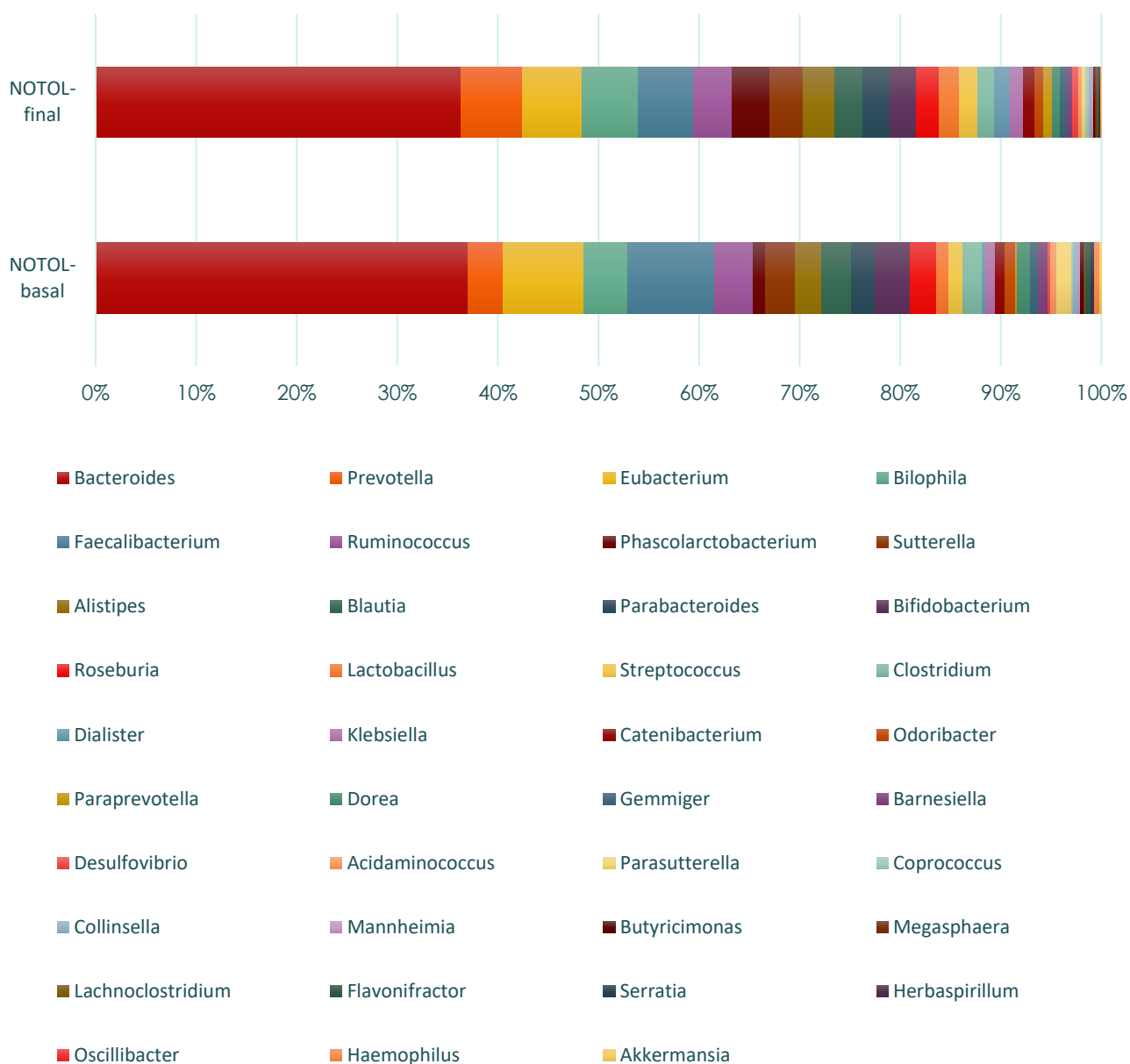


Figura 21. Abundancia relativa de los géneros bacterianos secuenciados en las muestras fecales basales (n:10) y finales (n: 10) en el grupo intolerante a metformina durante la progresión de dosis (NOTOL).

Los géneros bacterianos representados con mayor abundancia relativa en las muestras fecales basales mostrados en orden descendente son los siguientes: *Bacteroides* (37%), *Faecalibacterium* (8,64%), *Eubacterium*(7,99%), *Bilophila* (4,37%), *Ruminococcus* (3,82%), *Bifidobacterium* (3,53%), *Prevotella* (3,52%), *Sutterella* (3,05%), *Blautia* (2,9%), *Alistipes*(2,61%), *Roseburia*(2,58%), *Parabacteroides* (2,35%), *Clostridium* (1,95%), *Phascolarctobacterium* (1,19%) y *Odoribacter*(1,05%). El resto de los géneros presentes en las muestras analizadas presentaron una abundancia relativa inferior al 1%. Los géneros con mayor abundancia relativa en las muestras fecales finales en orden descendente son: *Bacteroides* (36,31%), *Faecalibacterium* (5,44%), *Eubacterium*(5,96%), *Bilophila* (5,62%), *Ruminococcus* (3,88%), *Phascolarctobacterium* (3,71%), *Sutterella* (3,17%), *Blautia* (2,79%), *Parabacteroides*(2,72%),

Bifidobacterium (2,59%), *Roseburia* (2,26%), *Lactobacillus*(2%) *Streptococcus* (1,82%), *Clostridium*(1,69%), *Dialister* (1,54%), *Klebsiella*(1,3%) y *Canitabacterium*(1,16%). El resto de las bacterias presentes en los intolerantes en visita final no han superado el 1% de abundancia relativa de ASVs. En el análisis estadístico no hubo diferencias significativamente estadísticas ($p < 0,05$) entre la abundancia relativa de géneros presentes en muestras inicial respecto a las muestras finales. Consideramos que la ausencia de cambios se puede deber a la cercanía temporal entre las muestras, ya que el grupo con intolerancia a metformina no se le administró el fármaco más allá de 60 días.

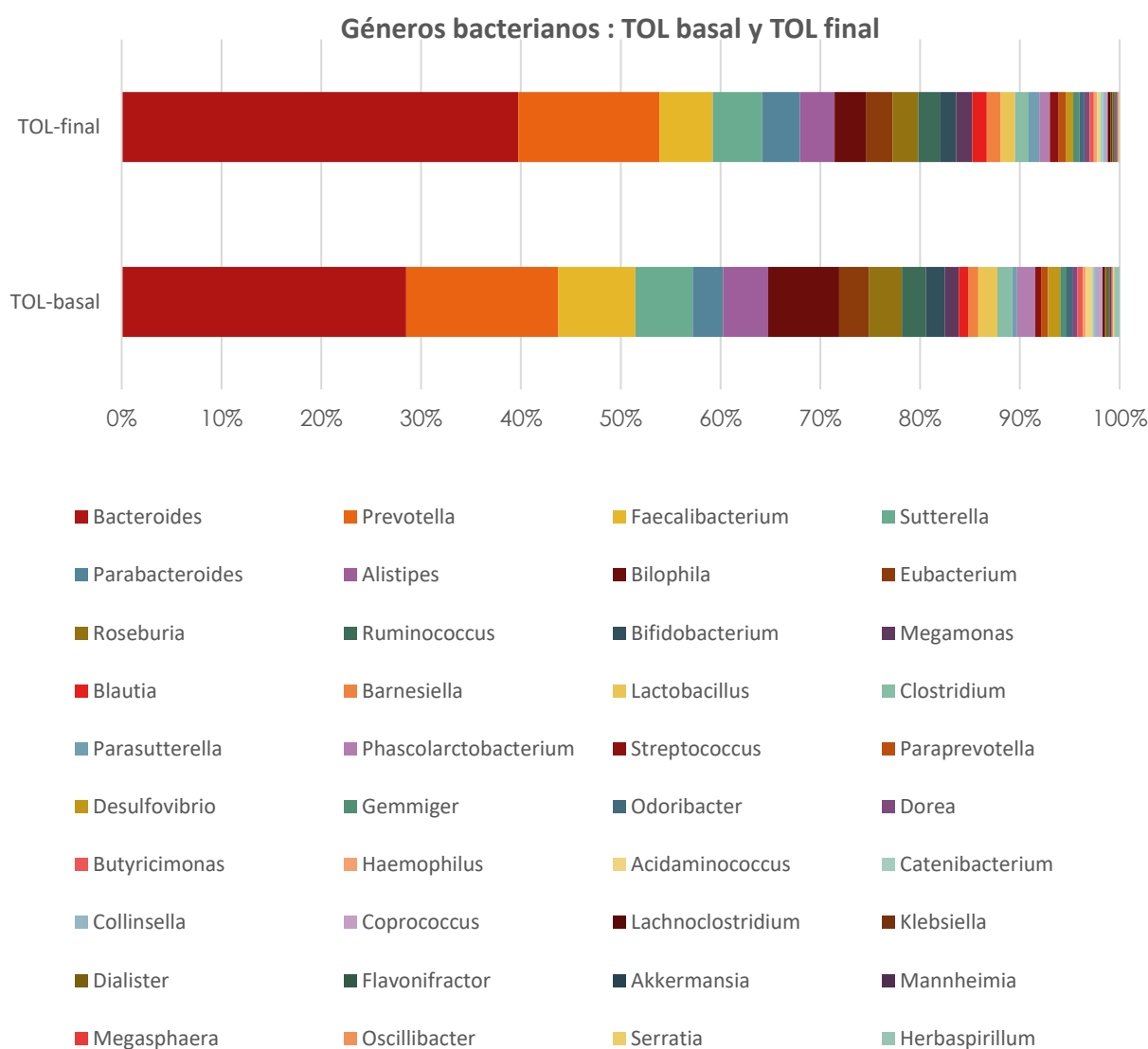


Figura 22. Abundancia relativa de los géneros bacterianos secuenciados en las muestras fecales basales (n:10) y finales (n: 10) en el grupo de tolerantes a metformina (TOL).

Los géneros bacterianos representados con mayor abundancia relativa en las muestras fecales basales mostrados en orden descendente según valor numérico son : *Bacteriodes* (28,51%), *Prevotella*(15,24%), *Faecalibacterium* (7,73%), *Bilophila* (7,09%), *Sutterella*(5,74%), *Alistipes* (4,53%), *Roseburia* (3,28%, *Parabacteroides* (3,03%), *Eubacterium* (3,02%), *Ruminococcus* (2,4%), *Lactobacillus*

(1,9%), *Bifidobacterium* (1,89%), *Phascolarctobacterium*(1,85%), *Clostridium*(1,48%), *Megamonas* (1,43%) y *Desulfovibrio*(1,21%) . El resto de los géneros presentes en las muestras analizadas presentaron una abundancia relativa inferior al 1 %. Los géneros con mayor abundancia relativa de ASVs secuenciados en las muestras fecales finales en orden descendente según valor numérico son: *Bacteriodes* (39,73%), *Prevotella* (14,13%), *Faecalibacterium*(5,34%), *Sutterella* (4,98%),*Parabacteroides*(3,79%), *Alistipes* (3,45%), *Bilophila*(3,19%), *Eubacterium* (2,61%), *Roseburia* (2,57%), *Ruminococcus*(2,18%), *Bifidobacterium* (1,63%) *Megamonas*(1,61%), *Blautia* (1,45%), *Barnesiella* (1,42%), *Lactobacillus* (1,4%), *Clostridium*(1,37%), *Parasutterella* (1,07%) y *Phascolarctobacterium*(1,06%). Al igual que ocurre con el grupo de intolerantes a metformina no se observaron cambios significativos a nivel estadístico ($p < 0,05$) entre la abundancia relativa presente en muestras basales y finales.

4.4 Especies

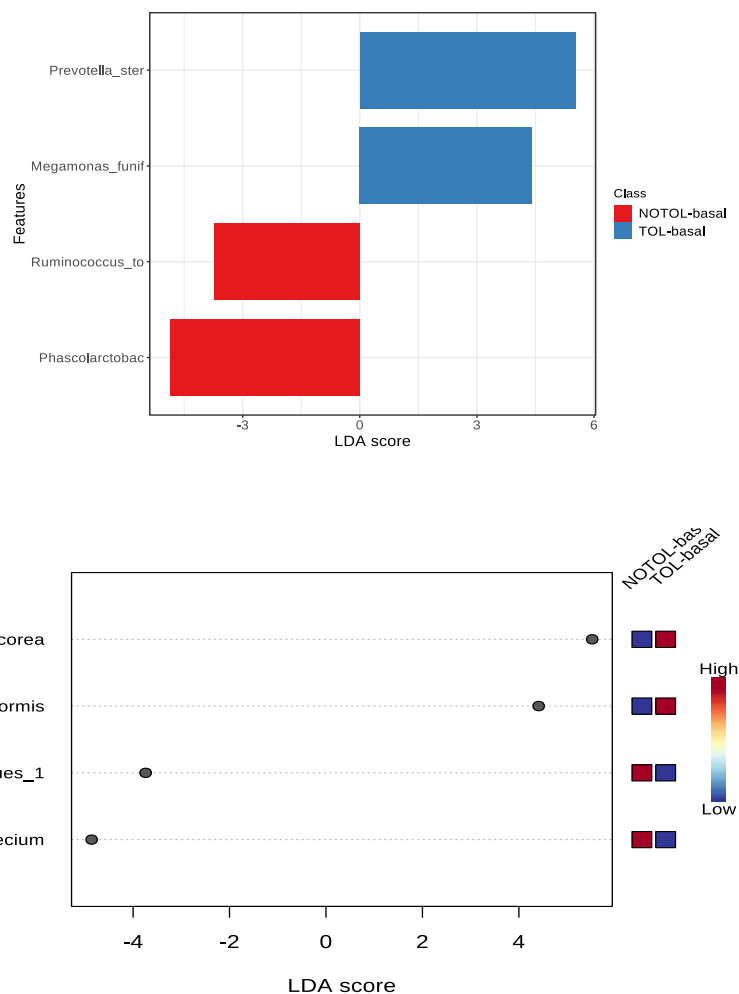


Figura 23. Gráficos con representación de los resultados del LefSe (análisis discriminante lineal, efectos-tamaños) en el análisis comparativo basal de las especies bacterianas secuenciadas entre los grupos tolerantes a metformina (TOL) e intolerantes durante la progresión de dosis (NOTOL). Se muestran las

especies bacterianas que arrojaron $p < 0,05$ y LDA score ≥ 2 en las pruebas de Kruskal-Wallis y de Wilcoxon por pares, respectivamente. LDA score es el valor otorgado por el LEfSe y los valores numéricamente superiores suponen mayor contribución de los biomarcadores en las diferencias entre grupos

En los resultados obtenidos a nivel especies observamos que *Ruminococcus_torques* ($0,00 \pm 0,00\%$ TOL basal vs $0,11 \pm 0,22\%$ NOTOL basal $p = 0,031$ y LDA score $-3,74$), *Phalarctobacterium_facecium* ($0,01 \pm 0,02\%$ TOL basal vs $1,34 \pm 1,9\%$ NOTOL basal, $p = 0,036$, LDA score $-4,86$) presentan diferencias estadísticamente significativas con valores superiores de abundancia relativa en el grupo NOTOL. Sin embargo, las especies bacterianas *Prevotella_stercorea* ($p = 0,03$, LDA score $= 5,52$) y *Megamonas_funiformes* ($0,52 \pm 0,96\%$ TOL vs $0,01 \pm 0,03\%$ NOTOL, $p = 0,045$, LDA score $4,41$) presentan una abundancia relativa mayor en el grupo de tolerantes a metformina. La magnitud del LDA score nos ayuda la idea a que los biomarcadores significativos (en este caso, los grupos de taxones) se clasifican según el tamaño del efecto (la magnitud de la variación).

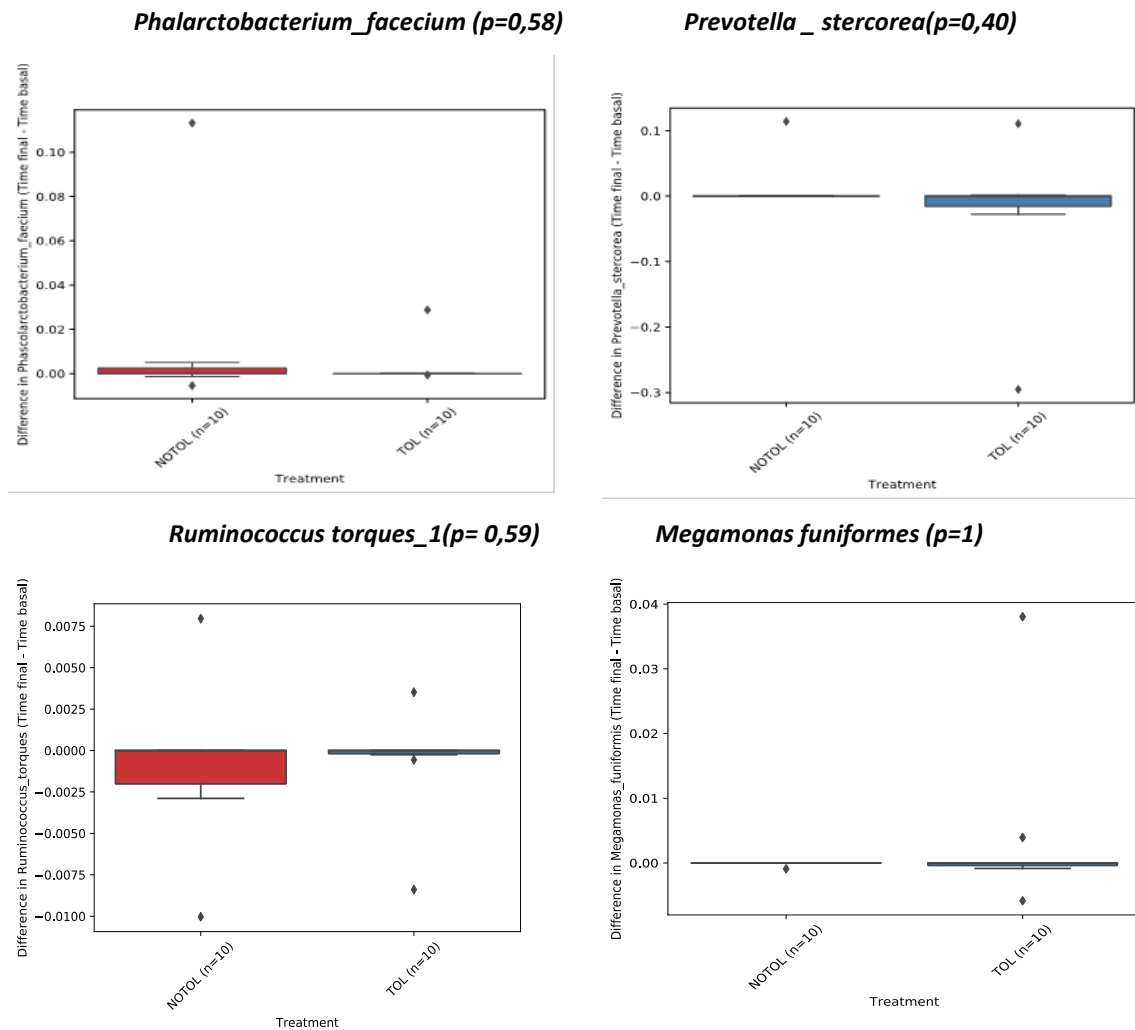


Figura 24. Gráficos de cajas y bigotes con el diferencial de cambio en la abundancia relativa entre las muestras fecales basales y finales de las Especies bacterianas *Phalarctobacterium_facecium*,

Ruminococcus_torques, *Prevotella _stercorea* y *Megamonas Funiformes* durante el tratamiento con metformina en los grupos TOL y NOTOL

El diferencial de cambio de la abundancia relativa en las especies *Phalarctobacterium_facecium* ($p=0,58$), *Ruminococcus_torques* ($p=0,59$), *Prevotella _stercorea* ($p=0,4$) y *Megamonas Funiformes* ($p=1$) no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos TOL y NOTOL tras el tratamiento con metformina.

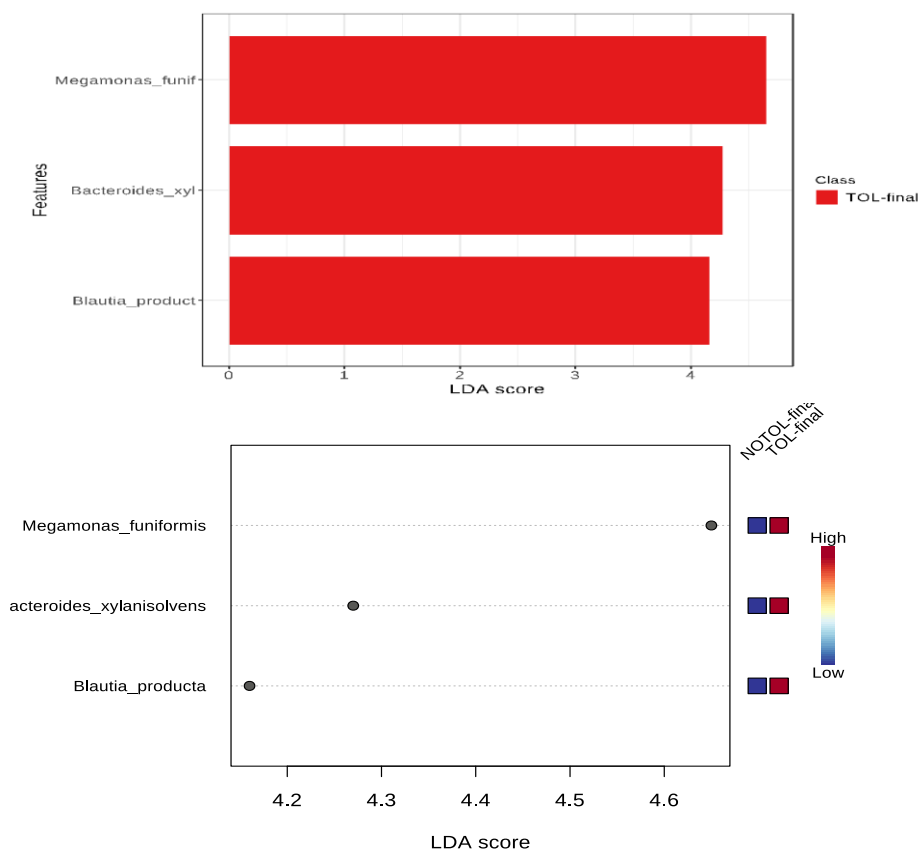


Figura 25. Gráficos con representación del resultado del LefSe (análisis discriminante lineal, efecto-tamaños) en el análisis comparativo final de las especies bacterianas secuenciadas entre los grupos tolerantes a metformina (TOL) e intolerantes durante la progresión de dosis (NOTOL). Se muestran las especies bacterianas que arrojaron $p < 0,05$ y LDA score ≥ 2 en las pruebas de Kruskal-Wallis y de Wilcoxon por pares, respectivamente. LDA score es el valor otorgado por el LefSe y los valores numéricamente superiores suponen mayor contribución de los biomarcadores en las diferencias entre grupos.

Las especies bacterianas *Megamonas funiformes* ($0,9 \pm 2,06\%$ TOL final vs $0,00 \pm 0,00\%$ NOTOL final, $p=0,031$ y LDA score 4,65), *Bacteroides_xylanisolvens* ($0,48 \pm 0,77\%$ TOL final vs $0,1 \pm 0,22\%$ NOTOL final, $p=0,021$ y LDA score 4,27) y *Blautia producta* ($0,5 \pm 0,33\%$ TOL final vs $0,2 \pm 0,21\%$ NOTOL final, $p=0,025$ y LDA score 4,16) mostraron una abundancia relativa superior en el grupo TOL en el análisis de las muestras fecales finales.

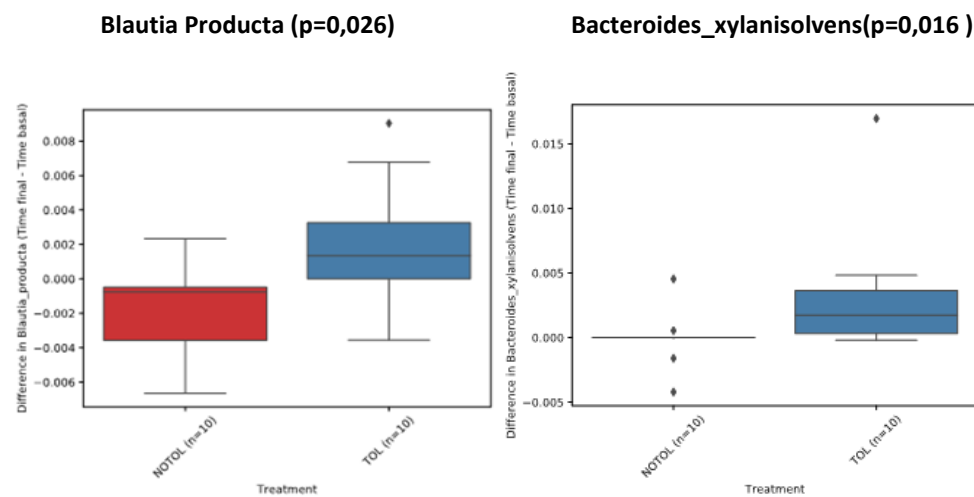
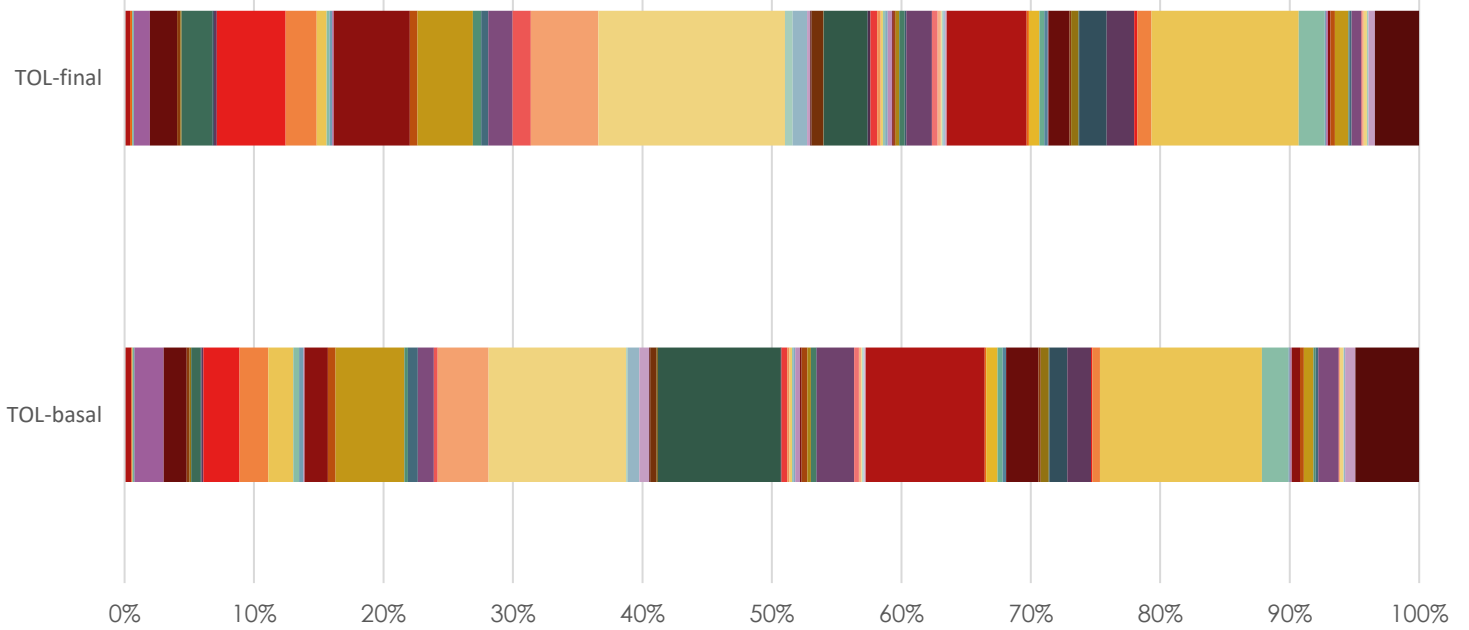


Figura 26. Diferencial de cambio en la abundancia relativa entre las muestras basales y finales de las Especies bacterianas *Megamonas Funiformes*, *Bacteroides_xylanisolvens* y *Blautia Producta* durante el tratamiento con metformina en los grupos tolerantes a metformina (TOL) e intolerantes durante la progresión de dosis (NOTOL)

El diferencial de cambio de abundancia relativa en *Blautia Producta* y *Bacteroides_xylanisolvens* mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, $p=0,026$ y $p=0,016$, respectivamente, siendo superior en las muestras fecales del grupo TOL. El diferencial de cambio de abundancia relativa de la especie bacteriana *Megamonas funiformes* no presentó diferencias estadísticamente significativas entre los grupos TOL y NOTOL ($p=1$)

Especies: TOL basal y TOL final

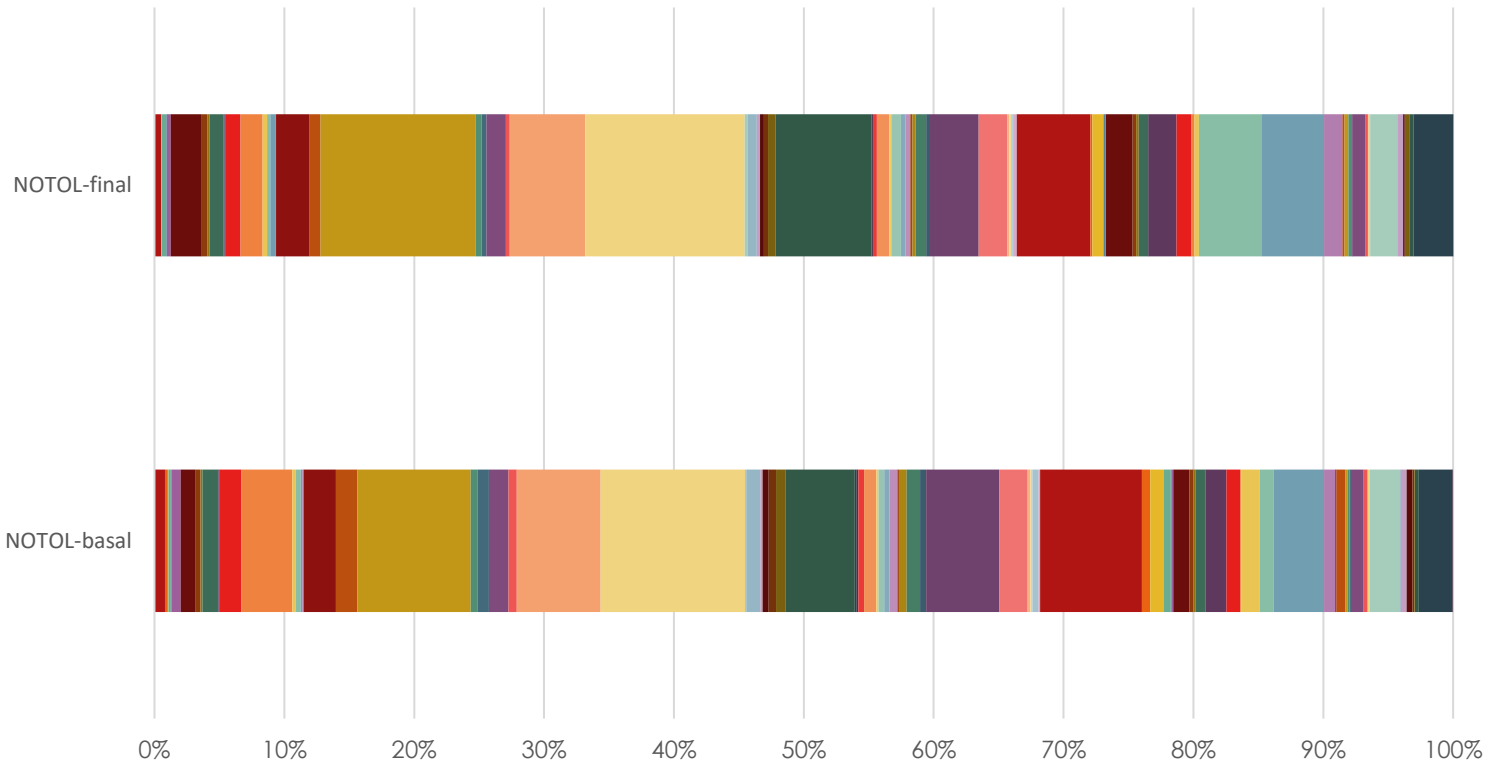


- | | | |
|---------------------------------------|--|--|
| ■ <i>Acidaminococcus_intestini</i> | ■ <i>Akkermansia_muciniphila</i> | ■ <i>Alistipes_Alistipes</i> |
| ■ <i>Alistipes_finegoldii</i> | ■ <i>Alistipes_indistinctus</i> | ■ <i>Alistipes_onderdonkii</i> |
| ■ <i>Alistipes_putredinis</i> | ■ <i>Alistipes_shahii</i> | ■ <i>Alistipes_sp_</i> |
| ■ <i>Bacteroides_caccae</i> | ■ <i>Bacteroides_cellulosilyticus</i> | ■ <i>Bacteroides_clarus</i> |
| ■ <i>Bacteroides_coprocola</i> | ■ <i>Bacteroides_dorei</i> | ■ <i>Bacteroides_eggerthii</i> |
| ■ <i>Bacteroides_faecis</i> | ■ <i>Bacteroides_finegoldii</i> | ■ <i>Bacteroides_intestinalis</i> |
| ■ <i>Bacteroides_massiliensis</i> | ■ <i>Bacteroides_ovatus</i> | ■ <i>Bacteroides_plebeius</i> |
| ■ <i>Bacteroides_salyersiae</i> | ■ <i>Bacteroides_sp_</i> | ■ <i>Bacteroides_stercoris</i> |
| ■ <i>Bacteroides_theraiotaomicron</i> | ■ <i>Bacteroides_uniformis</i> | ■ <i>Bacteroides_vulgatus</i> |
| ■ <i>Bacteroides_xylanisolvens</i> | ■ <i>Barnesiella_intestinihominis</i> | ■ <i>Bifidobacterium_adolescentis</i> |
| ■ <i>Bifidobacterium_bifidum</i> | ■ <i>Bifidobacterium_longum</i> | ■ <i>Bifidobacterium_pseudocatenulatum</i> |
| ■ <i>Bilophila_wadsworthia</i> | ■ <i>Blautia_faecis</i> | ■ <i>Blautia_luti</i> |
| ■ <i>Blautia_producta</i> | ■ <i>Blautia_wexlerae</i> | ■ <i>Butyricimonas_sp_</i> |
| ■ <i>Catenibacterium_mitsuokai</i> | ■ <i>Clostridium_sp_</i> | ■ <i>Collinsella_aerofaciens</i> |
| ■ <i>Coprobacter_fastidiosus</i> | ■ <i>Coprococcus_comes</i> | ■ <i>Dorea_formicigenerans</i> |
| ■ <i>Dorea_longicatena</i> | ■ <i>Eubacterium_biforme</i> | ■ <i>Eubacterium_eligens</i> |
| ■ <i>Eubacterium_hadrum</i> | ■ <i>Eubacterium_hallii</i> | ■ <i>Eubacterium_ramulus</i> |
| ■ <i>Eubacterium_rectale</i> | ■ <i>Eubacterium_siraeum</i> | ■ <i>Eubacterium_ventriosum</i> |
| ■ <i>Faecalibacterium_prausnitzii</i> | ■ <i>Flavonifractor_plautii</i> | ■ <i>Gemmiger_formicilis</i> |
| ■ <i>Haemophilus_parainfluenzae</i> | ■ <i>Lachnoclostridium_clostridioforme</i> | ■ <i>Lactobacillus_gasseri</i> |
| ■ <i>Lactobacillus_rogosae</i> | ■ <i>Mannheimia_varigena</i> | ■ <i>Odoribacter_splanchnicus</i> |
| ■ <i>Oscillibacter_sp_</i> | ■ <i>Parabacteroides_distasonis</i> | ■ <i>Parabacteroides_merdae</i> |
| ■ <i>Paraprevotella_clara</i> | ■ <i>Parasutterella_excrementihominis</i> | ■ <i>Prevotella_copri</i> |
| ■ <i>Roseburia_faecis</i> | ■ <i>Roseburia_hominis</i> | ■ <i>Roseburia_intestinalis</i> |
| ■ <i>Roseburia_inulinivorans</i> | ■ <i>Roseburia_sp_</i> | ■ <i>Ruminococcus_bromii</i> |
| ■ <i>Ruminococcus_faecis</i> | ■ <i>Ruminococcus_gauvreauii</i> | ■ <i>Ruminococcus_gnavus</i> |
| ■ <i>Ruminococcus_sp_</i> | ■ <i>Ruminococcus_torques</i> | ■ <i>Streptococcus_salivarius</i> |
| ■ <i>Streptococcus_sinensis</i> | ■ <i>Streptococcus_thermophilus</i> | ■ <i>Sutterella_stercoricans</i> |
| ■ <i>Sutterella_wadsworthensis</i> | | |

Figura 27. Abundancia relativa (%) de las especies bacterianas secuenciadas en las muestras fecales basales (n:10) y finales (n: 10) en el grupo de tolerantes a metformina (TOL)

Las especies secuenciadas en las muestras basales ordenadas numéricamente de manera descendente según su presencia en abundancia relativa entre el grupo TOL son: *Prevotella copri* (12,52%), *Bacteroides_vulgatus* (10,62%), *Bilophila_wadsworthia* (9,49%), *Faecalibacterium_prausnitzii*(9,18%), *Bacteroides_plebeius*(5,33%), *Sutterella_wadsworthensis*(4,92%), *Bacteroides_uniformis*(3,94%), *Eubacterium_eligens*(2,91%), *Bacteroides_coprocola*(2,8%), *Lactobacillus_rogosae*(2,5%) *Alistipes_nderdonkii*(2,26%), *Bacteroides_dorei* (2,06%), *Roseburia_faecis*(2,06%), *Bacteroides_eggerthii*(1,94%), *Parabacteroides_merdae* (1,84%), *Bacteroides_massiliensis*(1,81%), *Alistipes_putredinis*(1,8%), *Ruminococcus_gnavus*(1,58%), *Parabacteroides_distasonis* (1,37%) y *Bacteroides_stercoris*(1,24%). El resto de ASVs a nivel de especies tuvieron una presencia inferior al 1% en abundancia relativa. En las muestras fecales las especies cuantificadas como predominantes y ordenadas de mayor a menor según abundancia relativa fueron *Bacteroides_vulgatus*(14,43%), *Prevotella copri*(11,38%), *Faecalibacterium_prausnitzii*(6,19%), *Bacteroides_massiliensis*(5,89%), *Bacteroides_coprocola*(5,32%), *Bacteroides_uniformes* (5,23%), *Bacteroides_plebeius* (3,41%), *Sutterella_wadsworthensis*(3,41%), *Bilophila_wadsworthia*(3,36%), *Bacteroides_dorei* (2,4%), *Parabacteroides_merdae*(2,12%), *Parabacteroides_distasonis*(2,12%), *Alistipes_putredinis*(2,1%), *Roseburia_faecis*(1,98%), *Eubacterium_eligens*(1,98%), *Bacteroides_stercoris*(1,63%), *Lactobacillus_rogosae*(1,88%), *Bacteroides_thetaiotaomicron*(1,39%), *Alistipes_nderdonkii* (1,22%), *Barnesiella_intertinihominis*(1,11%), *Parasutterella_escrementihominis*(1,08%) y *Ruminococcus_bromii*(1,04%). El resto de las Especies presentes en las muestras fecales finales tuvieron una presencia inferior al 1% en abundancia relativa. Consecutivamente, se evaluaron los cambios entre Especies de las muestras basales y finales dentro del grupo TOL y se observaron diferencias estadísticamente significativas en *Ruminococcus_gnavus* ($p=0,49$, LDA score 4,59) reduciéndose su abundancia relativa tras la administración de metformina (1,58% en basal vs 0,79% final). El resto de las especies no presentaron cambios estadísticamente significativos en abundancia relativa durante la intervención (*Bacteroides_xylanisolvens* fue la bacteria que más se acercó a la misma sin superarla, $p=0,059$)

Especies: NOTOL basal y NOTOL final



- | | | |
|--|--|--|
| ■ <i>Acidaminococcus_intestini</i> | ■ <i>Akkermansia_muciniphila</i> | ■ <i>Alistipes_Alistipes</i> |
| ■ <i>Alistipes_finegoldii</i> | ■ <i>Alistipes_indistinctus</i> | ■ <i>Alistipes_onderdonkii</i> |
| ■ <i>Alistipes_putredinis</i> | ■ <i>Alistipes_shahii</i> | ■ <i>Alistipes_sp_</i> |
| ■ <i>Bacteroides_caccae</i> | ■ <i>Bacteroides_cellulosilyticus</i> | ■ <i>Bacteroides_clarus</i> |
| ■ <i>Bacteroides_coprocola</i> | ■ <i>Bacteroides_dorei</i> | ■ <i>Bacteroides_eggerthii</i> |
| ■ <i>Bacteroides_faecis</i> | ■ <i>Bacteroides_finegoldii</i> | ■ <i>Bacteroides_intestinalis</i> |
| ■ <i>Bacteroides_massiliensis</i> | ■ <i>Bacteroides_ovatus</i> | ■ <i>Bacteroides_plebeius</i> |
| ■ <i>Bacteroides_salyseriae</i> | ■ <i>Bacteroides_sp_</i> | ■ <i>Bacteroides_stercoris</i> |
| ■ <i>Bacteroides_thetaiotaomicron</i> | ■ <i>Bacteroides_uniformis</i> | ■ <i>Bacteroides_vulgatus</i> |
| ■ <i>Bacteroides_xylanisolvans</i> | ■ <i>Barnesiella_intestinihominis</i> | ■ <i>Bifidobacterium_adolescentis</i> |
| ■ <i>Bifidobacterium_bifidum</i> | ■ <i>Bifidobacterium_longum</i> | ■ <i>Bifidobacterium_pseudocatenulatum</i> |
| ■ <i>Bilophila_wadsworthia</i> | ■ <i>Blautia_faecis</i> | ■ <i>Blautia_luti</i> |
| ■ <i>Blautia_producta</i> | ■ <i>Blautia_wexlerae</i> | ■ <i>Butyricimonas_sp_</i> |
| ■ <i>Catenibacterium_mitsuokai</i> | ■ <i>Clostridium_sp_</i> | ■ <i>Collinsella_aerofaciens</i> |
| ■ <i>Coprobacter_fastidiosus</i> | ■ <i>Coprococcus_comes</i> | ■ <i>Dorea_formicigenerans</i> |
| ■ <i>Dorea_longicatena</i> | ■ <i>Eubacterium_biforme</i> | ■ <i>Eubacterium_eligens</i> |
| ■ <i>Eubacterium_hadrum</i> | ■ <i>Eubacterium_hallii</i> | ■ <i>Eubacterium_ramulus</i> |
| ■ <i>Eubacterium_rectale</i> | ■ <i>Eubacterium_siraeum</i> | ■ <i>Eubacterium_ventriosum</i> |
| ■ <i>Faecalibacterium_prausnitzii</i> | ■ <i>Flavonifractor_plautii</i> | ■ <i>Gemmiger_formicilis</i> |
| ■ <i>Haemophilus_parainfluenzae</i> | ■ <i>Lachnoclostridium_clostridioforme</i> | ■ <i>Lactobacillus_gasseri</i> |
| ■ <i>Lactobacillus_rogosae</i> | ■ <i>Mannheimia_varigena</i> | ■ <i>Megasphaera_sp_</i> |
| ■ <i>Odoribacter_splanchnicus</i> | ■ <i>Oscillibacter_sp_</i> | ■ <i>Parabacteroides_distasonis</i> |
| ■ <i>Parabacteroides_merdae</i> | ■ <i>Paraprevotella_clara</i> | ■ <i>Parasutterella_excrementihominis</i> |
| ■ <i>Phascolarctobacterium_faecium</i> | ■ <i>Prevotella_copri</i> | ■ <i>Roseburia_faecis</i> |
| ■ <i>Roseburia_hominis</i> | ■ <i>Roseburia_intestinalis</i> | ■ <i>Roseburia_inulinivorans</i> |
| ■ <i>Roseburia_sp_</i> | ■ <i>Ruminiclostridium_siraeum</i> | ■ <i>Ruminococcus_bromii</i> |
| ■ <i>Ruminococcus_faecis</i> | ■ <i>Ruminococcus_flavofaciens</i> | ■ <i>Ruminococcus_gauvreauii</i> |
| ■ <i>Ruminococcus_gnavus</i> | ■ <i>Ruminococcus_sp_</i> | ■ <i>Ruminococcus_torques</i> |
| ■ <i>Streptococcus_salivarius</i> | ■ <i>Streptococcus_sinensis</i> | ■ <i>Streptococcus_thermophilus</i> |
| ■ <i>Sutterella_stercoricans</i> | ■ <i>Sutterella_wadsworthensis</i> | ■ <i>Veillonella_alcalescens</i> |

Figura 28. Abundancia relativa (%) de las especies bacterianas secuenciadas en las muestras fecales basales (n:10) y finales (n: 10) en el grupo de intolerantes a metformina durante la progresión de dosis.

A nivel de Especies en el análisis de las muestras basales dentro del grupo NOTOL destaca la presencia *Bacterioides_vulgatus* en 11,2%, bacteria numéricamente superior respecto al resto de las especies secuenciadas. En orden decreciente según su abundancia relativa dentro de las muestras fecales basales: *Bacterioides plebius*(8,74%), *Faecalibacterium_prausnitzii*(7,84%), *Bacterioides uniformes*(6,46%), *Eubacterium_eligens*(5,6%), *Bilophila_wadsworthia*(5,34%), *Bacterioides_dorei* (3,92%), *Prevotella_copri* (3,87%), *Sutterella_wadsworthensis*(2,59%), *Bacterioides massiliensis*(2,48%), *Ruminococcus_gnavus*(2,29%), *Eubacterium_hadrum*(2,19%), *Bacterioides_coprocola*(1,66%), *Bacterioides_ovatus*(1,64%), *Parabacteroides_distasonis*(1,61%), *Bacterioides stercoris* (1,5%), *Parasutterella_excrementihominis*(1,43%), *Lactobacillus_rogosae*(1,24%), *Alistipes_putredinis*(1,16%), *Bacterioides_Caccae*(1,13%), *Phascolarctobacterium faecium* (1,1%), *Parabacteroides:merdae*(1,07%), *Barnesiella_intestinihominis*(1,07%), *Gemmiger_fomicilis*(1,05%) y *Dorea_longicatena*(1,05%). El resto de las especies presentes en las muestras basales tuvieron una abundancia relativa inferior al 1%. En el análisis de microbiota tras finalizar el tratamiento con metformina *Bacterioides_vulgatus* continúa siendo la bacteria predominante con 12,28 %. Las bacterias predominantes en muestras fecales finales en orden numéricamente decreciente fueron: *Bacterioides_plebeius* (11,95%), *Bilophila_wadsworthia*(7,36%), *Bacterioides uniformes* (5,82%), *Faecalibacterium_prausnitzii* (5,66%), *Prevotella_copri* (4,83%), *Phascolarctobacterium_faecium*(4,81%), *Eubacterium eligens*(3,75%), *Sutterella_wadsworthensis*(3,03%), *Bacterioides_massiliensis*(2,59%), *Alistipes_putredinis*(2,38%), *Eubacterium hadrum* (2,21%), *Parabacteroides_distasonis* (2,15%), *Ruminococcus_gnavus*(2,13%), *Lactobacillus_rogosae* (2,07%), *Bacterioides_dorei*(1,68%), *Bacterioides_stercoris*(1,49%), *Roseburia faecis*(1,49%), *Bacterioides coprocola* (1,2%), *Parabacteroides_merdae* (1,16%), *Bacterioides caccae*(1,08%) y *Ruminococcus_brommi*(1,04%). Las Especies restantes no llegaron al 1% en abundancia relativa en la secuenciación de todas las muestras fecales finales de la población de intolerantes a metformina. En la evaluación de la presencia de modificaciones a lo largo de la intervención a nivel de especies en este grupo no se observaron cambios estadísticamente significativos. La ausencia de cambios probablemente fue secundaria al poco tiempo de separación en la recogida de muestras fecales.

5.Comparación del perfil de microbiota entre todos los intolerantes a metformina confirmada y los dos grupos de controles: diabéticos tipo 2 en tratamiento con metformina de larga data (DM2) y controles sin diabetes (CT)

5.1 Filos



Figura 29. Filos secuenciados en las muestras fecales basales de las 25 muestras fecales de intolerantes a metformina confirmada (INT), 20 muestras fecales de diabéticos tipo 2 con metformina (DM2) y 20 muestras fecales grupo control sin diabetes (CT).

En la figura 29 se puede observar cómo los Filos más abundantes fueron Bacteroidetes, Firmicutes y Proteobacteria en la mayoría de las muestras analizadas. Los Filos con menor abundancia relativa en la mayoría de las muestras fecales analizadas fueron Tenericutes, Cyanobacteria y TM7.

Comparativa Filos

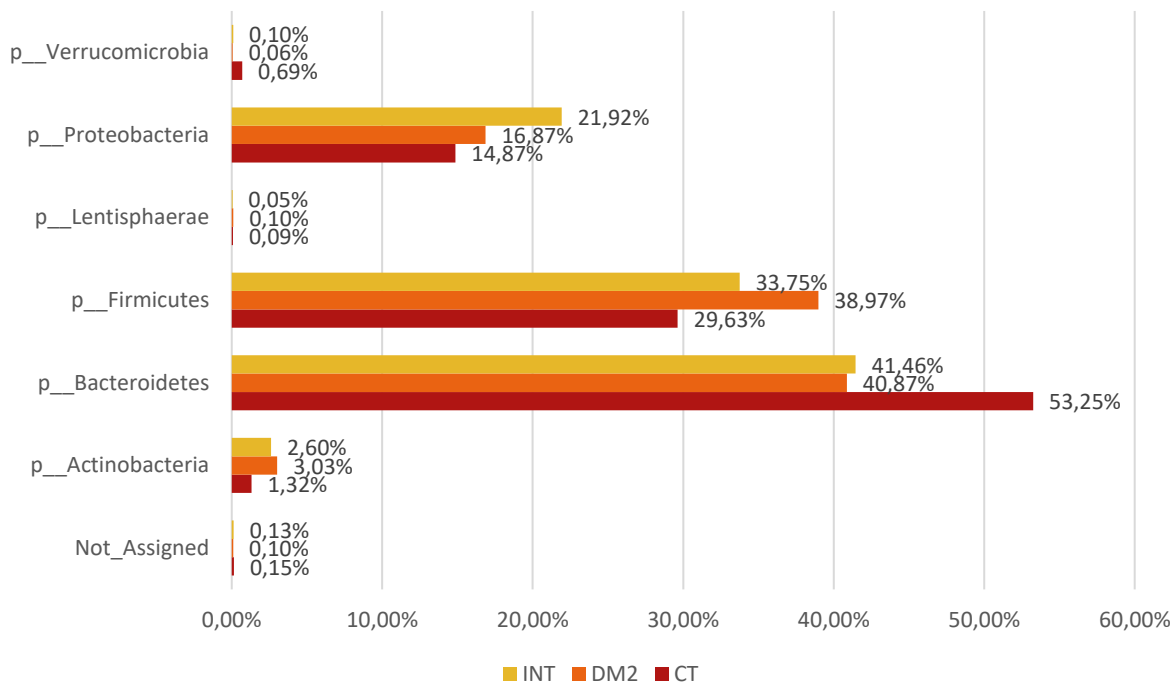


Figura 30. Comparativa de abundancia relativa de Filos cuantificados en los grupos intolerantes a metformina confirmados (INT) durante nuestro estudio de intervención, grupo de diabéticos con metformina (DM2) y grupo control (CT). Se consideraron diferencias significativas, $p < 0,05$ y LDA score ≥ 2

En la comparación de filos entre los grupos con intolerancia a metformina confirmada (INT), diabéticos con metformina (DM2) y controles (CT) sólo se encontraron diferencias significativas en Filo Verrumicrobia (0,69% CT vs 0,06% para DM2, vs 0,1% INT, $p = 0,03$ y LDA score 4,62).

Abundancia relativa:Filos	Intolerantes Confirmados (INT)		DM2 con metformina (DM2)		<i>p</i>
	Media	SD(±)	Media	SD(±)	
<i>n</i>	25		20		
<i>p__Actinobacteria</i> (%)	2,6	3,17	3	2,9	0,64
<i>p__Bacteroidetes</i> (%)	40,13	12,24	44,23	11,6	0,45
<i>p__Firmicutes</i> (%)	35,82	10,34	34,35	13,22	0,186
<i>p__Lentisphaerae</i> (%)	0,05	0,09	0,13	0,34	0,91
<i>p__Proteobacteria</i> (%)	18,51	13,9	18,74	11,95	0,74
<i>p__Verrucomicrobia</i> (%)	0,06	0,15	0,7	0,17	0,94
<i>P_Not Assigned</i> (%)	1,82	4,44	1,03	1,92	0,56

SD: Desviación estándar

Tabla 18. Comparativa de Filos presentes en abundancia relativa entre las muestras fecales basales de los grupos intolerantes a metformina confirmada (INT) y el grupo control sin diabetes (CT).

No se expone el valor de LDA score puesto que no ha habido diferencias significativas ($p < 0,05$) en el análisis no paramétrico.

Abundancia relativa:Filos	Intolerantes Confirmados (INT)		Controles (CT)		<i>p</i>	LDA score
	Media	SD(±)	Media	SD(±)		
<i>n</i>	25		20			
<i>p__Actinobacteria</i> (%)	2,6	3,17	1,52	2,09	0,263	
<i>p__Bacteroidetes</i> (%)	40,13	12,24	45,81	11,53	0,083	
<i>p__Firmicutes</i> (%)	35,82	10,34	36,1	12,4	0,715	
<i>p__Lentisphaerae</i> (%)	0,05	0,09	0,06	0,16	0,348	
<i>p__Proteobacteria</i> (%)	18,51	13,9	12,83	6,61	0,185	
<i>p__Verrucomicrobia</i> (%)	0,06	0,15	0,55	1,36	0,021	-4,62
<i>P_Not Assigned</i> (%)	1,82	4,44	1,94	1,69	0,411	

SD: Desviación estándar

Tabla 19. Comparativa de Filos presentes en abundancia relativa entre las muestras fecales basales del grupo intolerantes a metformina confirmada durante el estudio de intervención (INT) y grupo control sin diabetes (CT). El LDA score es el valor otorgado por el LEfSe (análisis discriminante lineal, efecto-tamaños) que se expone sólo en los Filos que hayan arrojado un $p < 0,05$ y $LDA \geq 2$.

Abundancia relativa:Filos	Controles (CT)		DM2 con metformina (DM2)		<i>p</i>	LDA score
	Media	SD(±)	Media	SD(±)		
<i>n</i>	25		20			
<i>p__Actinobacteria</i> (%)	1,52	2,09	3	2,9	0,066	
<i>p__Bacteroidetes</i> (%)	45,81	11,53	44,23	11,6	0,304	
<i>p__Firmicutes</i> (%)	36,1	12,4	34,35	13,22	0,705	
<i>p__Lentisphaerae</i> (%)	0,06	0,16	0,13	0,34	0,357	
<i>p__Proteobacteria</i> (%)	12,83	6,61	18,74	11,95	0,194	
<i>p__Verrucomicrobia</i> (%)	0,55	1,36	0,7	0,17	0,035	-4.62
<i>P_Not Assigned</i> (%)	1,94	1,69	1,03	1,92	0,513	

SD: Desviación estándar

Tabla 20. Comparativa de Filos presentes en abundancia relativa entre las muestras fecales basales entre diabéticos con metformina (DM2) y grupo control reclutado sin diabetes (CT). El LDA score es el valor otorgado por el LEfse (análisis discriminante lineal, efecto-tamaños) que se expone sólo en los Filos que hayan arrojado un $p < 0,05$ y $LDA \geq 2$.

El Filo Verrocumicrobia se muestra en el grupo control en las comparaciones a dos grupos con una abundancia relativa superior. Por otro lado, el LDA score es de igual valor en ambas comparaciones, es decir, el peso en definir diferencias se mantiene igual al comparar controles con diabéticos con metformina o controles con intolerantes a metformina confirmada.

5.2 Familias

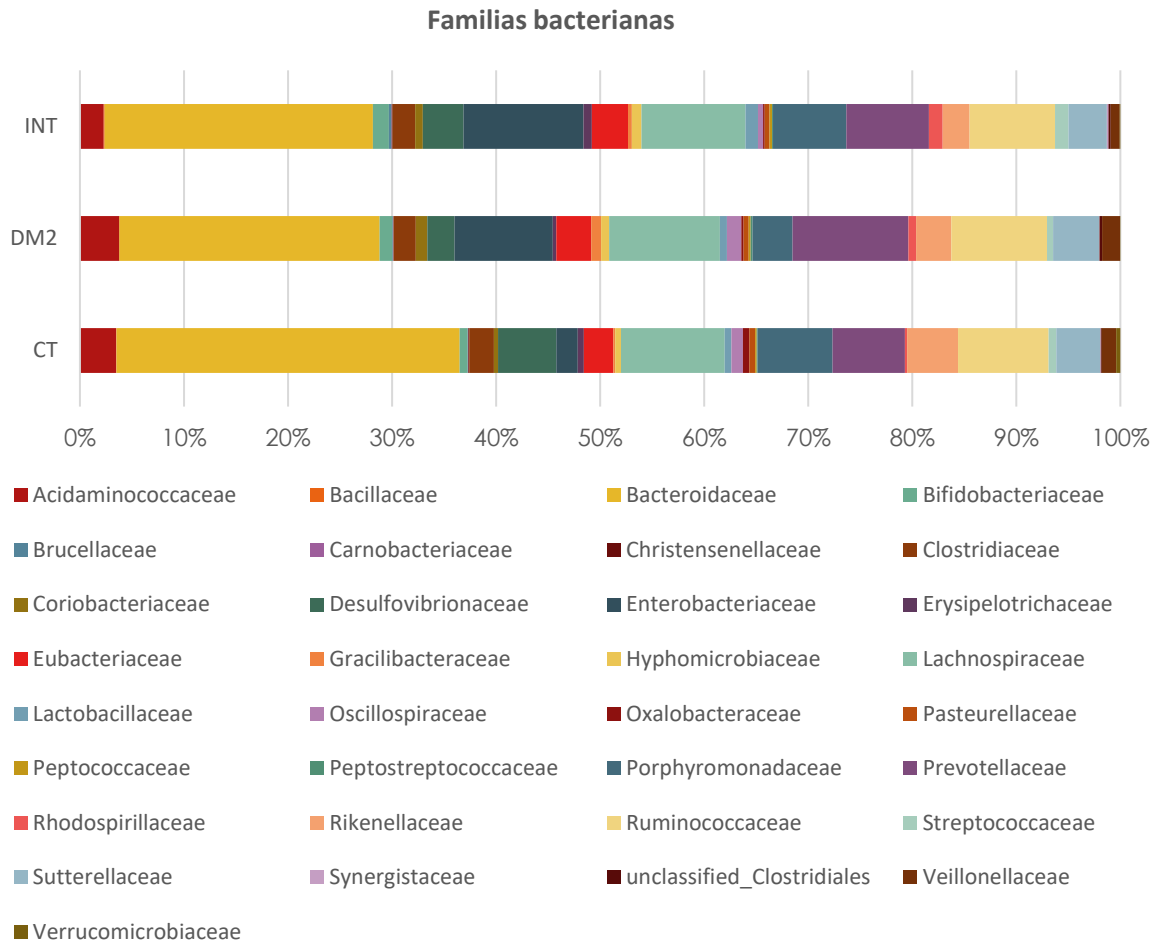


Figura 31. Abundancia relativa (%) de las familias bacterianas secuenciadas en las 25 muestras fecales del grupo intolerante a metformina confirmada (INT), de las 20 muestras fecales del grupo diabetes mellitus tipo 2 en tratamiento con metformina (DM2) y de las 20 muestras fecales del grupo control (CT)

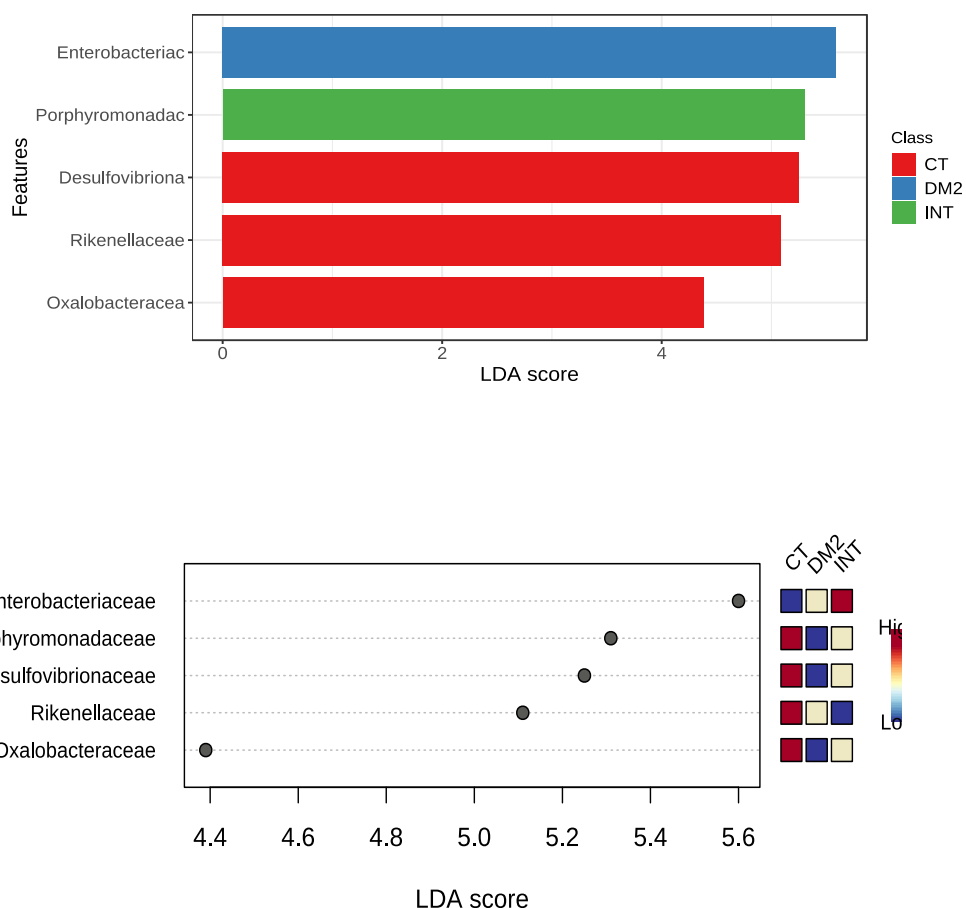


Figura 32. Gráficos con representación del resultado del LEfSe (análisis discriminante lineal, efecto-tamaños) en el análisis comparativo de las familias bacterianas secuenciadas entre los grupos: intolerantes confirmados tras la introducción de metformina (INT), diabéticos con metformina (DM2) y controles (CT). Se muestran las especies bacterianas que arrojaron $p < 0,05$ y LDA score ≥ 2 . LDA score es el valor otorgado por el LEfSe y los valores numéricamente superiores suponen mayor contribución de los biomarcadores en las diferencias entre grupos

En las familias bacterianas secuenciadas se mostraron diferencias estadísticamente significativas en los taxones *Desulfovibrionacea* ($4,03 \pm 3\%$ INT vs $2,71 \pm 2,66\%$ DM2 vs $6,24 \pm 4,99\%$ CT, $p = 0,035$ y LDA score 5,65), *Rikenellaceae* ($2,64 \pm 2,35\%$ INT vs $3,45 \pm 2,73\%$ DM2 vs $5,2 \pm 3,99\%$ CT, $p = 0,023$ y LDA score 5,11) y *Oxalobacteracea* ($0,15 \pm 0,3\%$ INT vs $0,17 \pm 34\%$ DM2 vs $0,64 \pm 0,8\%$ CT, $p = 0,005$ y LDA score 4,39) presentan niveles superiores dentro del grupo de controles sin diabetes. *Porphyromonadaceae* ($7,69 \pm 6,56\%$ INT vs $3,57 \pm 2,45\%$ DM2 vs $7,4 \pm 4,41\%$ CT, $p = 0,011$ y LDA score 5,31) está enriquecida entre las muestras fecales del grupo INT. Sin embargo, *Enterobacteriaceae* ($10,28 \pm 15,99\%$ INT vs $10,07 \pm 14,54\%$ DM2 vs $2,35 \pm 3,76\%$ CT, $p = 0,026$ y LDA score 5,6) es la Familia bacteriana que contribuye a mayores diferencias entre los tres grupos, siendo numéricamente superior entre las muestras fecales del grupo DM2.

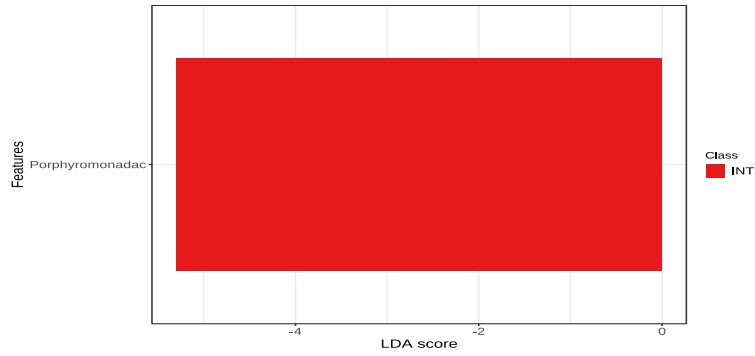


Figura 33. Histograma con representación del resultado de LefSe en el análisis de discriminante entre diferencias entre Familias entre el grupo con diabetes mellitus tipo 2 con tratamiento con metformina (DM2) y el grupo de intolerancia a metformina confirmada (INT) Cuanto mayor es el valor de LDA score mayor la contribución a las diferencias entre grupos ($p < 0,05$, LDA score > 2).

Se observaron diferencias estadísticamente significativas sólo a nivel de la familia bacteriana *Porphyromonadaceae*, con niveles superiores de abundancia relativa en el grupo INT (3,86% DM2 vs INT 7,06%, $p = 0,016$ y LDA score 5,23)

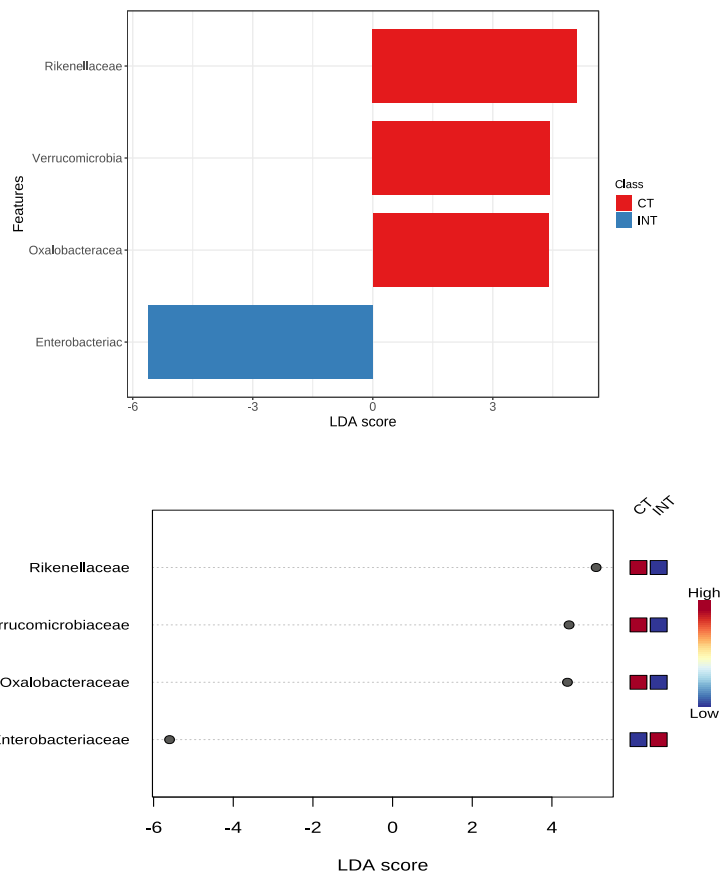


Figura 34. Gráficos con representación del resultado de LefSe en las familias bacterianas del grupo intolerancia a metformina confirmada (INT) y grupo control sin diabetes (CT). Cuanto mayor es el valor de LDA score mayor la contribución a las diferencias entre grupos ($p < 0,05$, LDA score > 2).

La herramienta de LEfSe arroja diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos a nivel de los biomarcadores *Rikenellaceae* (4,87% CT vs 2,51 % INT, $p=0,005$ y LDA score 4,78), *Verrococcococcaceae*(0,41% CT vs 0,08% INT, $p=0,042$ y LDA score 3,37), *Oxalobacteriaceae*(0,62% CT vs 0,13% INT, $p=0,002$ y LDA score 4,15), los cuales se representan enriquecidos en las muestras fecales del grupo CT. Por otro lado, la familia *Enterobacteriaceae* (2,05% CT vs 12,39% INT, $p= 0,049$ y LDA score -4,66) se representa más enriquecida en el grupo INT.

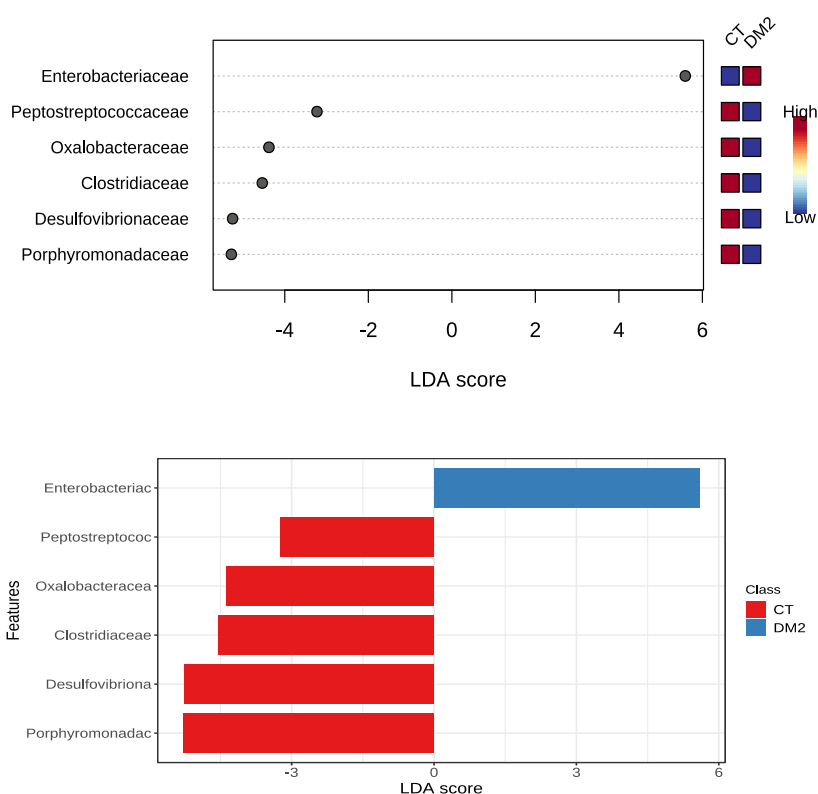


Figura 35. Gráficos con representación de los resultados del LEfSe sobre las diferencias entre Familias de los grupos controles sin diabetes (CT) y diabetes mellitus tipo 2 en tratamiento con metformina (DM2). Cuanto mayor es el valor de LDA score mayor la contribución a las diferencias entre grupos ($p<0,05$, LDA score ≥ 2).

La herramienta de LEfSe confirma con diferencias estadísticamente significativas que las Familias *Peptostreptococcaceae*(0,08% CT vs 0,19% DM2, $p=0,049$ y LDA score -3,23), *Oxalobacteraceae* (0,62% CT vs 0,19% DM2, $p=0,016$ y LDA score-4,38), *Clostridiaceae* (2,37% CT vs 2,13% DM2, $p=0,045$ y LDA score-4,54), *Desulfovibrionaceae* (5,61% CT vs 2,61% DM2, $p=0,016$ y LDA score-5,25), *Porphyromonadaceae*(7,2% CT vs 3,83% DM2, $p=0,003$ y LDA score -5,28) se muestran en mayor representación entre el grupo CT respecto al grupo DM2. Por último, *Enterobacteriaceae* (2,05% CT vs

9,43% DM2, $p=0,007$ y LDA score 5,59) es el biomarcador más predominante entre las muestras fecales de DM2

5.3 Géneros

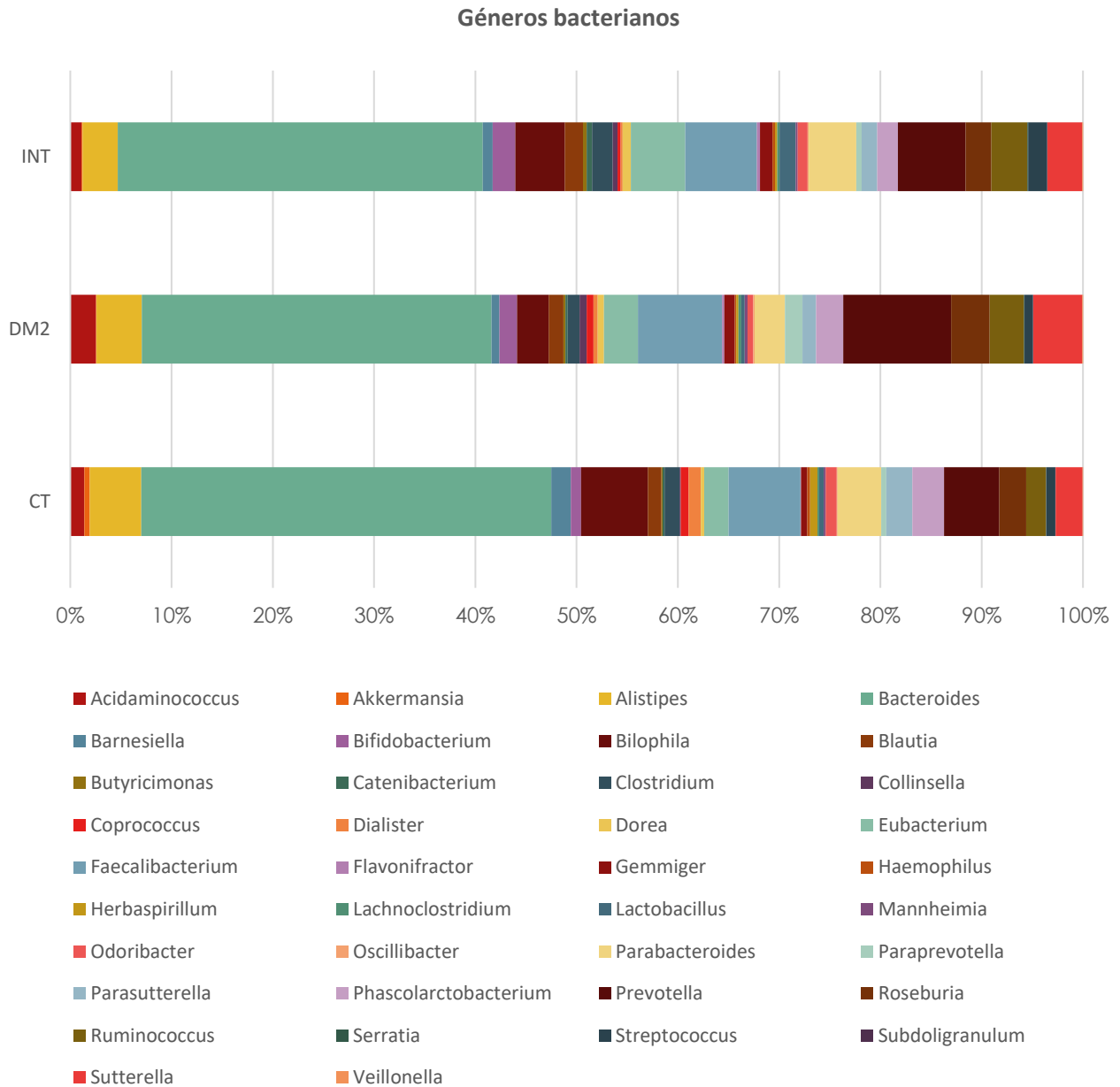


Figura 36. Abundancia relativa (%) de los géneros bacterianos secuenciadas en las 25 muestras fecales del grupo intolerante a metformina confirmada (INT), de las 20 muestras fecales del grupo diabetes mellitus tipo 2 en tratamiento con metformina y de las 20 muestras fecales del grupo control (CT)

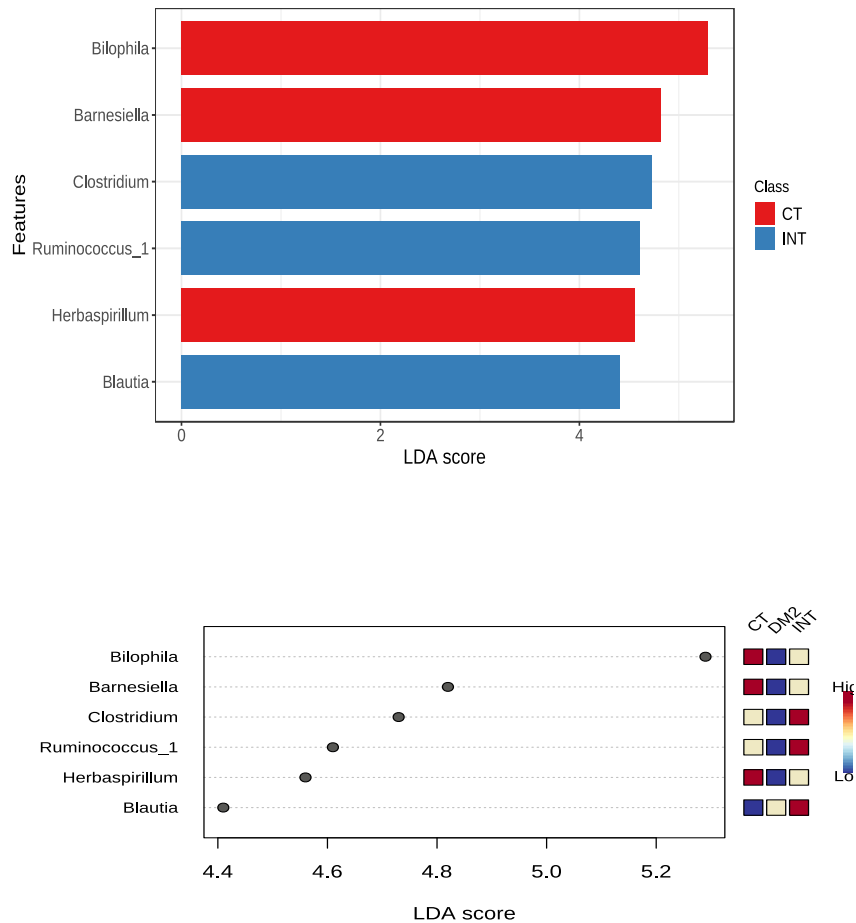


Figura 37. Gráficos con representación del resultado del LefSe (análisis discriminante lineal, efectos-tamaños) en el análisis comparativo de los géneros bacterianos secuenciados entre los grupos: intolerantes confirmados tras la introducción de metformina (INT), diabéticos con metformina (DM2) y controles (CT). Se muestran las especies bacterianas que arrojaron $p < 0,05$ y LDA score ≥ 2 . LDA score es el valor otorgado por el LefSe y los valores numéricamente superiores suponen mayor contribución de los biomarcadores en las diferencias entre grupos

Se muestran diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos a nivel de géneros bacterianos, siendo numéricamente superiores entre el grupo control los taxones *Barnesiella* ($0,97 \pm 1,44\%$ INT vs $0,63 \pm 0,91\%$ DM2 vs $1,94 \pm 2\%$ CT, $p=0,013$ y LDA score 4,82), *Bilophila* ($5,01 \pm 3,9\%$ INT vs $3,1 \pm 3,43\%$ DM2 vs $6,81 \pm 5,74\%$ CT, $p=0,032$ y LDA score 5,29) y *Herbaspirillum* ($0,21 \pm 0,42\%$ INT vs $0,22 \pm 0,45\%$ DM2 vs $0,94 \pm 0,94\%$ CT, $p=0,018$ y LDA score 4,56). Sin embargo, los géneros *Clostridium* ($2 \pm 1,58\%$ INT vs $1,00 \pm 0,75\%$ DM2 vs $1,55 \pm 1,15\%$ CT, $p=0,023$ y LDA score 4,79), *Blautia* ($1,64 \pm 1,81\%$ vs $1,17 \pm 1,32\%$ vs $1,28 \pm 2,97\%$, $p=0,022$ y LDA score 4,41) y *Ruminococcus_1* ($0,1 \pm 0,3\%$ INT vs $0,04 \pm 0,09\%$ DM2 vs $0,05 \pm 0,11\%$ CT, $p=0,023$ y LDA score 4,41) presentan una abundancia relativa superior dentro del grupo INT. En la herramienta del LefSe las bacterias *Bilophila*, *Barnesiella* y *Clostridium* muestran los valores más elevados y se pueden interpretar como los biomarcadores explicativos con mayor peso en las diferencias entre grupos.

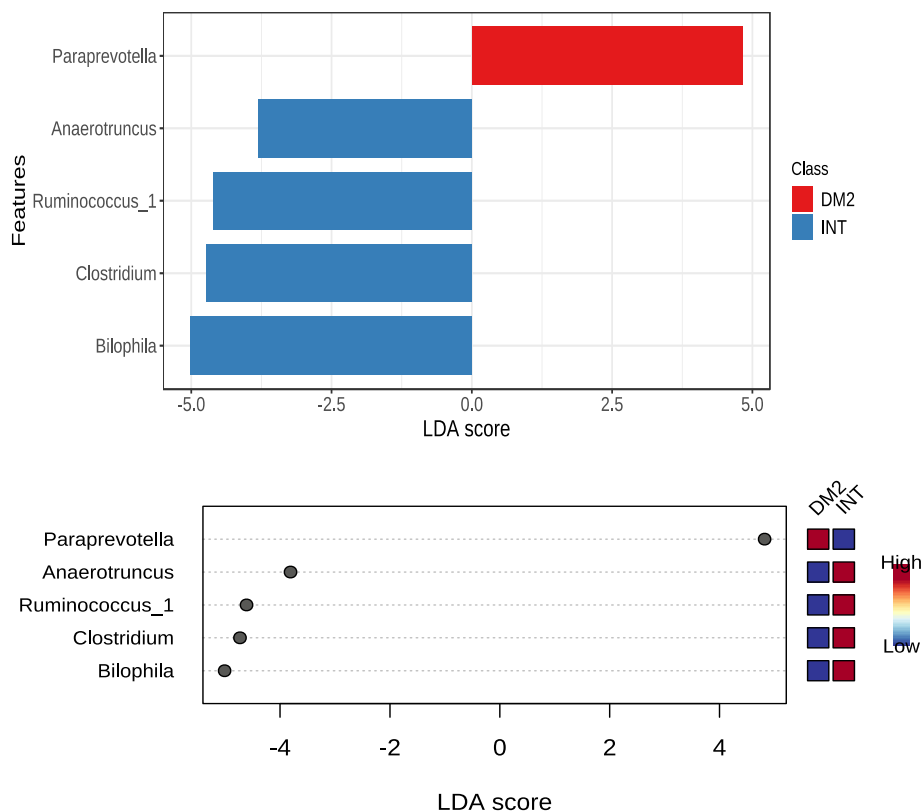


Figura 38. Gráficos con representación de los resultados del LefSe sobre las diferencias entre géneros de los grupos intolerancia a metformina confirmada (INT) y diabetes mellitus tipo 2 en tratamiento con metformina (DM2). Cuanto mayor es el valor de LDA score mayor la contribución a las diferencias entre grupos ($p < 0,05$, LDA score ≥ 2).

El género *Paraprevotella* se muestra superior entre las muestras fecales de DM2 respecto al grupo INT ($0,48 \pm 0,61\%$ INT vs $1,63 \pm 1,79\%$ DM2, $p = 0,025$ y LDA score 4,82). En el grupo INT se muestra un enriquecimiento de los géneros *Bilophila* ($5,01 \pm 3,9\%$ vs $3,1 \pm 3,43\%$, $p = 0,049$ y LDA score 5,01), *Clostridium* ($2 \pm 1,58\%$ vs $1 \pm 0,75\%$, $p = 0,005$ y LDA score -4,73) *Ruminococcus_1* ($1,17 \pm 1,35$ vs $0,47 \pm 0,46\%$, $p = 0,009$ y LDA score -4,61) y *Anarotruncus* ($0,13 \pm 0,41\%$ vs $0,00 \pm 0,01$, $p = 0,023$ y LDA score -3,81)

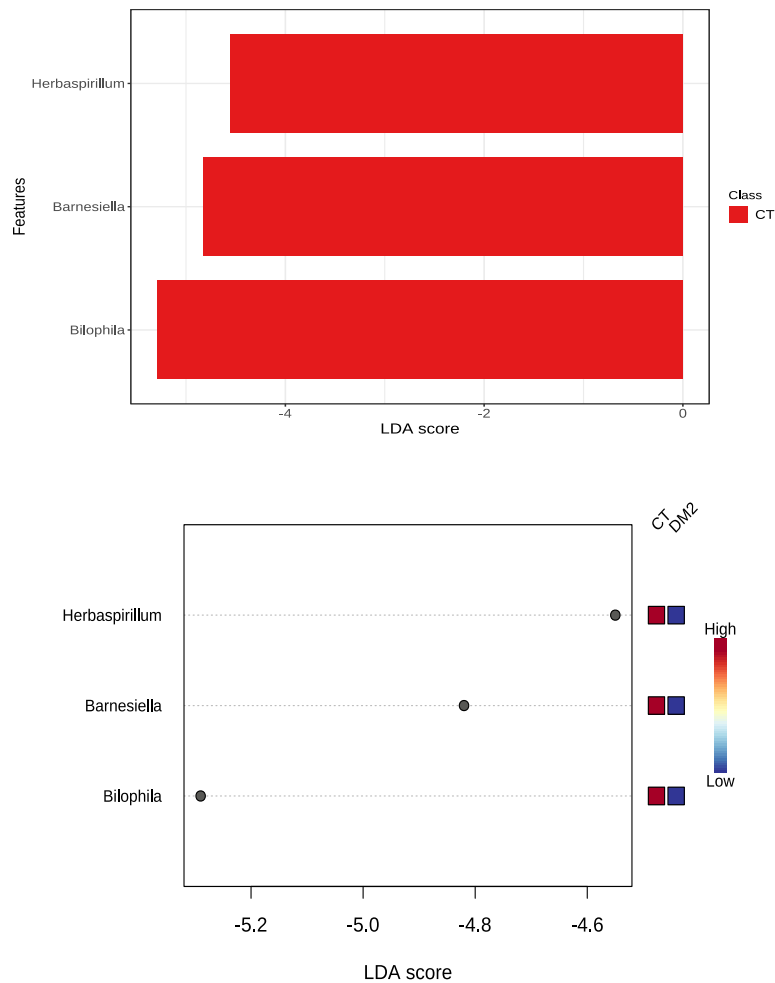


Figura 39. Gráficos con representación de los resultados del LefSe sobre las diferencias entre géneros de los grupos controles sin diabetes (CT) y diabetes mellitus tipo 2 en tratamiento con metformina (DM2). Cuanto mayor es el valor de LDA score mayor la contribución a las diferencias entre grupos ($p < 0,05$, LDA score ≥ 2).

Hay diferencias estadísticamente significativas a nivel dse caracterizan por presencia de valores numéricamente superiores entre el grupo control respecto a los diabéticos con metformina. En ambos gráficos se representa el valor más alto de LDA score para el taxón *Bilophila* ($3,1 \pm 3,43\%$ vs $6,81 \pm 5,74\%$, LDA score $-5,29$) seguido de *Barnesiella* ($0,63 \pm 0,91\%$ vs $1,94 \pm 2\%$, LDA score $-4,88$) y por último, *Herbasporillium* ($0,21 \pm 0,44\%$ vs $0,82 \pm 1,07\%$, LDA score $-4,75$). El género *Bilophila* representa el biomarcador que mayores diferencias arroja en la comparación de diabéticos con metformina respecto a las muestras fecales del grupo control. Asimismo, este taxón también extrae el LDA score mayor en la comparación de diabéticos con metformina versus intolerantes a metformina, por lo que se trata de un género menos representado en los pacientes con tratamiento con metformina.

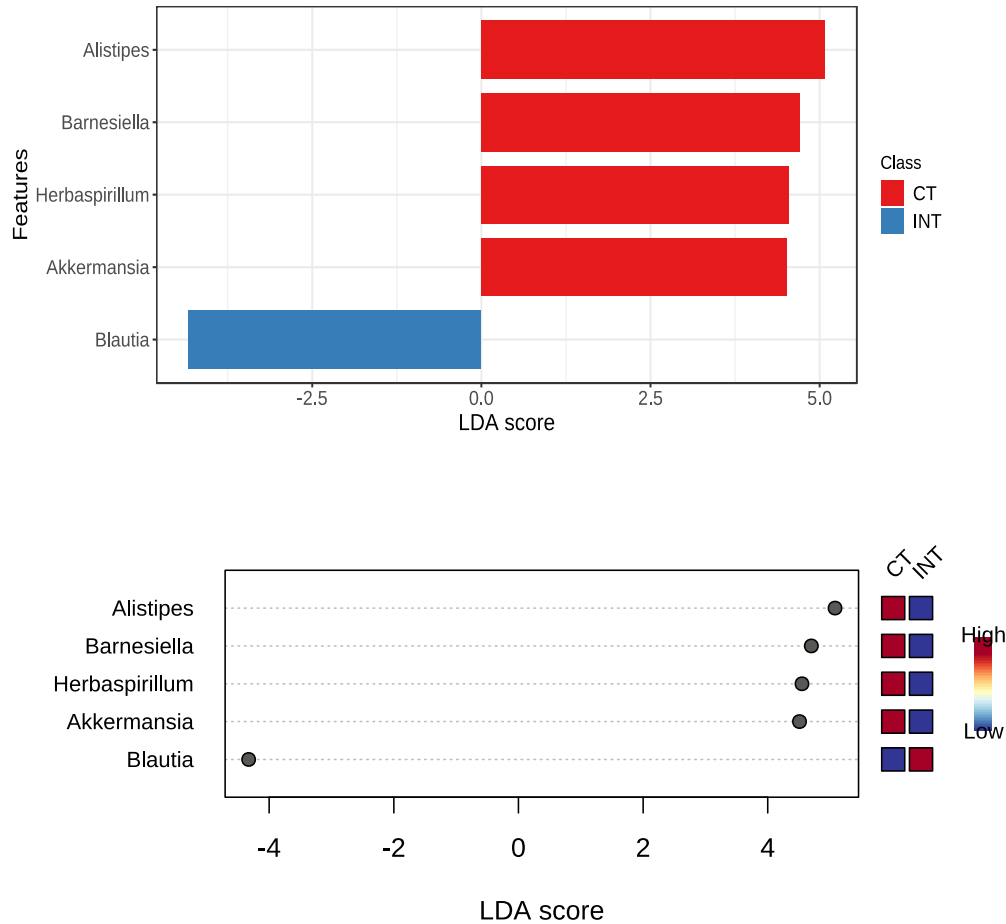


Figura 40. Gráficos con representación de los resultados del LefSe sobre las diferencias entre géneros de los grupos controles sin diabetes (CT) e intolerancia a metformina confirmada (INT). Cuanto mayor es el valor de LDA score mayor la contribución a las diferencias entre grupos ($p < 0,05$, LDA score ≥ 2).

Los géneros bacterianos que se mostraron más representados en el grupo CT fueron *Alistipes* ($3,52 \pm 3,21\%$ INT vs $5,72 \pm 4,35\%$ CT, $p = 0,018$ LDA score 5,08), *Barnesiella* ($0,97 \pm 1,44\%$ INT vs $1,94 \pm 2\%$ CT, LDA score 4,7 y $p = 0,018$), *Herbaspirillum* ($0,21 \pm 0,40\%$ INT vs $0,81 \pm 1,07\%$ CT, $p = 0,012$ y LDA score 4,55) y *Arkemansia* ($0,09 \pm 0,23$ INT vs $0,72 \pm 1,74\%$ CT, $p = 0,046$ y LDA score 4,51). En cambio, *Blautia* está más representada en las muestras fecales del grupo INT ($1,64 \pm 1,81$ INT vs $1,28 \pm 2,97\%$ CT, $p = 0,004$ y LDA score 2,97)

5.4 Especies



Figura 41. Abundancia relativa (%) de especies bacterianas secuenciadas en las 25 muestras fecales del grupo intolerante a metformina confirmada (INT), de las 20 muestras fecales del grupo diabetes mellitus tipo 2 en tratamiento con metformina y de las 20 muestras fecales del grupo control (CT)

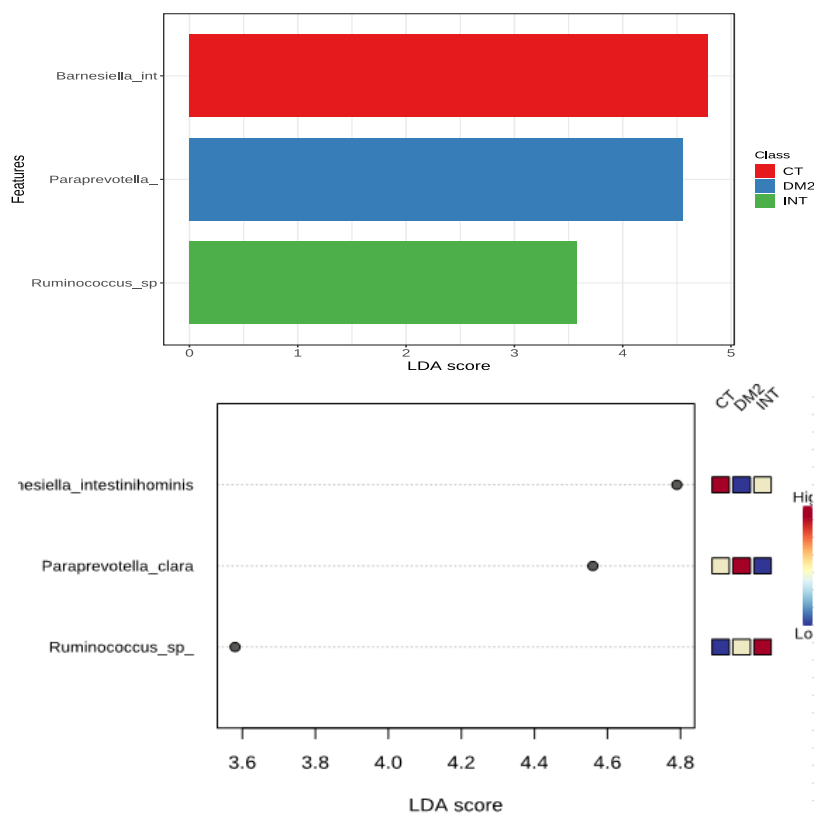


Figura 42. Gráficos con representación del resultado del LefSe (análisis discriminante lineal, efectos-tamaños) en el análisis comparativo de las especies bacterianas secuenciadas entre los grupos: intolerantes confirmados tras la introducción de metformina (INT), diabéticos con metformina (DM2) y controles (CT). Se muestran las especies bacterianas que arrojaron $p < 0,05$ y LDA score ≥ 2 . LDA score es el valor otorgado por el LefSe y los valores numéricamente superiores suponen mayor contribución de los biomarcadores en las diferencias entre grupos

En el análisis de las especies bacterianas secuenciadas en los tres grupos de estudio observamos que hay diferencias estadísticamente significativas en la especie *Barnesiella intestinihominis*, siendo su presencia superior en CT ($1,05 \pm 1,55\%$ INT vs $0,52 \pm 0,73\%$ DM2 vs $1,61 \pm 1,53\%$ CT, $p = 0,02$ y LDA score 4,79). Así pues, se puede considerar como el biomarcador que representa mayores diferencias entre los tres grupos de comparación. *Paraprevotella clara* es numéricamente superior en abundancia relativa en las muestras fecales de DM2 y su presencia está más reducida en el grupo INT ($0,1 \pm 0,19\%$ INT vs $0,71 \pm 1,09\%$ DM2 vs $0,23 \pm 0,4\%$ CT, $p = 0,024$ y LDA score 4,56). Por último, *Ruminococcus sp* está enriquecida entre las muestras fecales de INT ($0,09 \pm 0,13\%$ INT vs $0,05 \pm 0,15\%$ DM2 vs $0,02 \pm 0,05\%$ CT, $p = 0,02$ y LDA score 3,58).

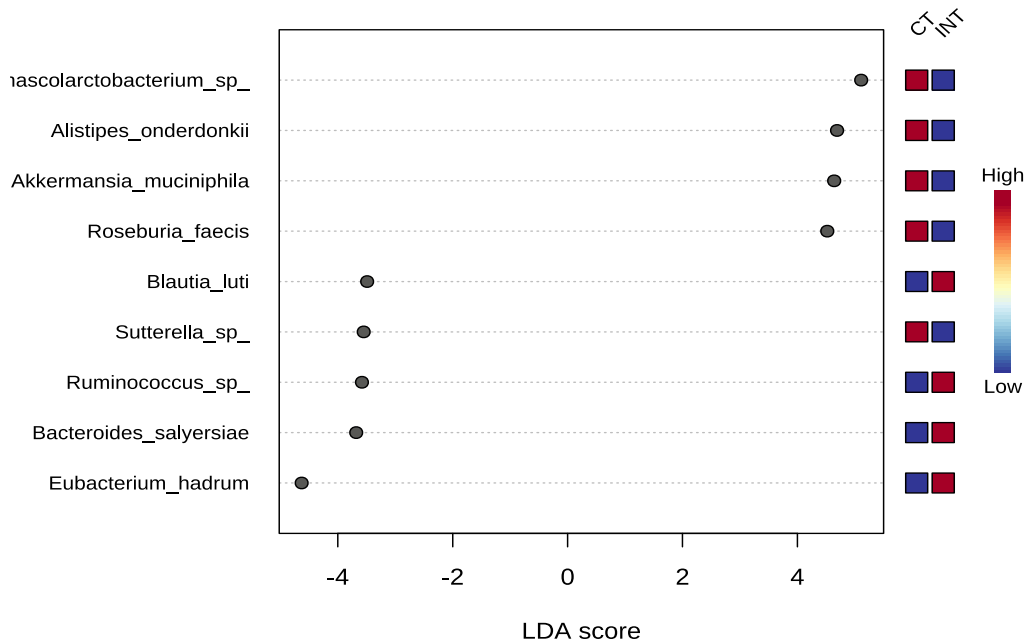
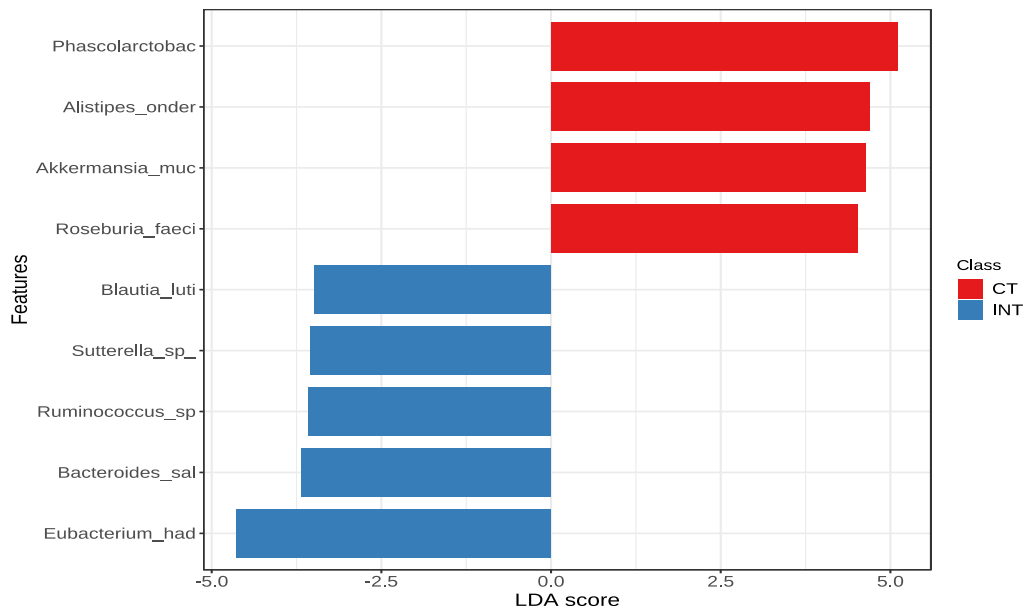


Figura 43. Gráficos con representación de los resultados del LEfSe sobre las diferencias entre las especies bacterianas de los grupos controles sin diabetes (CT) e intolerancia a metformina confirmada (INT). Cuanto mayor es el valor de LDA score mayor es la contribución a las diferencias entre grupos ($p < 0,05$, LDA score ≥ 2).

Las especies que se mostraron superiores en las muestras fecales de los CT en comparación al grupo INT fueron *Phascolarctobacterium sp* ($0,02 \pm 0,08\%$ INT vs $2,51 \pm 5,19\%$ CT, $p = 0,017$ y LDA score 5,11), *Alistipes onderdonkii*, ($0,57 \pm 1\%$ INT vs $1,49 \pm 2,38\%$ CT, $p = 0,031$ y LDA score 4,69) *Akkermansia muciniphila* ($0,11 \pm 0,29\%$ INT vs $0,88 \pm 2,19\%$ CT, $p = 0,045$ y LDA score 4,64) y *Roseburia faecis* ($1 \pm 1,23\%$ INT vs $1,48 \pm 1,28\%$ CT, $p = 0,044$ y LDA score 4,52). En cambio, las especies que se mostraron

enriquecidas entre las muestras fecales de los INT según el análisis discriminante lineal fueron cinco: *Eubacterium hadrum*(1,17±2%INT vs 0,4±0,95% CT, p=0,023 y LDA score-4,63), *Bacteroides salyersiae* (0,29±0,4%INT vs 0,21±0,72%CT, p=0,044 y LDA score-3,68), *Ruminococcus sp* (0,09±0,13%INT vs 0,02±0,05%CT, p=0,020 y LDA score -3,58), *Blautia luti* (0,09±0,17%INT vs 0,03±0,09% CT, p=0,036 y LDA score -3,49) y *Sutterella_sp* (0,55±1,48%INT vs 0,44±0,84%CT, p=0,025 y LDA score-3,55)

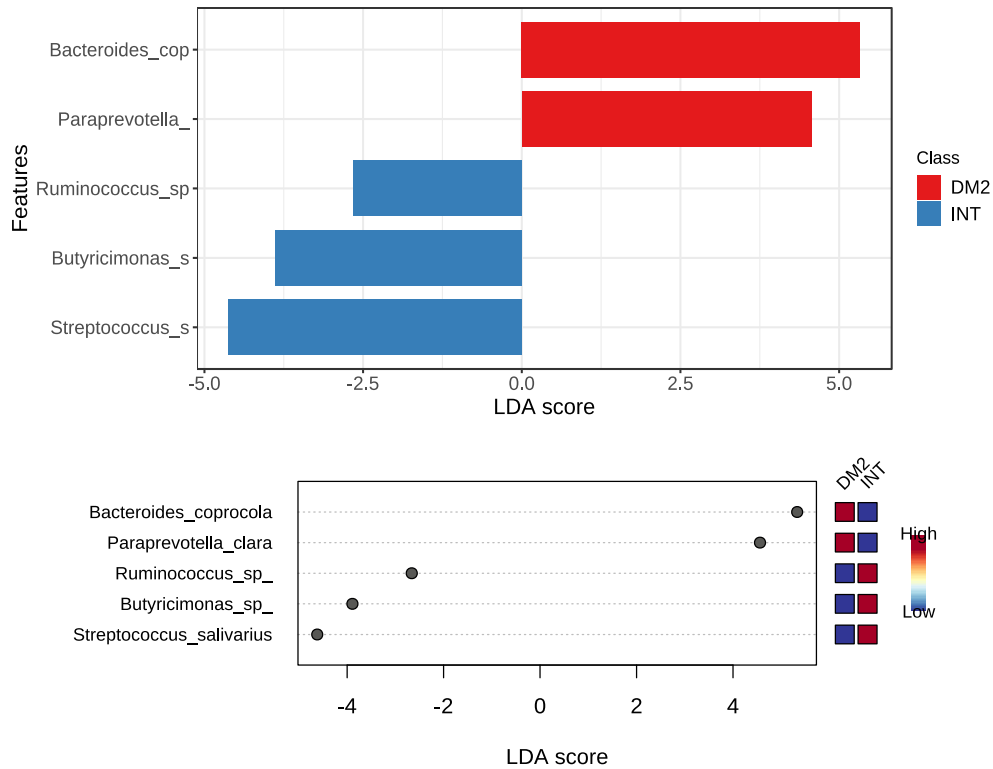


Figura 44. Gráficos con representación de los resultados del LefSe sobre las diferencias entre las especies bacterianas de los grupos intolerancia a metformina confirmada (INT) y diabetes mellitus tipo 2 en tratamiento con metformina (DM2). Cuanto mayor es el valor de LDA score mayor la contribución a las diferencias entre grupos ($p < 0,05$, LDA score ≥ 2).

El análisis de las especies bacterianas se observa enriquecimiento de los taxones *Bacteroides coprocola*(1,2±2,82% INT vs 5,32±10,79% DM2, p=0,045 y LDA score 5,33) y *Paraprevotella clara* (0,1±19% INT vs 0,71±1,09% DM2, p=0,008 y LDA score 4,56) en el grupo DM2. En las muestras fecales del grupo INT hay enriquecimiento de tres especies: *Streptococcus_salivarius*(0,7±1,54% INT vs 0,07±0,15% DM2, p=0,028 y LDA score-4,62) *Butyricimonas_sp*(0,19±0,38% INT vs 0,05±12%DM2, p= 0,015 y LDA score -3,89) y *Ruminococcus_sp*(0,09±0,13% INT vs 0,05±0,15% DM2, p=0,032 y LDA score-2,66)

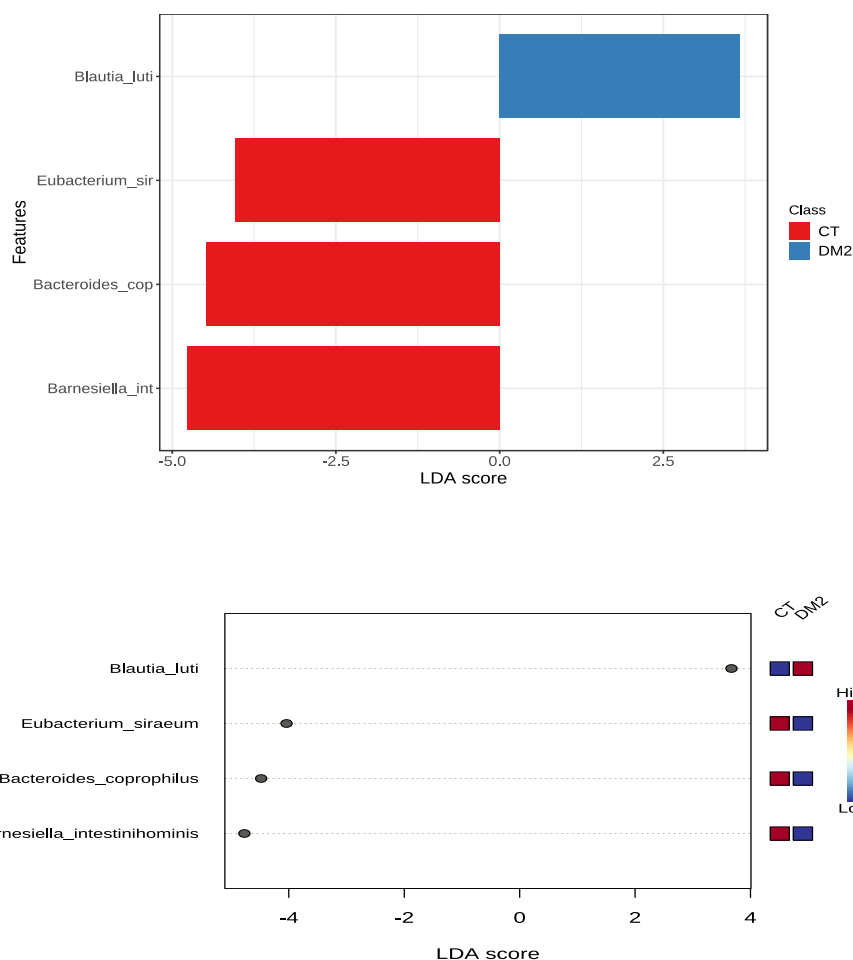


Figura 45. Gráficos con representación de los resultados del LefSe sobre las diferencias entre las especies bacterianas de los grupos controles sin diabetes (CT) y diabetes mellitus tipo 2 en tratamiento con metformina (DM2). Cuanto mayor es el valor de LDA score mayor la contribución a las diferencias entre grupos ($p < 0,05$, LDA score ≥ 2).

En el análisis discriminante lineal la especie bacteriana *Blautia_luti* ($0,11 \pm 0,16\%$ DM2 vs $0,03 \pm 0,09\%$ CT, $p = 0,027$ y LDA score 3,67) mostró diferencias estadísticamente significativas, con mayor abundancia relativa en las muestras fecales de DM2 en comparación con el grupo CT. Las Especies *Barnesiella_intestinihominis* ($0,52 \pm 0,73\%$ DM2 vs $1,61 \pm 1,53\%$ CT, $p = 0,005$ y LDA score -4,77), *Bacteroides_coprophilus* ($0,58 \pm 2,55\%$ DM2 vs $1,07 \pm 2,03\%$ CT, $p = 0,018$ y LDA score -4,48) y *Eubacterium_siraeum* ($0,03 \pm 0,08\%$ DM2 vs $0,2 \pm 0,39\%$ CT, $p = 0,034$ y LDA score -4,04) presentan valores superiores entre los controles.

6. Biodiversidad

La diversidad beta, mide las diferencias en la composición bacteriana de una o más muestras. Estas comparaciones podrán suceder en el espacio, es decir, cuando las mediciones se hacen en lugares distintos, pero en un mismo tiempo; o puede suceder en el tiempo, cuando las mediciones se realizan

en el mismo lugar, pero en distintos momentos. La beta diversidad se puede medir de forma cuantitativa o cualitativa, en la primera se considera la abundancia de los microorganismos observados, mientras que en la segunda solo se tiene en cuenta la presencia o ausencia. En cambio, la biodiversidad alfa es la encargada de informarnos de la diversidad intrínseca o heterogeneidad dentro de una determinada comunidad. En nuestro caso hemos utilizado 4 índices diferentes para evaluar la alfa biodiversidad:

- Observed_ASVs (riqueza): su basa en la cuantificación de ASVs diferentes en las muestras sin tomar en cuenta la importancia de las mismas, es decir, la distribución.
- Evenness (índice de Pielou): describe la homogeneidad dentro de las muestras.
- Índice Shannon(biodiversidad): valora la cantidad de especies diferentes que existen en la muestra y la cantidad relativa que hay para cada una de las especies, es decir, contempla la riqueza y la abundancia de las especies.
- Diversidad Faith biodiversidad (biodiversidad corregida filogenéticamente).

6.1. Biodiversidad beta en el análisis de las muestras fecales basales de los grupos clasificados según tolerancia a metformina: intolerantes precoces a metformina (INT), tolerantes a metformina (TOL) y no tolerantes durante la titulación de dosis (NOTOL)

La gráfica de coordenadas principales (PCoA) con matriz de distancia filogenética Unifrac ponderada y no ponderadas se utilizó para determinar las diferencias entre las muestras fecales de los tres grupos de estudio. Las matrices con medidas de diversidad beta se han analizado con PERMANOVA para encontrar diferencias de composición según su grupo de pertenencia.

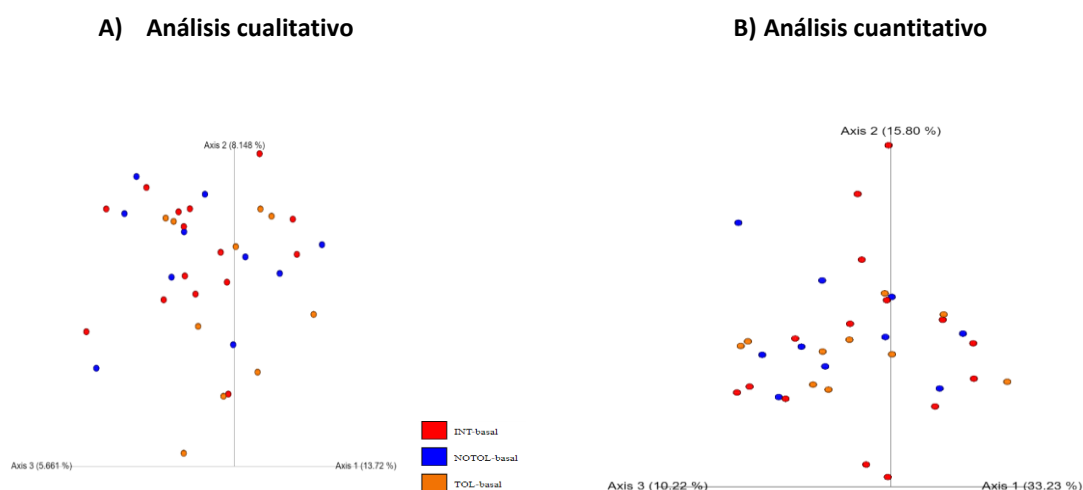


Figura 46. Gráficos PCoA representativos para la Biodiversidad beta de las muestras fecales basales de los tres grupos de estudio clasificados según tolerancia a metformina tras su introducción.

El análisis de PERMANOVA sobre la distancia uniFrac no ponderado o análisis cualitativo no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p=0,954$) y el análisis cuantitativo o

medidas uniFrac ponderadas tampoco mostró diferencias estadísticamente significativas ($p=0,944$) entre los grupos.

6.2. Biodiversidad beta en el análisis longitudinal de las poblaciones tolerantes a metformina (TOL) versus intolerantes a metformina en la progresión de dosis (NOTOL).

PCoA con matriz de distancia filogenética Unifrac ponderada y no ponderadas se utilizó para determinar las diferencias entre las muestras fecales de los dos grupos de estudios (TOL y NOTOL) en los diferentes tiempos (basal y final). Las matrices con medidas de diversidad beta se han analizado en busca de diferencias de composición según su grupo de pertenencia mediante PERMANOVA.

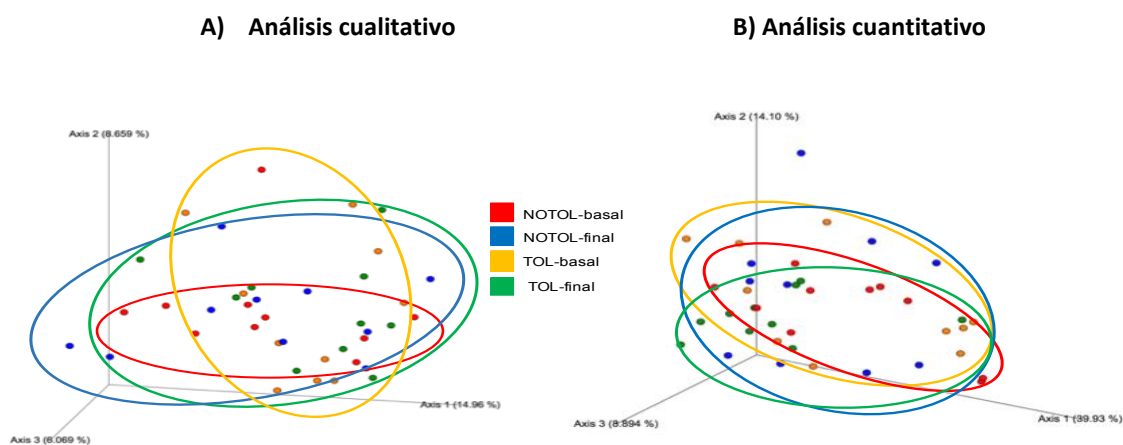


Figura 47. Gráficos PCoA representativos para la Biodiversidad beta en tiempo basal y final presente entre el grupo definido como TOL ($n=10$) y NOTOL ($n=10$).

En las gráficas de PCoA se representan los cuatro grupos de estudios a través de las medidas de distancia UniFrac. El análisis estadístico de PERMANOVA no presenta diferencias estadísticamente significativas en el estudio cualitativo de la biodiversidad beta (unweighted unifrac distancia: $p=0,944$) ni tampoco en el cuantitativo (weighted unifrac distancia: $p=0,423$).

A) Análisis cualitativo

B) Análisis cuantitativo

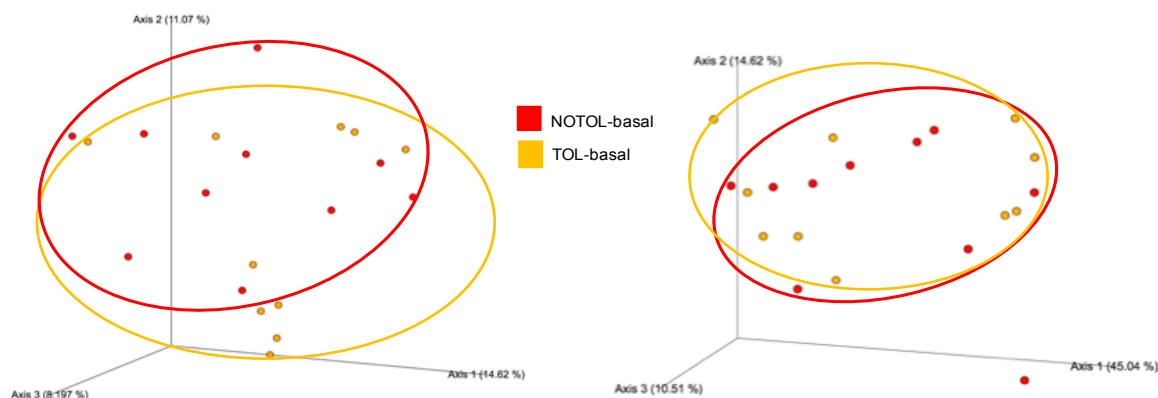


Figura 48. Gráficos PCoA representativos de la Biodiversidad beta en tiempo basal entre TOL versus NOTOL

En la evaluación de la betadiversidad en el momento basal no encontramos diferencias significativas (test PERMANOVA) ni a nivel cualitativo (unweighted unifrac distancia: $p=0,480$) ni tampoco a nivel cuantitativo (weighted unifrac distancia: $p=0,786$).

A) Análisis cualitativo

B) Análisis cuantitativo

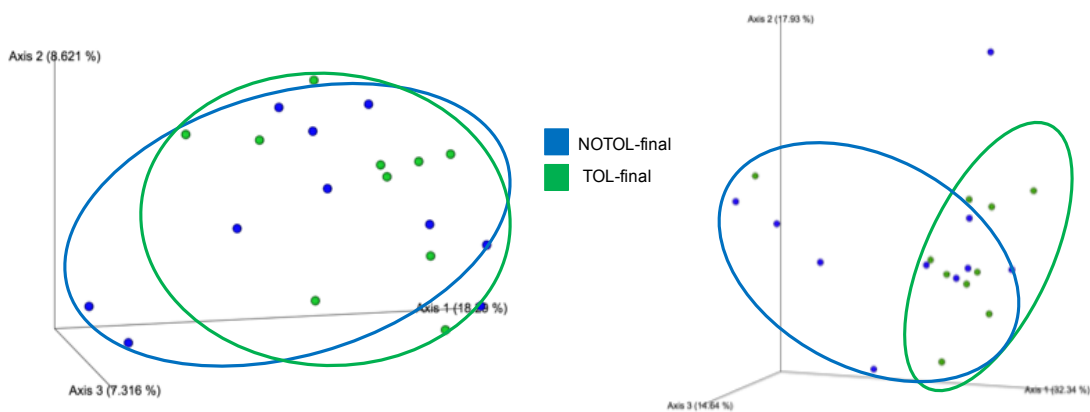
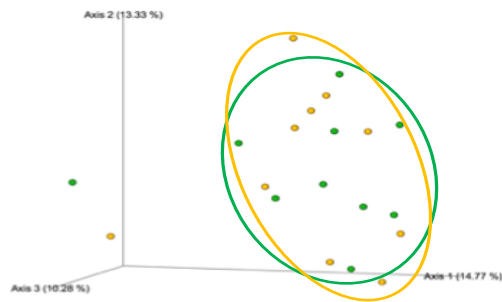


Figura 49. Gráficos PCoA representativos de Biodiversidad beta de las comunidades bacterianas en tiempo final entre el grupo TOL versus NOTOL.

El análisis estadístico no presentó diferencias significativas ni de forma cualitativa (unweighted unifrac distancia: $p=0,570$) ni cuantitativa (weighted unifrac distancia: $p=0,496$).

A) Análisis Cualitativo



B) Análisis Cuantitativo

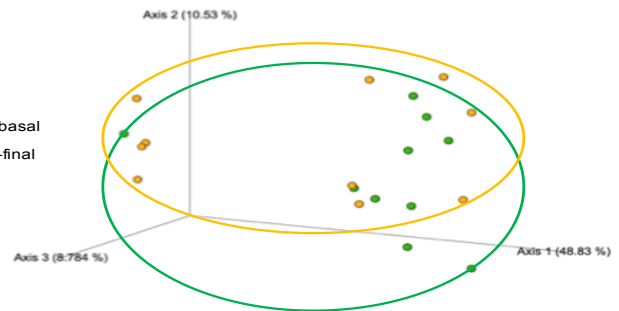
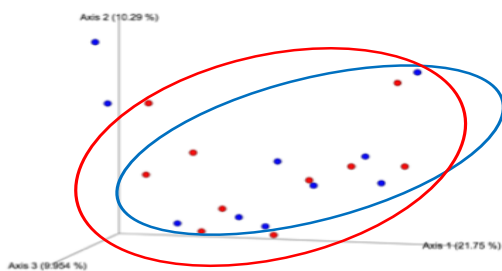


Figura 50. Gráfico PCoA representativo de Betadiversidad de las comunidades bacterianas dentro del grupo TOL (n=10) en muestras fecales basales y finales.

En el análisis estadístico no encontramos diferencias significativas entre tiempo basal y final en la valoración cualitativa (unweighted unifrac distance: $p=0,570$) ni cuantitativa (weighted unifrac distance: $p=0,496$) de las muestras fecales del grupo TOL.

A) Análisis Cualitativo



B) Análisis Cuantitativo

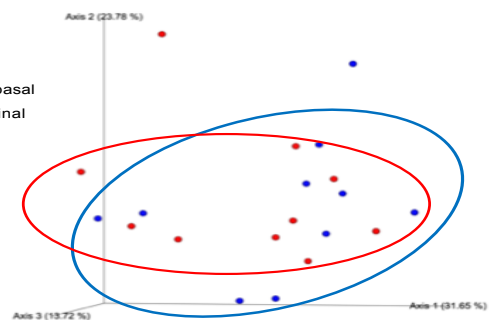


Figura 51. Gráfico PCoA representativo de Betadiversidad de las comunidades bacterianas dentro de las muestras fecales del grupo NOTOL

Entre las muestras de los pacientes clasificados en el grupo NOTOL no hay diferencias estadísticamente significativas en la betadiversidad, ni a nivel cualitativo (unweighted distance $P=0,999$) ni cuantitativo (weighted, $P=0,971$).

6.3. Biodiversidad beta en el análisis de las muestras fecales de todos intolerantes a metformina y los dos grupos controles reclutados: diabetes mellitus tipo 2 en tratamiento con metformina y controles sin diabetes

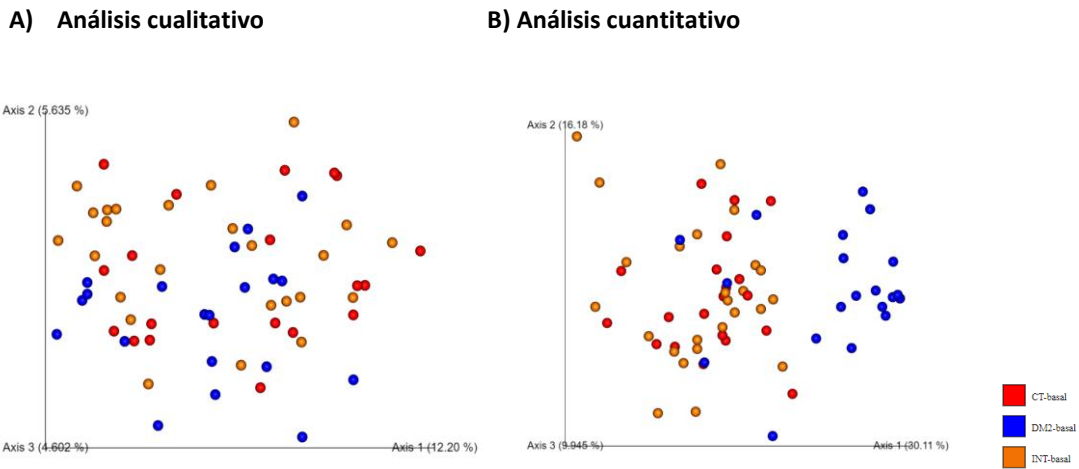


Figura 52. Gráficos PCoA para la biodiversidad beta de intolerantes a metformina (INT) respecto a ambos grupos controles reclutados; diabéticos con metformina (DM2) y controles sin diabetes (CT)

Atendiendo al análisis de PERMANOVA de los tres grupos se observan diferencias entre las poblaciones microbianas tanto en su parte cualitativa ($p=0.006$; unweighted unifrac distance) como cuantitativa ($p=0.001$; weighted unifrac distance). En los gráficos PCoA se puede visualizar como la biodiversidad beta de las muestras fecales del grupo DM2 presenta mayores distancias con el grupo CT. Asimismo, en el análisis comparativo de los grupos por parejas la biodiversidad beta de las muestras fecales del grupo INT versus DM2 no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,163$; unweighted unifrac distance y $p=0,241$; weighted unifrac distance)

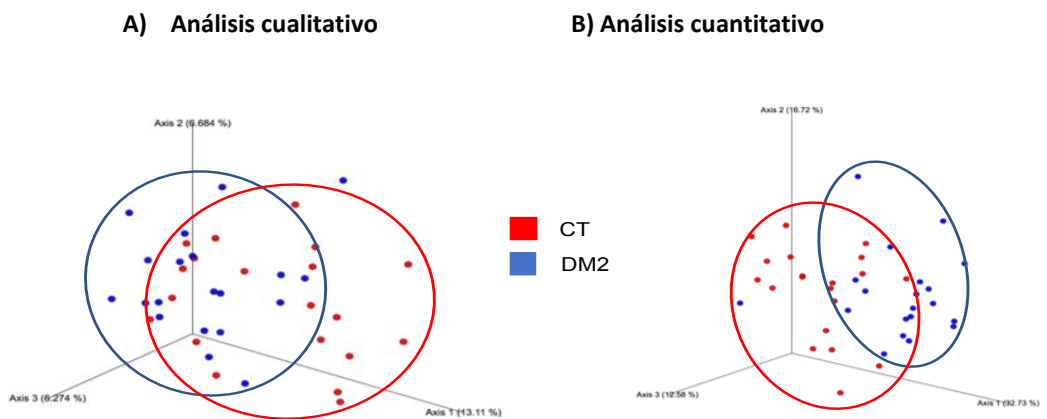


Figura 53. Gráficos PCoA para la biodiversidad beta de controles sin diabetes (CT) y diabéticos con metformina (DM2)

En las gráficas de PCoA podemos observar que ambas poblaciones microbianas se diferencian entre sí, tanto en el análisis cualitativo($p=0,01$, unweight unifrac distancia) como en el análisis cuantitativo($p=0,001$, weight unifrac distancia).

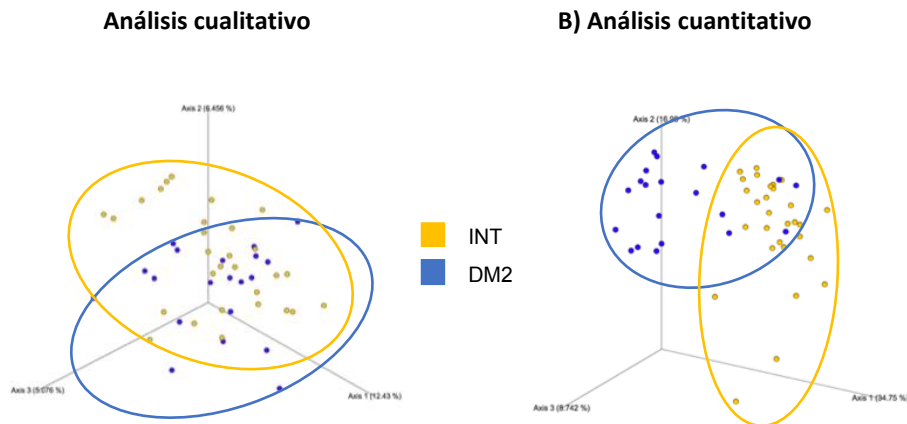


Figura 54. Gráficos PCoA para biodiversidad beta de diabéticos en tratamiento con metformina (DM2) e intolerantes a metformina confirmada(INT)

Hay diferencias entre microbiota intestinal de intolerantes respecto al grupo de diabéticos con metformina, tanto cualitativamente, distancias UniFrac unweighted ($p=0,005$), como en distancias weighted ($p=0,001$) en el análisis de PERMANOVA.

6.4 Biodiversidad alfa de las muestras fecales basales de los grupos clasificados según tolerancia a metformina durante el estudio de intervención: intolerantes precoces a metformina (INT), tolerantes a metformina (TOL) y no tolerantes durante la progresión de dosis del tratamiento (NOTOL)

6.4.1 Observed ASV

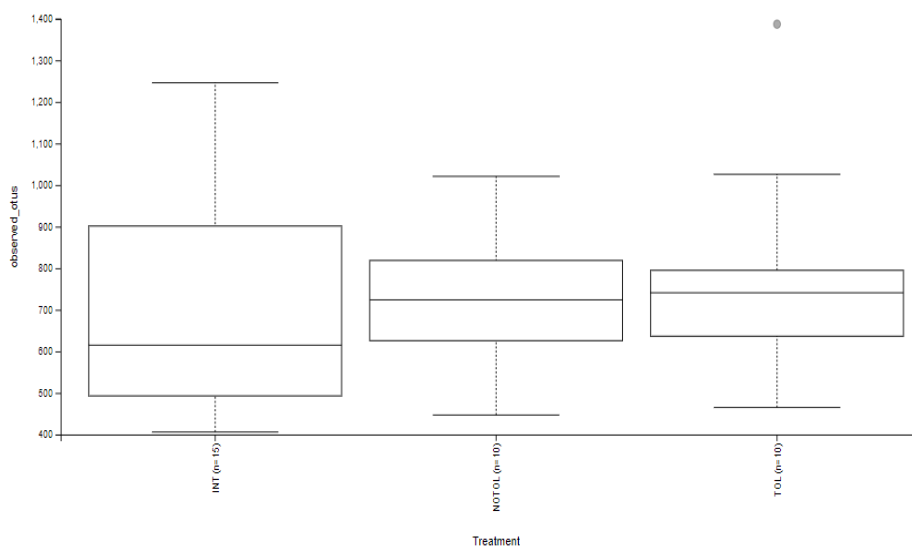


Figura 55. Gráfico de cajas y bigotes con la comparación de ASV observed en muestras fecales basales de los tres grupos clasificados según su grado de tolerancia a metformina en nuestro estudio.

El análisis de Kruskal-Wallis para ASV observadas entre los tres grupos no mostró diferencias estadísticamente significativas ($p= 0,825$)

Grupos		H	pvalor	q valor
INT (n=15)	NOTOL (n=10)	0.003078	0.956	0.956
	TOL (n=10)	0.481325	0.488	0.956

Tabla 21. Prueba de Kruskal-Wallis por pares de ASV observed de las muestras fecales basales de los grupos clasificados según su grado de tolerancia a metformina en nuestro estudio.

6.4.2 Eveness(Indice Pileau)

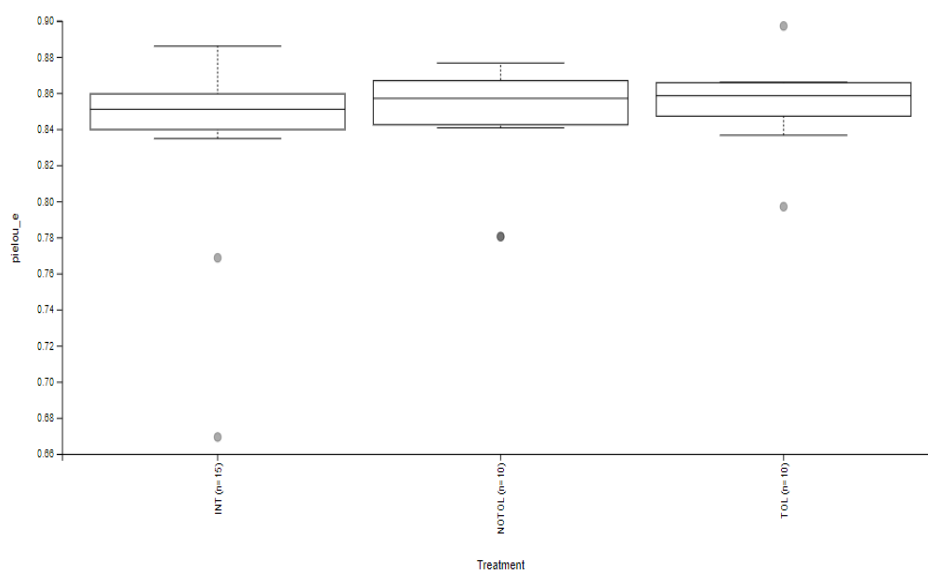


Figura 56. Gráfico con la comparación del índice Eveness en muestras fecales basales de los tres grupos clasificados según su grado de tolerancia a metformina en nuestro estudio.

En el análisis de las diferencias para Eveness(homogeneidad de las muestras) entre los tres grupos mediante el test Kruskal-Wallis no arrojan diferencias estadísticamente significativas ($p=0,702$)

Grupos		H	p-valor	q-valor
INT (n=15)	NOTOL (n=10)	0.249231	0.618	0.926
	TOL (n=10)	0.787692	0.375	0.926

Tabla 22. Prueba de Kruskal-Wallis por parejas para Eveness de las muestras fecales basales de los grupos clasificados según su grado de tolerancia a metformina en nuestro estudio.

6.4.3 Índice Shannon

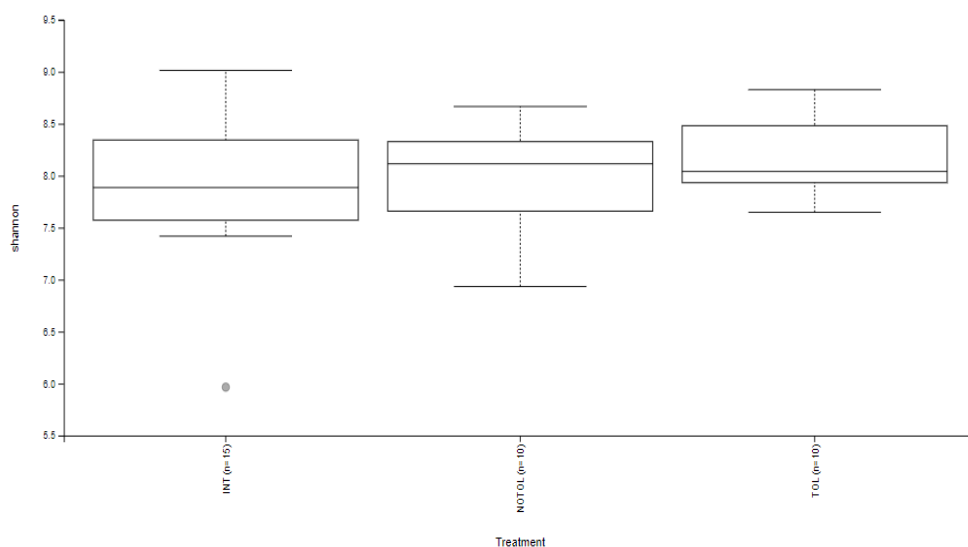


Figura 57. Gráfico de cajas y bigotes con la comparación del índice Shannon en muestras fecales basales de los tres grupos clasificados según su grado de tolerancia a metformina en nuestro estudio.

En el análisis de la prueba de Kruskal Wallis para todos los grupos no mostró diferencias estadísticamente significativas para Índice Shannon ($p=0,489$)

Grupos		H	p-valor	q-valor
INT (n=15)	NOTOL (n=10)	0.150769	0.698	0.698
	TOL (n=10)	1.627692	0.202	0.606

Tabla 23. Prueba de Kruskal-Wallis por parejas para Índice Shannon de las muestras fecales basales de los grupos clasificados según su grado de tolerancia a metformina en nuestro estudio

6.4.4 Diversidad Faith.

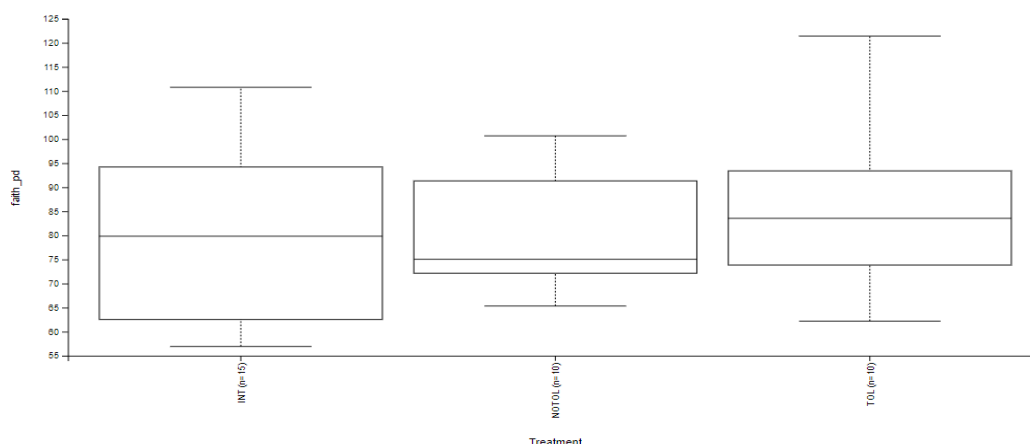


Figura 58. Gráfico de cajas y bigotes con la comparación del índice Shannon en muestras fecales basales de los tres grupos clasificados según su grado de tolerancia a metformina en nuestro estudio

En el análisis de la diversidad corregida filogenéticamente no presenta diferencias entre grupos en el análisis de Kruskal-Wallis($p=0,848$)

Grupos		H	p-valor	q-valor
INT (n=15)	NOTOL (n=10)	0.110769	0.739	0.739
	TOL (n=10)	0.249231	0.618	0.739

Tabla 24. Prueba de Kruskal-Wallis por parejas para Diversidad Faith de las muestras fecales basales de los grupos clasificados según su grado de tolerancia a metformina en nuestro estudio.

6.5 Biodiversidad alfa en el análisis longitudinal de las poblaciones tolerantes a metformina (TOL) versus intolerantes durante la progresión de dosis (NOTOL).

6.5.1 Observed ASV

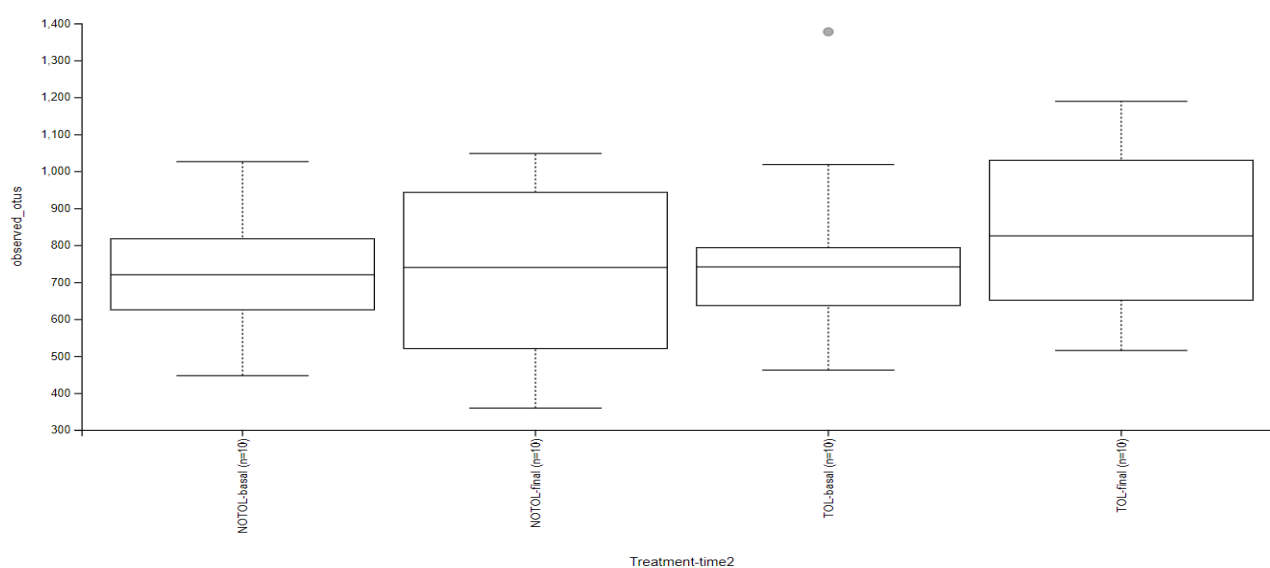


Figura 59. Gráfico de cajas y bigotes de diversidad alfa para Observed ASV divididos según grupo de estudio: TOL y NOTOL en situación basal y final.

En el análisis de las diferencias en ASV observadas de los cuatro grupos mediante el test Kruskal-Wallis no mostró diferencias estadísticamente significativas ($p=0,66$)

Grupos		H	P valor	q valor
NOTOL-basal (n=10)	NOTOL-final (n=10)	0.005714	0.930	0.930
	TOL-basal (n=10)	0.051429	0.821	0.930
	TOL-final (n=10)	0.965714	0.326	0.930
NOTOL-final (n=10)	TOL-basal (n=10)	0.051429	0.821	0.930
	TOL-final (n=10)	1.651429	0.199	0.930
TOL-basal (n=10)	TOL-final (n=10)	0.462857	0.497	0.930

Tabla 25. Test de Kruskal-Wallis por pares para ASV observadas de los grupos TOL y NOTOL en situación basal y final.

6.5.2 Eveness(Indice Pileau)

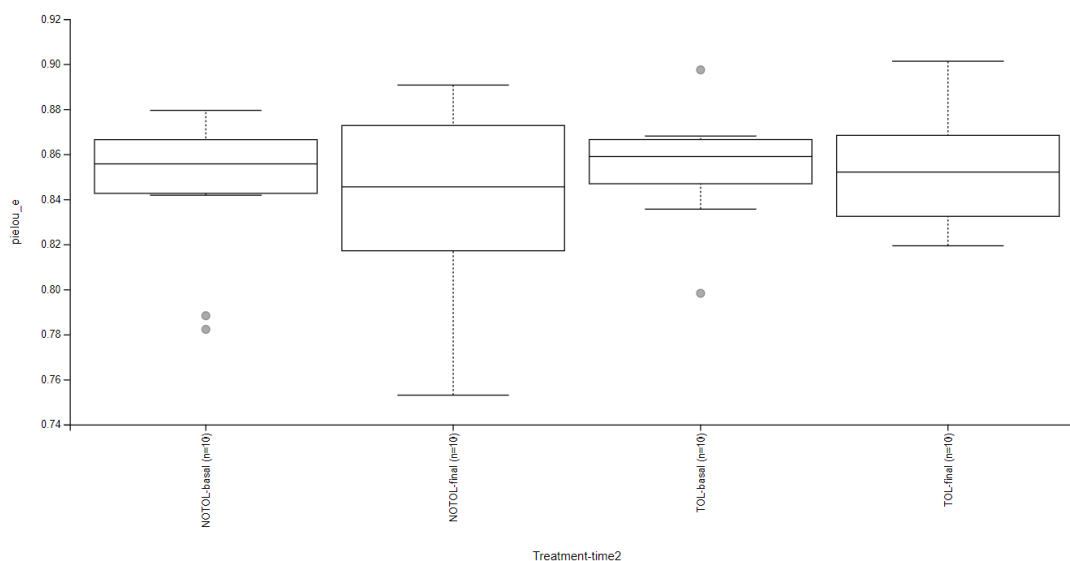


Figura 60. Gráfico de cajas y bigotes de diversidad para Eveness divididos según grupo de estudio: TOL y NOTOL en situación basal y final.

En el análisis de las diferencias para Eveness(homogeneidad de las muestras) entre los cuatro grupos mediante el test Kruskal-Wallis no arrojan diferencias estadísticamente significativas ($p=0,815$)

Grupos de estudio		H	Pvalor	q-valor
NOTOL-basal (n=10)	NOTOL-final (n=10)	0.091429	0.762	0.870
	TOL-basal (n=10)	0.142857	0.706	0.870
	TOL-final (n=10)	0.022857	0.870	0.870
NOTOL-final (n=10)	TOL-basal (n=10)	0.822857	0.364	0.870
	TOL-final (n=10)	0.691429	0.406	0.870
TOL-basal (n=10)	TOL-final (n=10)	0.142857	0.706	0.870

Tabla 26. Test de Kruskal-Wallis por pares para eveness de los grupos tolerantes TOL y NOTOL en situación basal y final

6.5.3 Índice Shannon.

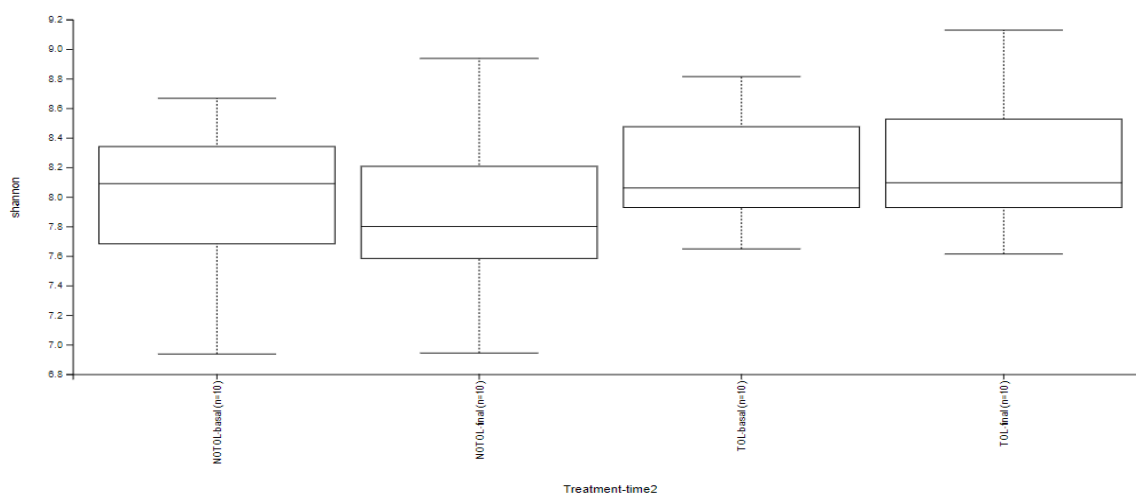


Figura 61. Gráfico de cajas y bigotes de diversidad para índice Shannon divididos según grupo de estudio: TOL y NOTOL en situación basal y final.

En el análisis de las diferencias en el índice de Shannon de los cuatro grupos mediante el test Kruskal-Wallis no se mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,625$)

Grupos		H	P-valor	q-valor
NOTOL-basal (n=10)	NOTOL-final (n=10)	0.142857	0.706	0.821
	TOL-basal (n=10)	0.280000	0.597	0.821
	TOL-final (n=10)	0.365714	0.545	0.821
NOTOL-final (n=10)	TOL-basal (n=10)	0.965714	0.326	0.821
	TOL-final (n=10)	1.651429	0.199	0.821
TOL-basal (n=10)	TOL-final (n=10)	0.051429	0.820	0.821

Tabla 27. Test de Kruskal-Wallis por pares para índice Shannon de los grupos TOL y NOTOL en situación basal y final.

6.5.4. Diversidad Faith

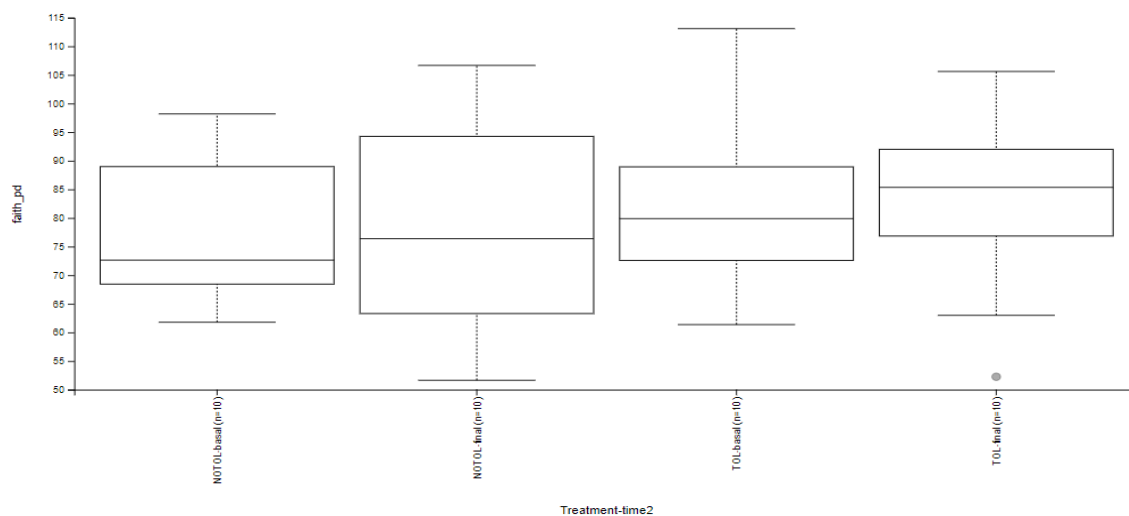


Figura 62. Gráfico de cajas y bigotes de diversidad Faith divididos según grupo de estudio: TOL y NOTOL en situación basal y final.

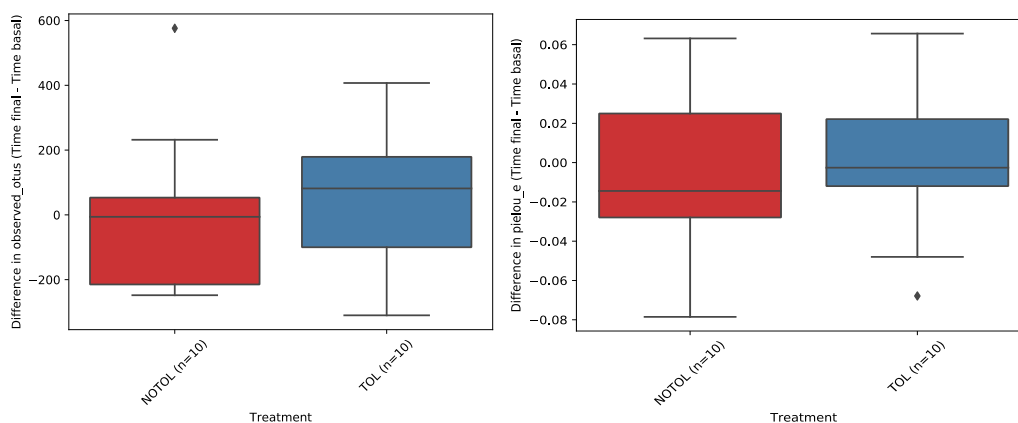
En el análisis de las diferencias del índice Faith de los cuatro grupos mediante el test Kruskal-Wallis no se mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,85$)

		H	p-valor	q-valor
NOTOL-basal (n=10)	NOTOL-final (n=10)	0.000000	1.000000	1.000000
	TOL-basal (n=10)	0.365714	0.545	0.780
	TOL-final (n=10)	0.691429	0.406	0.780
NOTOL-final (n=10)	TOL-basal (n=10)	0.205714	0.650	0.780
	TOL-final (n=10)	0.280000	0.597	0.780
TOL-basal (n=10)	TOL-final (n=10)	0.205714	0.650	0.780

Tabla 28. Test de Kruskal-Wallis por pares para índice de Faith TOL y NOTOL en situación basal y final

1) ASVs observed ($p=0,427$)

2) Eveness($p=7,34$)



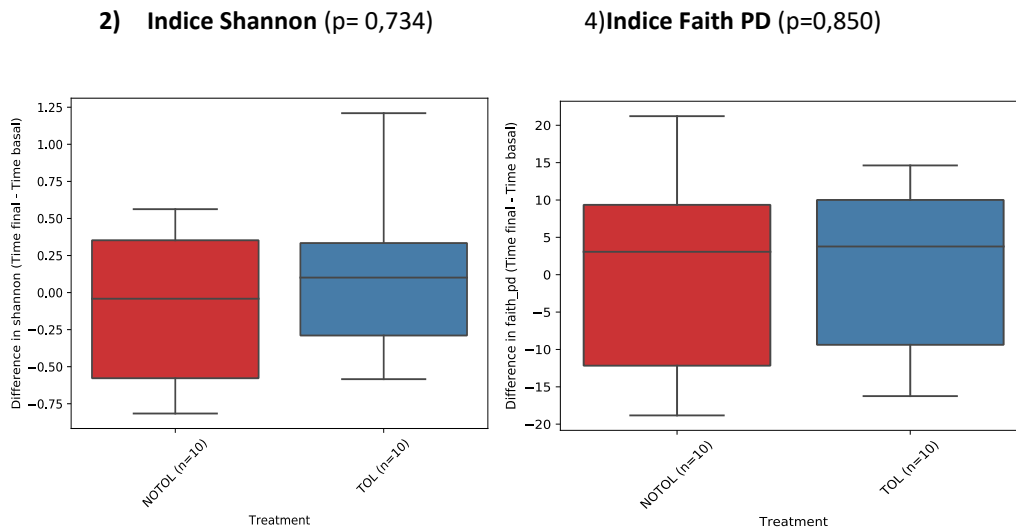


Figura 63. Gráficos con el análisis de la diversidad alfa mediada por ASV observed, Eveness, índice Shannon e índice diversidad Faith de los grupos TOL y NOTOL durante el diferencial de cambio de diversidad alfa de las muestras fecales basales y finales

En el análisis por pares de U Mann Whitney no mostró diferencias significativas en el diferencial de cambio de alfa diversidad entre los grupos tras la introducción de metformina

6.6 Biodiversidad beta en el análisis de las muestras fecales de todos intolerantes a metformina confirmada (INT), diabéticos en tratamiento con metformina(DM2) y controles sin diabetes(CT)

6.6.1. Observed ASV

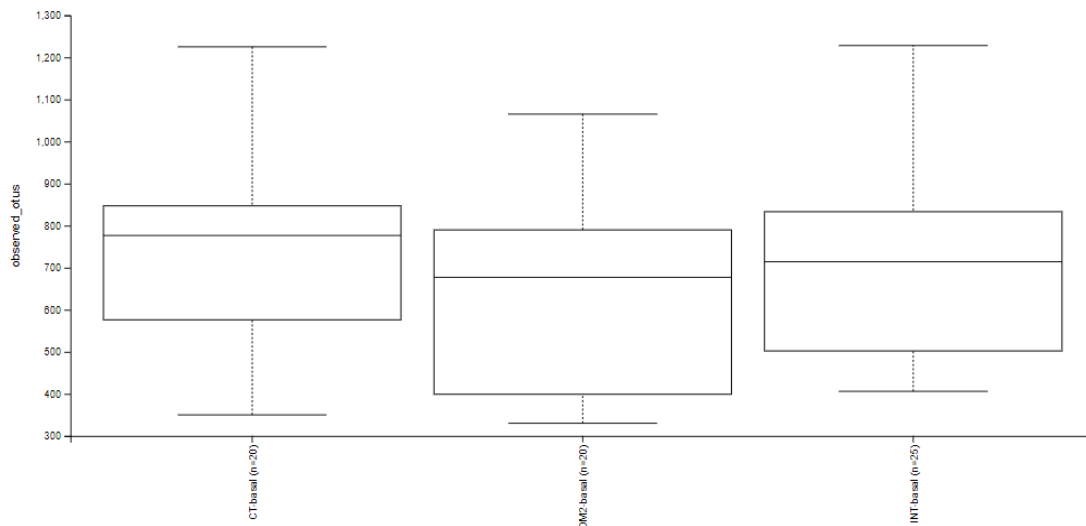


Figura 67. Gráfico de cajas y bigotes para Observed ASV de intolerantes a metformina (INT), diabéticos con metformina (DM2) y controles sin diabetes (CT)

En el análisis de las diferencias de Observed ASV mediante el test de Kruskal Wallis no mostró diferencias significativas entre grupos ($p=0,312$)

Grupos		H	pvalor	q valor
CT-basal (n=20)	DM2-basal (n=20)	1.941035	0.164	0.359
	INT-basal (n=25)	0.230102	0.631	0.631
DM2 (n=20)	INT (n=25)	1.384056	0.239	0.359

Tabla 29. Test de Kruskall -Wallis por pares para ASV_observed en los tres grupos de estudio: INT, DM2 y CT.

6.6.2. Eveness(Indice Pileau)

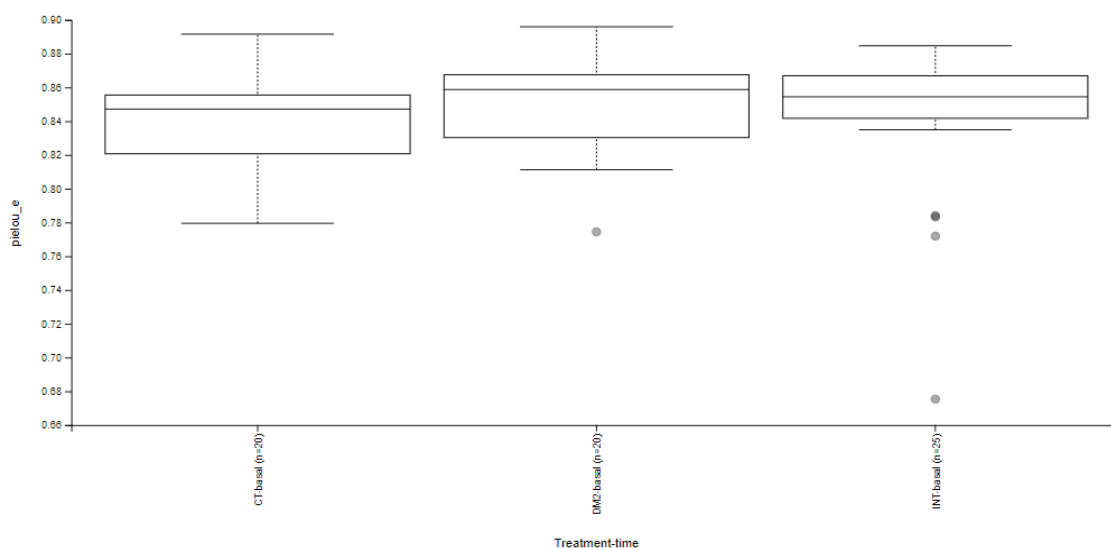


Figura 68. Gráfico de cajas y bigotes para Eveness de intolerantes a metformina (INT), diabéticos con metformina (DM2) y controles sin diabetes (CT)

En el análisis de las diferencias de Eveness mediante el test de Kruskall Wallis no mostró diferencias significativas entre grupos ($p=0,334$)

Grupos		H	pvalor	q valor
CT-basal (n=20)	DM2-basal (n=20)	1.903171	0.168	0.409
	INT-basal (n=25)	1.202087	0.273	0.409
DM2-basal (n=20)	INT-basal (n=25)	0.252522	0.615	0.6153

Tabla 30. Test de Kruskall -Wallis por pares para eveness en los grupos de estudio: INT(n:25), DM2 (n:20) y CT (n: 20)

6.6.3. Índice Shannon(biodiversidad)

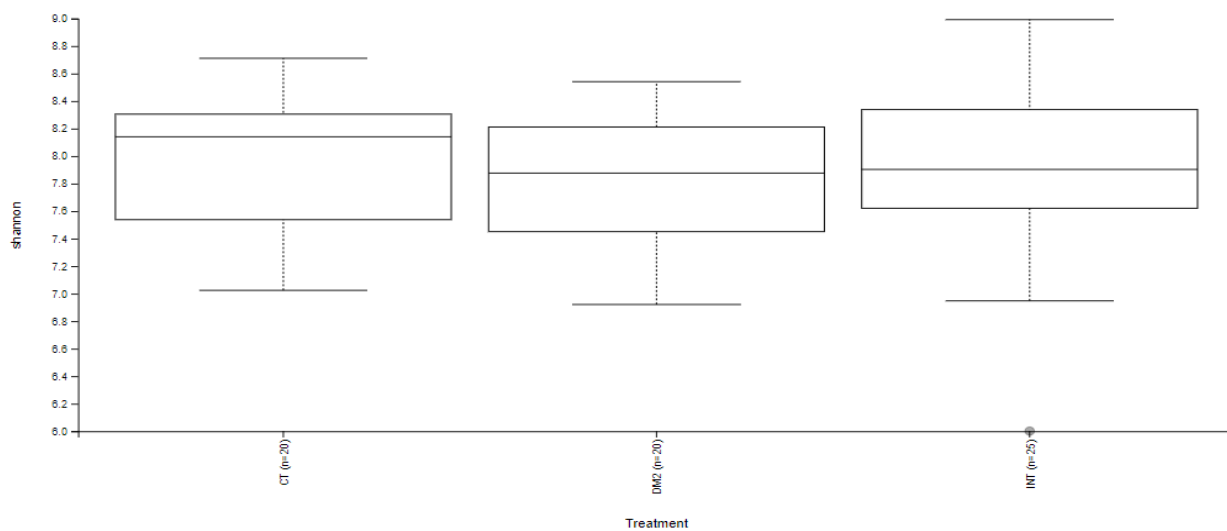


Figura 69. Gráfico de cajas y bigotes para Índice Shannon de los tres grupos de estudio: INT (n:25), DM2 (n: 20) y CT (n: 20)

En el análisis de las diferencias del índice de Shannon mediante el test de Kruskal Wallis no mostró diferencias significativas entre grupos ($p=0,312$)

Grupos		H	p-valor	q-valor
CT (n=20)	DM2 (n=20)	0.658537	0.417	0.625
	INT (n=25)	0.013043	0.909	0.909
DM2 (n=20)	INT (n=25)	0.793565	0.373	0.626

Tabla 31. Test de Kruskal -Wallis por pares para Índice Shannon en los grupos de estudio:INT, DM2 y CT

6.6.4. Diversidad de Faith

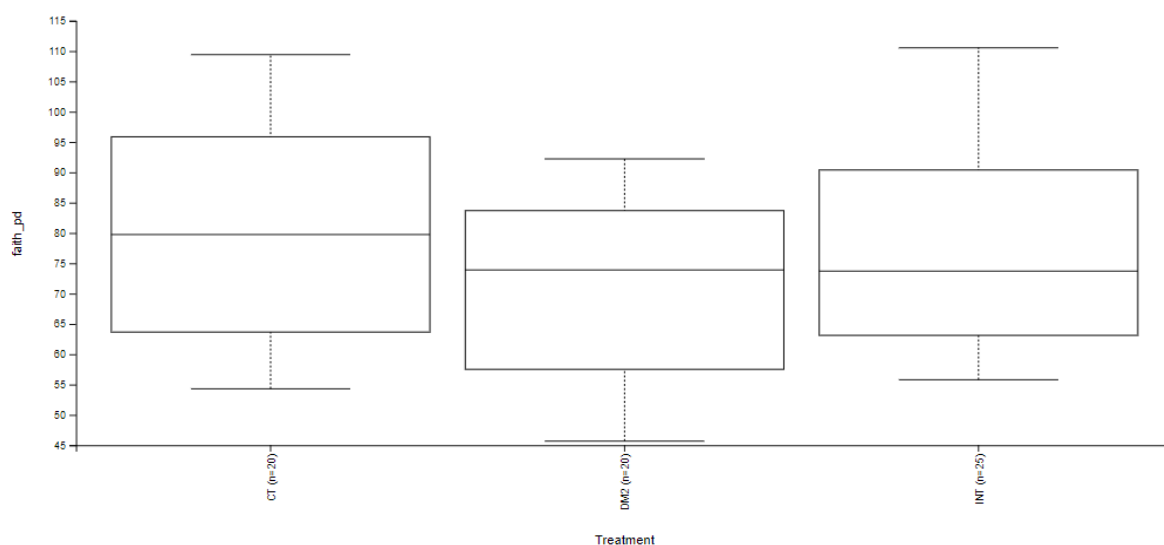


Figura 70. Gráfico de cajas y bigotes para Diversidad de Faith de los tres grupos de estudio: INT, DM2 y CT

En el análisis de las diferencias del índice diversidad filogenéticamente corregida mediante el test de Kruskal Wallis no mostró diferencias significativas entre grupos ($p=0,269$)

Grupos		H	p-value	q-value
CT (n=20)	DM2 (n=20)	2.133659	0.144	0,380
	INT (n=25)	0.603130	0.437	0,432
DM2 (n=20)	INT (n=25)	1.304348	0.253	0,380

Tabla 32. Test de Kruskal -Wallis por pares para diversidad Faith en los grupos de estudio: INT, DM2 y CT.

7. Análisis funcional

7.1 Rutas metabólicas de MetaCyc en el análisis basal de las muestras fecales entre los grupos intolerantes precoces a metformina, intolerantes a metformina en dosis progresivas y tolerantes a metformina.

Descripción de todas las rutas metabólicas de MetaCyc con diferencias estadísticamente significativas. Se muestran tanto las rutas resultantes del análisis basal de las muestras fecales entre los grupos INT, NOTOL y TOL, como las rutas metabólicas con diferencias estadísticamente significativas en el análisis longitudinal y final de las muestras fecales de los grupos TOL y NOTOL.

CHLOROPHYLL-SYN- 3,8 divinil clorofila biosíntesis I (organismos con metabolismo aerobio, luz independiente). En la mayoría de los organismos poseen una enzima independiente de la luz que cataliza la formación de clorofilida a a partir de protoclorofilida a.

HOMOSER METSYN PWY -Biosíntesis de L-metionina I

HSERMETANA-PWY-Biosíntesis de L-metionina III

P221-PWY-Vía de oxidación de octano

PANTO-PWY-Biosíntesis de ácido pantoténico

PWY-1422-Biosíntesis de vitamina E

PWY-181-Vía de Fotorespiración

PWY-4984-Ciclo de la urea

PWY-5198 Biosíntesis del factor 420 (El factor 420 es conocido como coenzima F420 es un compuesto redox-activo conocido por su papel en la metanogénesis)

PWY 5531 Vía 3,8 divinil-clorofilida una biosíntesis II (organismos con metabolismo anaerobio). Esta vía describe la formación de clorofilida a, un metabolito intermedio importante en la biosíntesis de todas las clorofilas y bacterioclorofilas

PWY 7159 Vía 3,8 divinil-clorofilida una biosíntesis III (aeróbica, luz independiente). La única diferencia entre esa vía y la descrita anteriormente es el último paso, la reducción de protoclorofilida a para formar clorofilida a que es catalizada por una enzima luz independiente.

HSERMETANA-PWY-Biosíntesis de L-metionina III

PWY-5198-Biosíntesis del factor 420 (El factor 420 es conocido como coenzima F420 es un compuesto redox-activo conocido por su papel en la metanogénesis)

PWY 5531-Vía 3,8 divinil-clorofilida una biosíntesis II (organismos con metabolismo anaerobio). Esta vía describe la formación de clorofilida a, un metabolito intermedio importante en la biosíntesis de todas las clorofilas y bacterioclorofilas

PWY 7159-Vía 3,8 divinil-clorofilida una biosíntesis III (aeróbica, luz independiente). La única diferencia entre esa vía y la descrita anteriormente es el último paso, la reducción de protoclorofilida a para formar clorofilida a que es catalizada por una enzima luz independiente.

P221-PWY- Vía de oxidación de octano

FUC- RHAMCAT- PWY- Vía de la degradación de fructosa y ramnosa.

FUC-RHAMCAT- Vía de degradación del metabolismo de glicol

HISDEG-PWY- Vía de degradación de L histidina I

MET-SAM-PWY-Vía de la biosíntesis de adenosil-L metionina

P4-PWY- Vía de biosíntesis de L-lisina, L-treonina y L metionina

PENTOSA-P-PWY-Vía de pentosa fosfato

PWY 2941-Vía de biosíntesis L-lisina II

PWY 5154-Vía de biosíntesis de L-arginina (vía acetyl-L-citrulina) III

PWY 6901- Vía de degradación de glucosa y xylosa

PWY 7003 -Vía de degradación de glicerol a butanol

PWYO-845-Vía de biosíntesis de piridoxal 5 fosfato (síntesis de vitamina B6)

RHAMCAT-PWY- Vía de degradación de L-ramnosa I

RUMP-PWY-Vía de oxidación de formaldehido

TEICHOICACID-PWY- Biosíntesis de ácido teicoico.

ARGORNPROST-PWY - Vía de degradación L-arginina

COA-PWY-Vía biosíntesis de coenzima A (procariota)

PENTOSE-P-PWY –Vía pentosa fosfato. La vía de la pentosa fosfato es una forma alternativa de oxidar la glucosa, y en esta vía la oxidación está acoplada a la síntesis de NADPH.

POLYISONPRENSYN-PWY- Vía biosíntesis polisopreonides (pueden interferir como precursores de formación de LPS)

PWY 6123- Biosíntesis de iosina 5-fosfato I o IMP (la biosíntesis de novo de las purinas comienza con la síntesis de IMP, que se puede convertir a todas las demás purinas)

PWY 6507- Degradación de 4-desoxi-L- treo -hex-4-enopiranuronato (5-de hidro-4-deoxy-D glucoronato). Muchos organismos producen polímeros complejos grandes que contienen ácidos urónicos. Algunos ejemplos incluyen pectina, que contiene D-galacturonato, y glicosaminoglicanos producidos por animales, que incluyen heparina, heparán sulfato, hialuronano, condroitín sulfato, etc. Las vías de degradación bacteriana para estos polímeros generalmente implican un ataque inicial sobre el polímero que lo descompone en oligosacáridos cortos.

PWY 6545 - Vía de biosíntesis de pirimidina desoxirribonucleótidos III

PWY-7242- Vía de degradación de D-fructuronato

PWYO-1261- Vía de reciclaje de anhidromuropéptidos I (Las bacterias gramnegativas reciclan una proporción muy grande del polímero de peptidoglucano durante el crecimiento normal en un proceso denominado reciclaje de la pared celular)

PWY4903 –Reducción de nitratos VI(degradación de nutrientes inorgánicos)

RIBOSYN2-PWY- Biosíntesis de flavinas (riboflavina se conoce como vitamina B2, porque es un nutriente esencial y los mamíferos no pueden sintetizarla)

ARGORNPROST-PWY : Vía de degradación L-arginina

COA-PWY: Vía biosíntesis de coenzima A (procariota)

PENTOSE-P-PWY – Vía pentosa fosfato. La vía de la pentosa fosfato es una forma alternativa de oxidar la glucosa, y en esta vía la oxidación está acoplada a la síntesis de NADPH.

POLYISONPRENSYN-PWY- Vía biosíntesis polisopreonides (pueden interferir como precursores de formación de LPS)

PWY 6123- Biosíntesis de iosina 5-fosfato I o IMP (la biosíntesis de novo de las purinas comienza con la síntesis de IMP, que se puede convertir a todas las demás purinas)

PWY 6507- Degradación de 4-desoxi-L- treo -hex-4-enopiranuronato (5-de hidro-4-deoxy-D glucuronato). Muchos organismos producen polímeros complejos grandes que contienen ácidos urónicos. Algunos ejemplos incluyen pectina, que contiene D-galacturonato, y glicosaminoglicanos producidos por animales, que incluyen heparina, heparán sulfato, hialuronano, condroitín sulfato, etc. Las vías de degradación bacteriana para estos polímeros generalmente implican un ataque inicial sobre el polímero que lo descompone en oligosacáridos cortos.

PWY 6545 - Vía de biosíntesis de pirimidina desoxirribonucleótidos III

PWY-7242- Vía de degradación de D-fructuronato

PWYO-1261- Vía de reciclaje de anhidromuropéptidos I (Las bacterias gramnegativas reciclan una proporción muy grande del polímero de peptidoglucano durante el crecimiento normal en un proceso denominado reciclaje de la pared celular)

PWY4903 –Reducción de nitratos VI(degradación de nutrientes inorgánicos)

RIBOSYN2-PWY- Biosíntesis de flavinas (riboflavina se conoce como vitamina B2, porque es un nutriente esencial y los mamíferos no pueden sintetizarla)

HISDEG-PWY- Vía de degradación de L-histidina.

P4-PWY-Vía de biosíntesis de L-treonina, L-metionina,L-lisina

PWY-6471-Biosíntesis de peptidoglicanos IV

PWY0-845-Biosíntesis de vitamina B6 (coenzima presente en procesos de biosíntesis de aminoácidos y peptidoglicanos)

PWY-6654 – Vía de biosíntesis de fosfopantotenato III (Precursor de la coenzima A y sus derivados de acilo que son requeridos para reacciones que generan energía a partir de la degradación de grasas, carbohidratos y proteínas. Además, la coenzima A en la forma de acetil-CoA y succinil-CoA está involucrada en el ciclo del ácido cítrico, en la síntesis de grasas esenciales, colesterol, hormonas esteroideas, vitamina A y D, acetilcolina, y en la ruta de β -oxidación de ácidos grasos.

Vías metabólicas extraídas de MetaCyc.	Mayor en	Menor en
CHLOROPHYLL-SYN	INT	
GLYCOL-GLYOXDEG-PWY	INT	
HISDEG-PWY	TOL	
HOMOSER-METSYN-PWY		INT
HSERMETANA-PWY	TOL	INT
MET-SAM-PWY	TOL	INT
P221-PWY	NOTOL	
PENTOSE-P-PWY		TOL
PWY-2941	TOL	
PWY-5154	INT	
PWY-5198		NOTOL
PWY-6507		TOL
PWY-6901		TOL
PWY-7003		TOL
PWY-7022	NOTOL	

PWY-7242		TOL
PWY0-845		TOL
RHAMCAT-PWY	INT	TOL

Tabla 33. El grado de actividad de las vías metabólicas predichas según la base de datos MetaCyc entre las muestras fecales de los tres grupos de pacientes clasificados según su tolerancia a metformina (TOL, INT y NOTOL) en situación basal. Se muestran las vías metabólicas que alcanzaron un grado de significancia estadística $p < 0,05$

En la comparativa de los tres grupos observamos que los dos grupos que se alejan más en el análisis funcional son el grupo TOL respecto a los INT. Las muestras fecales de TOL expresan una predominancia de vías de biosíntesis de aminoácidos (lisina o metionina) con una disminución de la actividad de vías de degradación. Sin embargo, las muestras fecales de INT tienen una predominancia de vías metabólicas para la degradación u obtención de energía (catabolismo de azúcares).

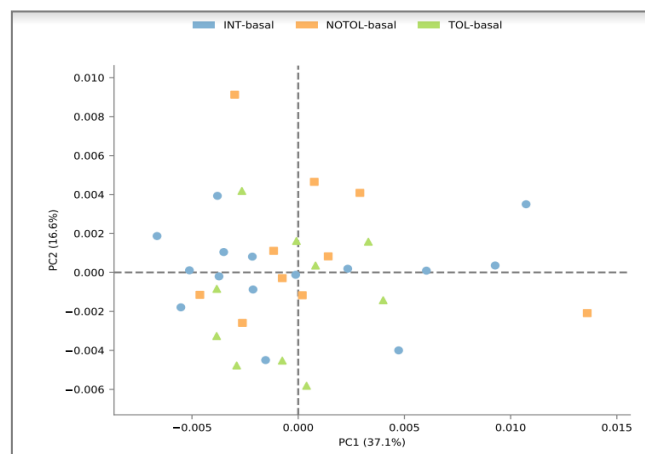


Figura 71. Gráfico de componentes principales (PC) de las rutas metabólicas predichas de base de datos MetaCyc entre los grupos intolerantes precoces a metformina (INT), intolerantes a metformina en dosis progresivas (NOTOL) y tolerantes a metformina (TOL). Se muestran las vías metabólicas que alcanzaron un grado de significancia estadística $p < 0,05$

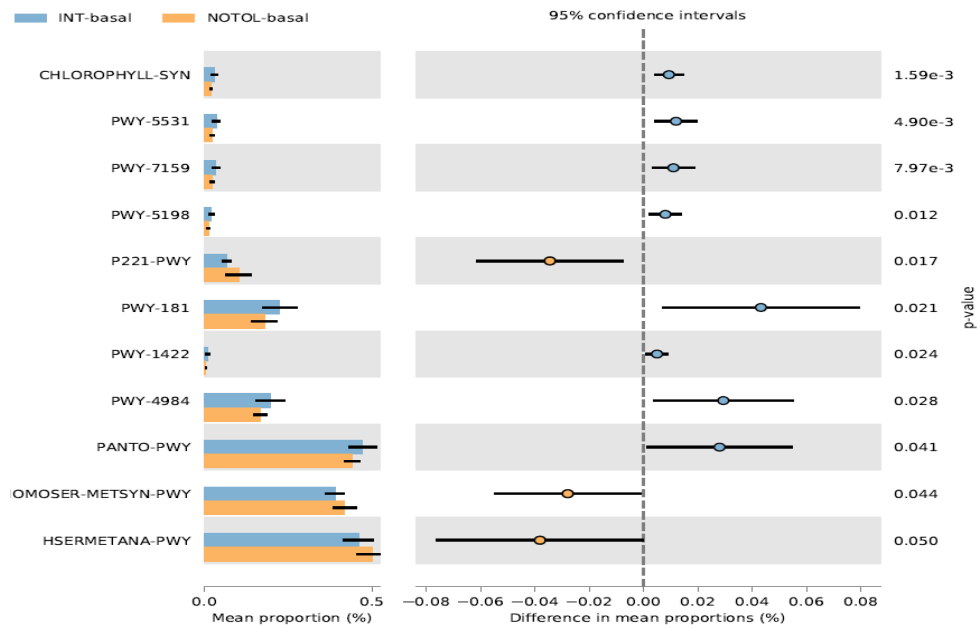


Figura 71. Rutas metabólicas de la base de datos MetaCyc con las contribuciones predichas de los datos metagenómicos de los dos subgrupos de intolerantes a metformina en situación basal (INT y NOTOL). Observamos 11 rutas diferentes entre ambos grupos ($p < 0,05$).

Las rutas que se encuentran incrementadas en de INT son las relacionadas con la síntesis de vitamina E, biosíntesis de clorofila, la síntesis de (R) -4'-fosfopantotenato (precursor de la coenzima A), aumento de producción de metano y degradación de aminoácidos (ciclo de la urea). En el grupo de los pacientes que NOTOL destacan tres vías relacionadas con la biosíntesis de aminoácidos (biosíntesis de metionina). Además, observamos aumento de degradación de octano en microbiota de NOTOL (obtención de energía).

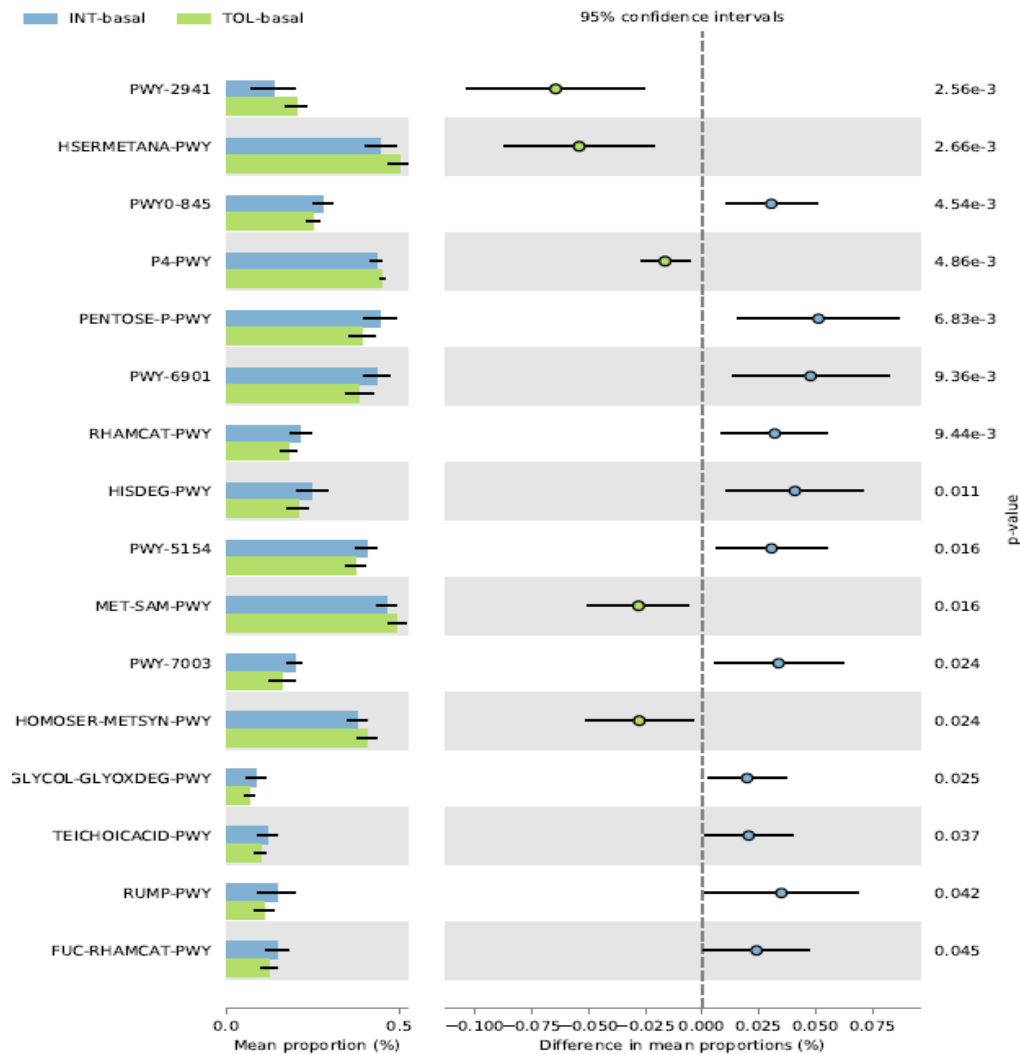


Figura 72. Rutas metabólicas de la base de datos MetaCyc con las contribuciones predichas de los datos metagenómicos de los tolerantes a metformina (TOL) respecto a los intolerantes a dosis mínimas en las muestras fecales basales (INT) Observamos 16 rutas diferentes entre ambos grupos ($p < 0,05$).

En el grupo de TOL a nivel basal se observan 5 rutas diferentes incrementadas, pero todas ellas relacionadas con la biosíntesis de aminoácidos: síntesis de metionina, histidina, lisina y treonina. Sin embargo, en los INT está incrementado las vías de degradación, de obtención de energía, a través del metabolismo hidrocarbonado (oxidación de glucosa, ramnosa, degradación de alcoholes, fructosa...). Además, hay un incremento de actividad en la vía que sintetiza ácidos teicoicos implicados en la formación de membranas celulares y de la síntesis de precursores de vitamina B6

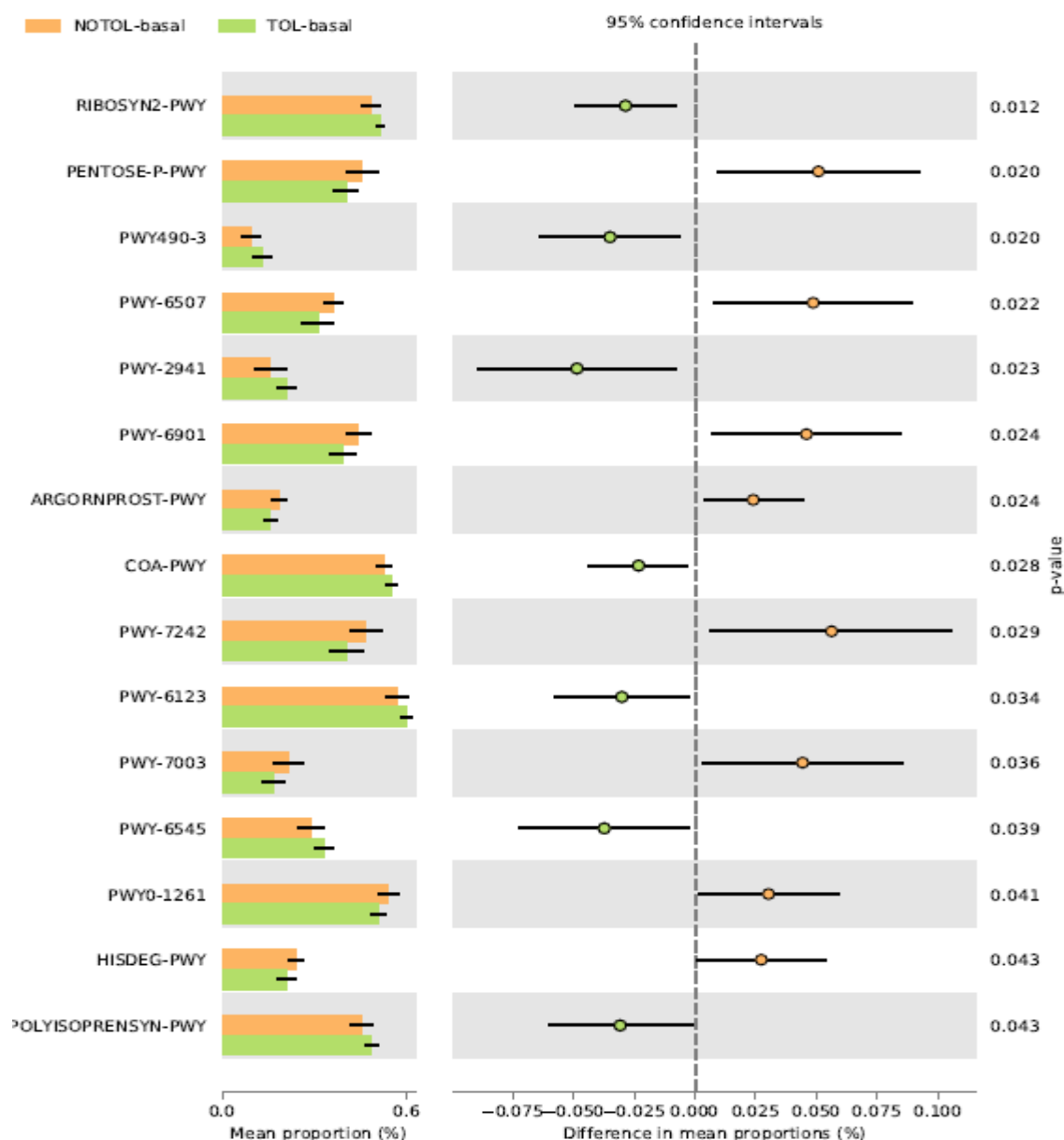


Figura 73. Rutas metabólicas de la base de datos MetaCyc con las contribuciones predichas de los datos metagenómicos de los tolerantes a metformina (TOL) respecto a los intolerantes durante la progresión de dosis (NOTOL) en situación basal. Observamos 15 rutas diferentes entre ambos grupos ($p < 0,05$).

En el grupo de TOL se observa un incremento de las vías de producción de nucleótidos, síntesis de flavinas (vitamina B2), precursores de coenzima A e incremento de la vía de degradación de nitratos y aumento de la actividad de la vía de poliisoprenoides. En los NOTOL observamos de forma generalizada incremento

de vías de degradación: aminoácidos (degradación de arginina), de obtención de energía como el incremento de actividad de las vías de pentosa fosfato, degradación de fructosa o xylosa y, por último, vías de degradación de peptidoglicanos de membrana celulares.

7.2 Rutas metabólicas por MetaCyc con diferencias significativas del análisis longitudinal y final de los grupos tolerantes a metformina e intolerantes durante la progresión de dosis.

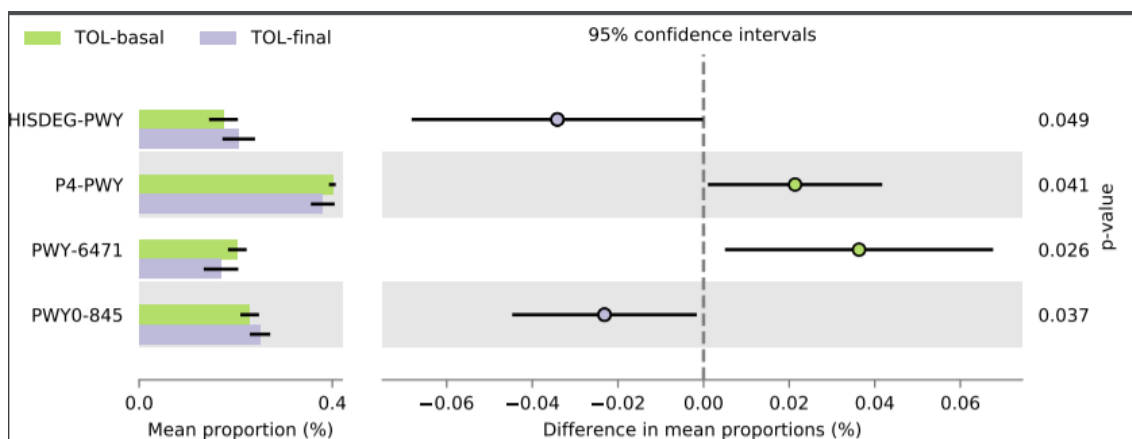


Figura 74. Rutas metabólicas de la base de datos MetaCyc con las contribuciones predichas de los datos metagenómicos de los tolerantes a metformina (TOL) en situación basal (sin tratamiento) y en el punto final. Observamos 4 rutas diferentes en el análisis longitudinal ($p < 0,05$)

En microbiota intestinal del punto final de los pacientes del grupo TOL se observa un incremento de la actividad de la vía de degradación de histidina y mayor actividad de la vía metabólica de biosíntesis de vitamina B6. Sin embargo, en las muestras de TOL-basal hay incremento de la actividad de las vías de biosíntesis de aminoácidos (L-treonina, L-metionina y L-lisina) y peptidoglicanos en comparación con microbiota intestinal de TOL final. En el estudio longitudinal de las vías metabólicas predichas con las muestras fecales de pacientes NOTOL no se mostraron diferencias estadísticamente significativas, debido a que el tiempo de exposición a metformina desde la recogida de las muestras fecales basales fue inferior.

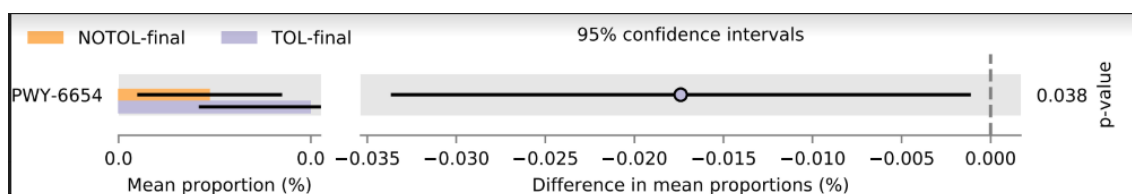


Figura 75. Rutas metabólicas de la base de datos MetaCyc con las contribuciones predichas de los datos metagenómicos en las muestras fecales finales entre los pacientes que no toleraron metformina en la progresión de dosis y los que sí presentaron tolerancia a la misma (NOTOL y TOL).

La vía relacionada con producción de la vitamina B5 o ácido pantoténico es superior entre los TOL respecto a los NOTOL tras la administración de metformina.

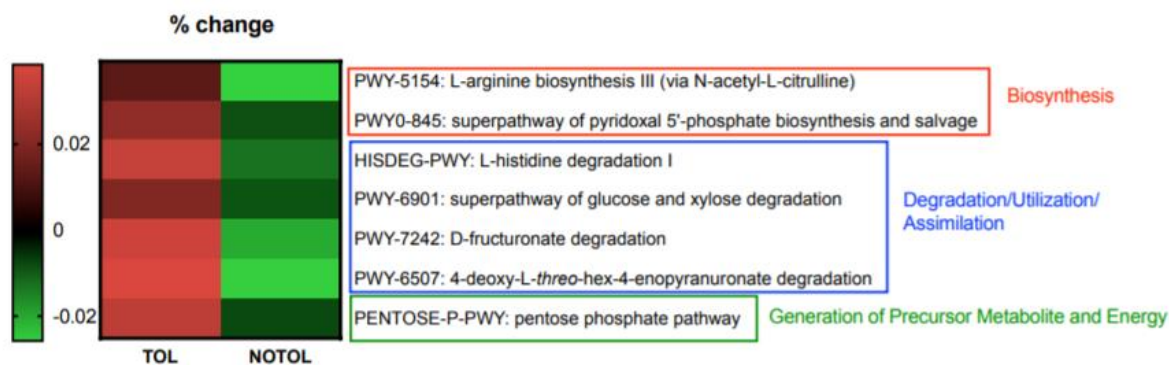


Figura 76. Mapa de calor de las vías de Metacyc diferencialmente abundantes identificadas en los grupos de estudio. Los valores de color en el mapa de calor representan el cambio en la abundancia relativa normalizada de las vías de Metacyc. Las superclases compartidas por vías relacionadas están localizadas dentro del mismo color.

La mayoría de estas vías mostraron una tendencia inversa en sus cambios en los grupos TOL y NOTOL, especialmente en aquellos que al menos mostraron una tendencia ($p < 0.10$) entre grupos. Un punto interesante es que los pacientes con TOL aumentaron las vías de degradación de la glucosa (PWY-6507, PWY-7242, PWY-6901), así como las vías relacionadas con los aminoácidos (HISDEG-PWY, PWY-5154).

7.3 Rutas metabólicas por MetaCyc con diferencias significativas entre todos los intolerantes a metformina (INT) y los ambos grupos controles: diabéticos con tratamiento con metformina (DM2) y controles sin diabetes (CT).

Se muestran las rutas metabólicas que alcanzaron la significancia estadística en el análisis transversal de los tres grupos ($p < 0,005$)

CHLOROPHYLL-SYN- 3,8 divinil clorofila biosíntesis I (organismos con metabolismo aerobio, luz independiente). En la mayoría de los organismos poseen una enzima independiente de la luz que cataliza la formación de clorofilida a a partir de protoclorofilida a.

P101-PWY-Biosíntesis ectoína (un compuesto natural que se encuentra en varias especies de bacterias. Se trata de un soluto compatible, que sirve como una sustancia protectora, actuando como un osmolito y por lo tanto ayuda a los organismos a sobrevivir a un estrés osmótico extremo)

PWY-3781-Respiración aeróbica I (citocromo c es una pequeña hemoproteína asociada en la membrana interna de la mitocondria e interviene en el transporte de electrones entre el complejo III y IV)

PWY- metil-5-tio-alfa, degradación D-ribosa 1 fosfato I

PWY 5531-Vía 3,8 divinil-clorofilida una biosíntesis II (organismos con metabolismo anaerobio). Esta vía describe la formación de clorofilida a, un metabolito intermedio importante en la biosíntesis de todas las clorofilas y bacterioclorofilas

PWY 7159 -Vía 3,8 divinil-clorofilida una biosíntesis III (aeróbica, luz independiente). La única diferencia entre esa vía y la descrita anteriormente (PWY5531) es el último paso, la reducción de protoclorofilida a para formar clorofilida a que es catalizada por una enzima luz independiente.

PWY-5656 –Vía de degradación de 2-amino-3 carboximuconato semialdehído a 2 hidroxipentadionato

PWY 5910- Vía de síntesis de mevalonato

PWY-7347- Vía de biosíntesis de sucrosa III

PWY-922- Vía de biosíntesis de mevalonato

SUCSYN-PWY- Vía de biosíntesis de sucrosa

ALL CHORISMATE PWY Metabolismo corismato (precursor de síntesis de aminoácidos)

ARG+POLYAMINE SYN Biosíntesis de arginina y poliaminas

CENTFERM PWY Fermentación de piruvato a butanoato

COA PWY Biosíntesis de coenzima A

COBALSYN-PWY. Supervía de síntesis de adenosilcobalamina desde cobinamida I

DTDPRHAMSYN PWY Biosíntesis dTDO-L ramnosa

ENTBACSYN PWY Biosíntesis de enterobactin

GLUCOSE1PMETAB PWY Degradación de glucosa y glucosa 1 fosfato

GLUTORN- L-ornitina biosíntesis I

HEME-BIOSYNTHESIS-II- biosíntesis hemo I (aeróbico)

HEMESYN2-PWY-Biosíntesis hemo II (oxígeno-independiente)

LACTOSECAT-PWY- Degradación de lactosa y galactosa I

NAD-BIOSYNTHESIS-II- Vía salvaje NAD III (a nicotinamide ribose)

NONMEVIPP-PWY- Vía metileritritol fosfato I

P101-PWY-Biosíntesis de ectoína

P108-PWY- Fermentación de piruvato a propanoato I

PANTOSYN-PWY- Vía de biosíntesis de la coenzima A I

POLYAMSYN-PWY- Vía de biosíntesis de poliaminas

PPGPPMET-PWY-Metabolismo ppGpp

PWY 2942- Biosíntesis de L-lisina III

PWY3001- Vía de biosíntesis de L-isoleucina I

PWY 5097- Biosíntesis de L-lisina VI

PWY 5121-Biosíntesis de generalilgerenalil difosfato II(via MEP)

PWY 5304-Vía de sulfuro oxidación

PWY 5677- Vía de fermentación de succinato a butanoato

PWY 5747-Ciclo de 2-metilcitrato II

PWY 5837-Biosíntesis 2-carboxi-1,4 naftoquinol

PWY 5838-Biosíntesis de menaquinol-8 I

PWY 5840-Biosíntesis de menaquinol-7

PWY 5845-Biosíntesis de manaquinol-9

PWY 5850-Biosíntesis de manquinol-6 I

PWY 5860 Biosíntesis de dimetilmenaquinol-6 I

PWY 5861 Biosíntesis de dimetilmenaquinol-8 I

PWY 5862 Biosíntesis de dimetilmenaquinol-9

PWY 5863 Biosíntesis de filoquinol

PWY 5896 Biosíntesis de manaquinol-10

PWY 5897 Biosíntesis de manaquinol-11

PWY 5898 Biosíntesis menaquinol-12

PWY 5899 Biosíntesis de manquinol 13

PWY 5910 Biosíntesis de geranil geranil difosfato (via mevalonato)

PWY 5918 Biosíntesis de hemo desde glutamato

PWY 6123 Biosíntesis ionosina 5 fosfato I

PWY 6163 Biosíntesis corismato desde 3-dehidroquinato

PWY 6590 Super-vía de Clostridium acetobutylicum de fermentación acidogénica.

PWY 6629 Biosíntesis de L triptofano

PWY 6892 Biosíntesis de tiazoles

PWY 7013 Degradación de 1,2 diol propano

PWY 7209 Degradación de ribonucleótidos de pirimidina

PWY 7234 Biosíntesis ionosina 5 fosfato III

PWY 7347. Biosíntesis de sucrosa III

PWY 7560 Vía metileritritol fosfato II

PWY 922 Vía mevalonato I

PWY0 1061 Biosíntesis de L alanina

PWY0- 1338. Biosíntesis de lipolisacáridos

PWY0 1415 Vía de biosíntesis de hemo desde uroporfirinógeno III

PWY0-42 Ciclo 2-metilcitrato I

PYRiNUCSAL-PWY Vía salvaje de NAD I

PYRIDNUCSYN PWY Biosíntesis de NAD I(desde aspartato)

RIBOSYN2-PWY Biosíntesis de flavinas I

SUCSYN PWY Biosíntesis de sucrosa

THISYN PWY Biosíntesis de tiamina difosfato I

THRESYN PWY Biosíntesis de L-treonina

COA-PWY-Biosíntesis de la coenzima A

DENOVOPURINE2-PWY-Biosíntesis de las purinas II

FUC-RHAMCAT PWY Vía de degradación de fructosa y ramnosa

GLCMANNANA-PWY Vía de degradación acetilglucosamina, N acetilmanosamina y acetilneuraminato

GLUCUROCAT-PWY Degradación de beta-D- glucuronide

P441 PWY Vía de degradación acetilneuraminato

PWY 5121 Biosíntesis de geranilgeranil difosfato II

PWY 5304. Oxidación de sulfuro

PWY 5384 Degradación de sucrosa IV

PWY 5419 Degradación catecol a 2 hidroxipentadienoato II

PWY 5420 Degradación catecol II

PWY 5509. Biosíntesis de adenosincobalamina desde adenosilcobinamida GDP I

PWY 5654 Degradación 2 amino 3 carboximuconato semialdehido a hidroxipentadieona

PWY 5971. Biosíntesis de pamitato

PWY 6123 Biosíntesis losina 5 fosfato I

PWY 6386 Biosíntesis de UDP N acetilmuramoil pentapeptido II

PWY 7187 Biosíntesis de deoxiribonucleótidos de pirimidina II

PWY 7208 Supervía de nucleótidos de pirimidina

PWY 7560 Vía de metileritritol fosfato III

PWY 841 Biosíntesis de nucleótidos de purina I

Vías metabólicas	Mayor	Menor
CENTFERM-PWY	CT	DM2
CHLOROPHYLL-SYN	DM2	INT
COA-PWY	CT	DM2
COBALSYN-PWY	CT	DM2
DTDPRHAMSYN-PWY	CT	DM2
GLUCOSE1PMETAB-PWY	DM2	CT
GLUTORN-PWY	CT	DM2
HEME-BIOSYNTHESIS-II	DM2	CT
HEMESYN2-PWY	DM2	CT
HISTSYN-PWY	CT	DM2
NONMEVIPP-PWY	CT	DM2
P101-PWY	DM2	INT
PANTO-PWY	CT	INT
PANTOSYN-PWY	CT	INT
PWY-5097		DM2
PWY-5121		DM2
PWY-5304	CT	DM2
PWY-5419	CT	INT
PWY-5509	CT	DM2
PWY-5654	DM2	INT
PWY-5837	DM2	CT
PWY-5863	DM2	CT
PWY-5910	DM2	CT
PWY-5918	DM2	CT
PWY-5971	DM2	CT
PWY-6163	CT	DM2
PWY-6892	CT	DM2
PWY-6993	INT	CT/DM2
PWY-7013	DM2	CT
PWY-7159	DM2	INT
PWY-7234	DM2	CT
PWY-7347	DM2	CT
PWY-7560	CT	DM2

PWY-922	DM2	CT
PWY0-1338	DM2	CT
PWY0-1415	DM2	CT
PYRIDNUCSYN-PWY	CT	DM2
RIBOSYN2-PWY	CT	DM2
SUCSYN-PWY	DM2	CT
THRESYN-PWY	CT	DM2

Tabla 34. El grado de actividad de las vías metabólicas predichas según la base de datos MetaCyc en las muestras fecales de todos los intolerantes a metformina (INT) respecto a las muestras de diabéticos en tratamiento con metformina (DM2) y controles de diabetes (CT). Se muestran las vías metabólicas que alcanzaron un grado de significancia estadística $p < 0,005$

En el estudio funcional de las muestras fecales de DM2 en comparación al grupo CT es donde se observan las mayores diferencias. Las rutas metabólicas más predominantes en la microbiota intestinal de DM2 están relacionadas con la biosíntesis de carbohidratos, ácidos grasos, nucleótidos, polisacáridos, cianocobalamina (vitamina B12), menaquinonas (vitamina K2), filoquinonas (vitamina K1) y rutas relacionadas con la síntesis de porfirinas. En cambio, en el estudio metabolómico de microbiota intestinal del grupo CT observamos un incremento de las vías metabólicas relacionadas con la biosíntesis de aminoácidos, aumento de la síntesis de vitaminas del grupo B: tiamina (vitamina B1), flavinas (vitamina B2) y cianocobalamina (vitamina B12) e incremento de la síntesis de enzimas esenciales para numerosas vías metabólicas como son la coenzima A o NAD. Por otro lado, hay una mayor actividad de la vía de degradación de alcoholes, sulfuros y carbohidratos. En el análisis funcional de la microbiota intestinal del grupo INT observamos que hay una menor actividad en las rutas relacionadas con la biosíntesis de cianocobalamina y biosíntesis de aminas o poliaminas.

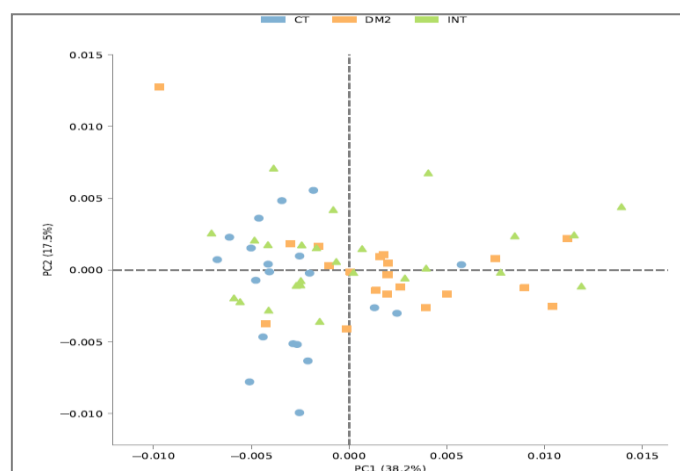


Figura 77. Gráfico de componentes principales (PC) de las rutas metabólicas predichas de base de datos MetaCyc entre todos los intolerantes a metformina (INT), diabéticos en tratamiento con metformina

(DM2) y controles sin diabetes (CT). Se muestran las vías metabólicas que alcanzaron un grado de significancia estadística $p < 0,005$

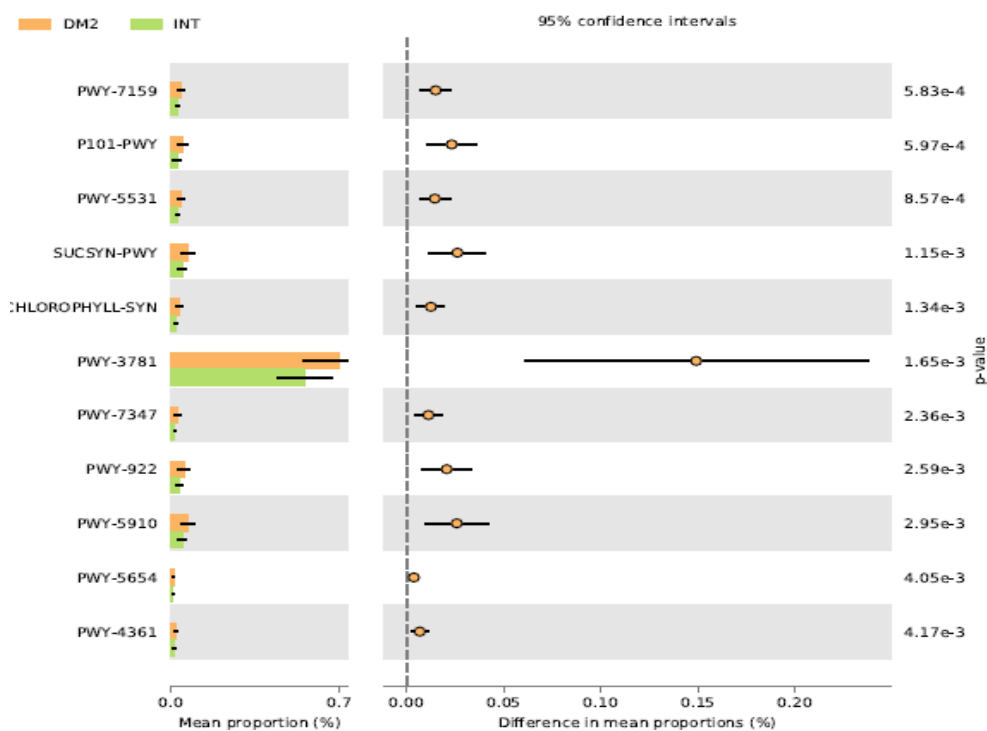
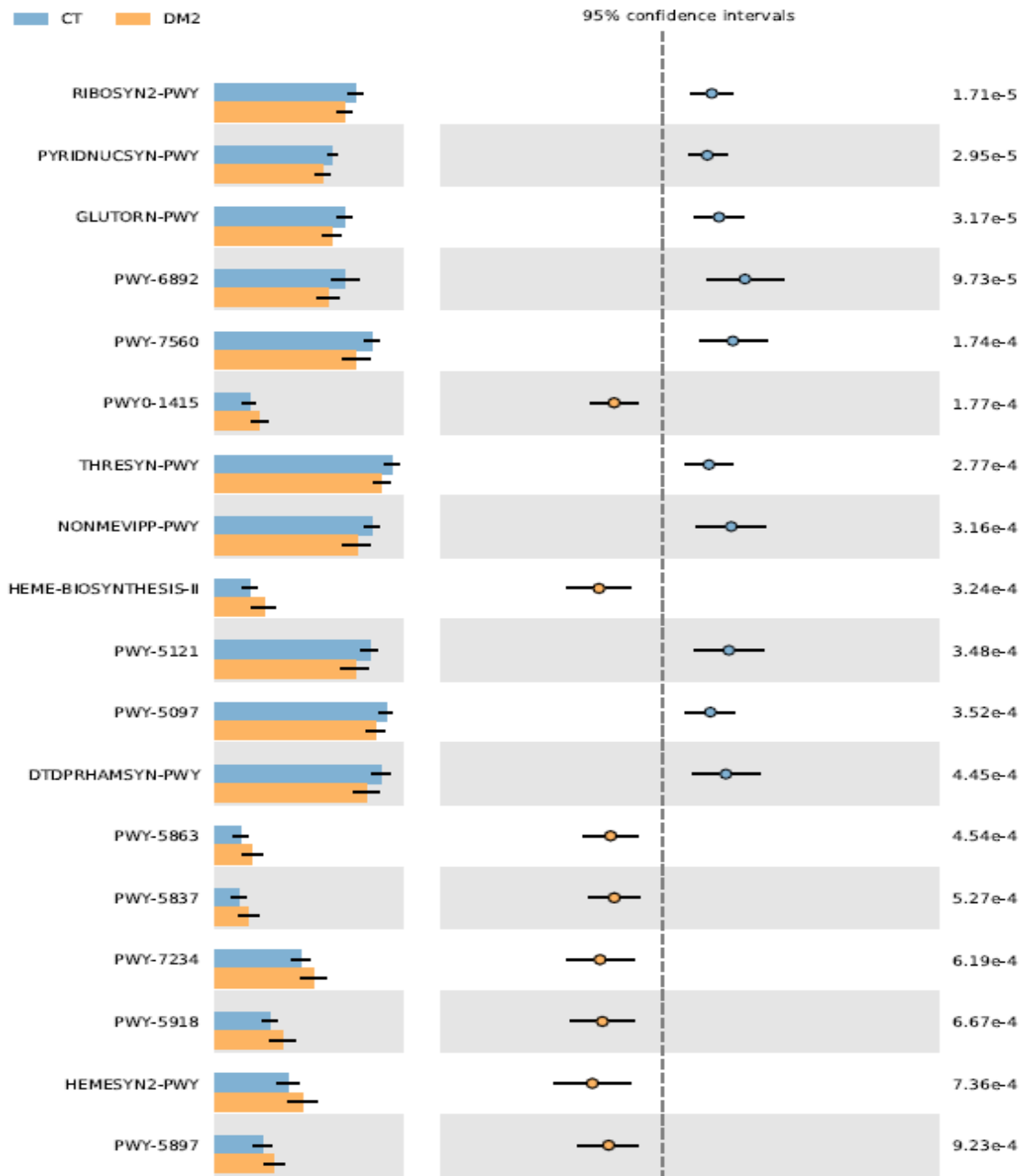
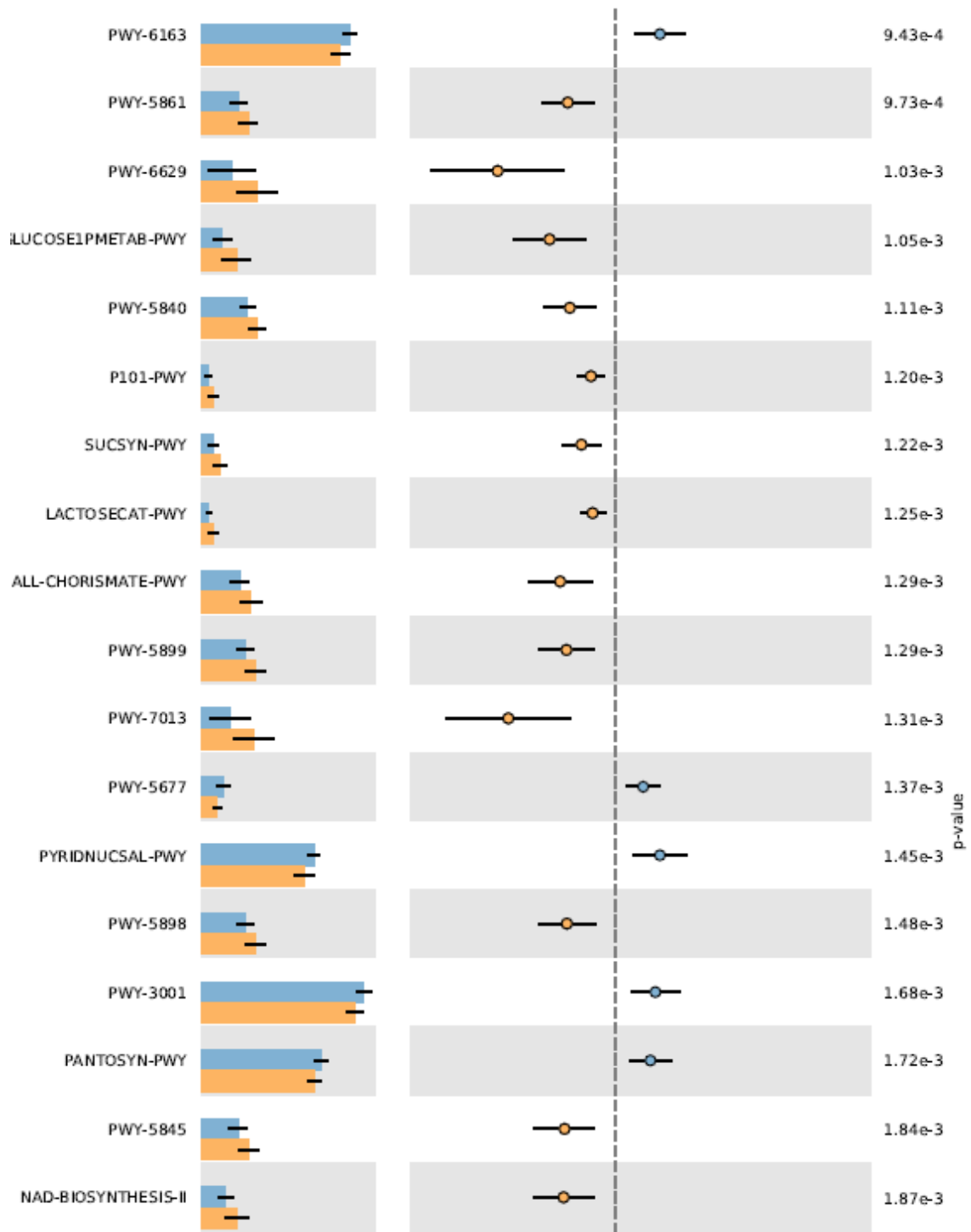
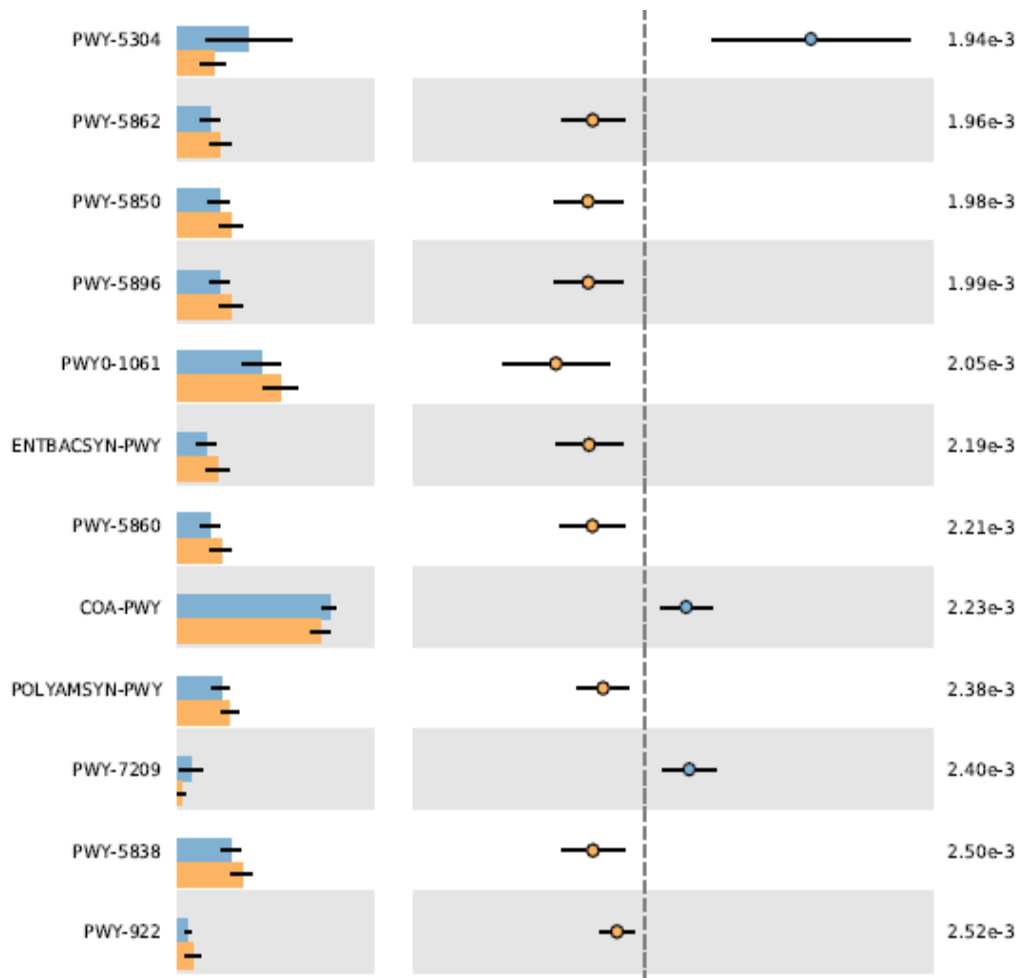


Figura 78. Las contribuciones predichas de los datos metagenómicos extraídos de MetaCyc para el análisis funcional de microbiota intestinal de todas las muestras fecales de los intolerantes a metformina (INT) respecto a diabéticos en tratamiento con metformina (DM2). Observamos 11 rutas metabólicas diferentes entre ambos grupos. Se muestran las vías metabólicas que alcanzaron un grado de significancia estadística $p < 0,005$

En el resultado del análisis funcional observamos como todas las rutas que marcan las diferencias entre grupos están relacionadas con el incremento de actividad de vías metabólicas en DM2. Se observa una mayor actividad de la biosíntesis de los azúcares o síntesis de mevalonato (metabolito intermediario de la biosíntesis de colesterol). Además, hay una mayor actividad de las vías relacionadas con la degradación de aminoácidos aromáticos, síntesis de clorofila y generación de energía (incremento de la respiración aeróbica)







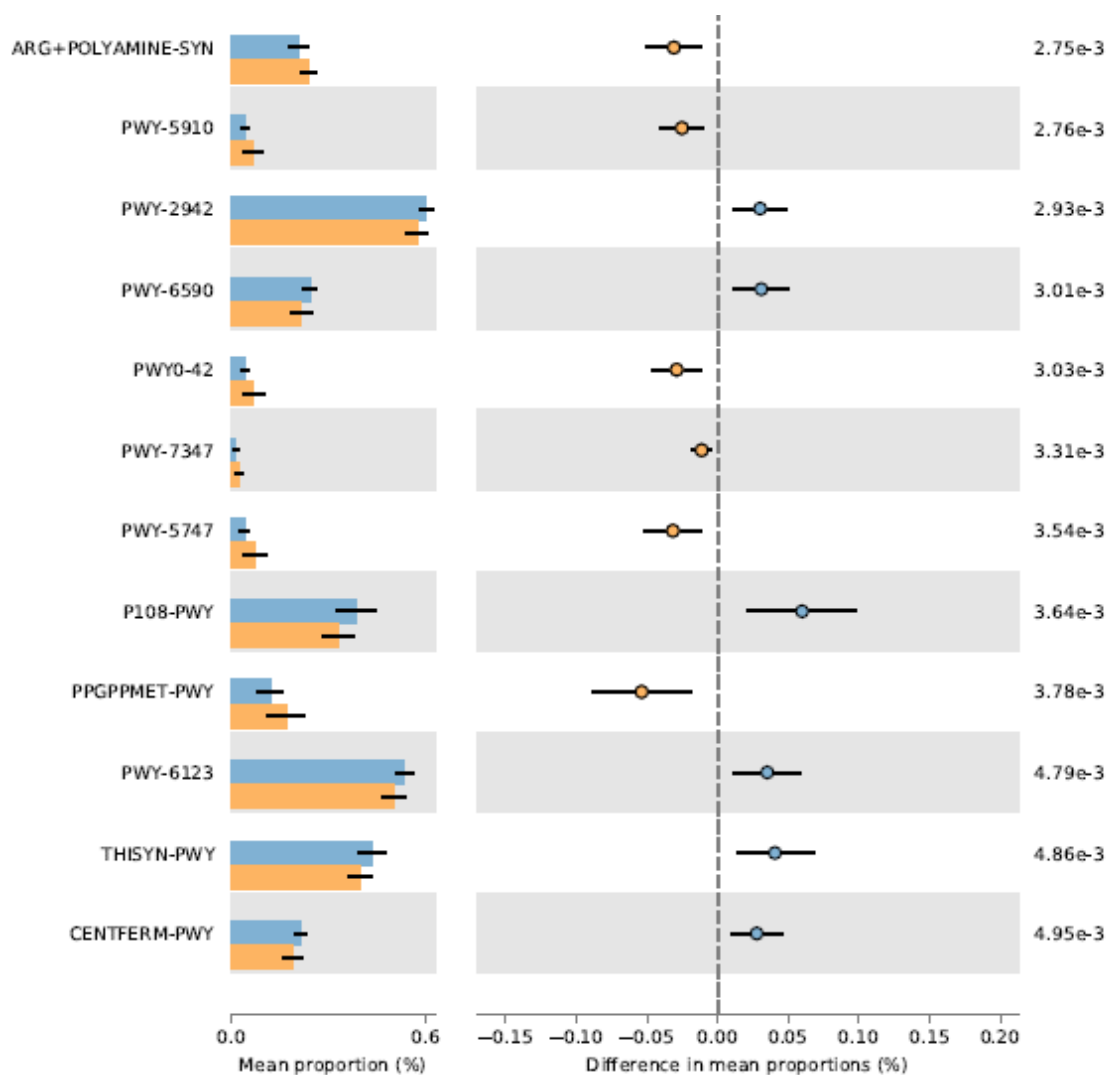
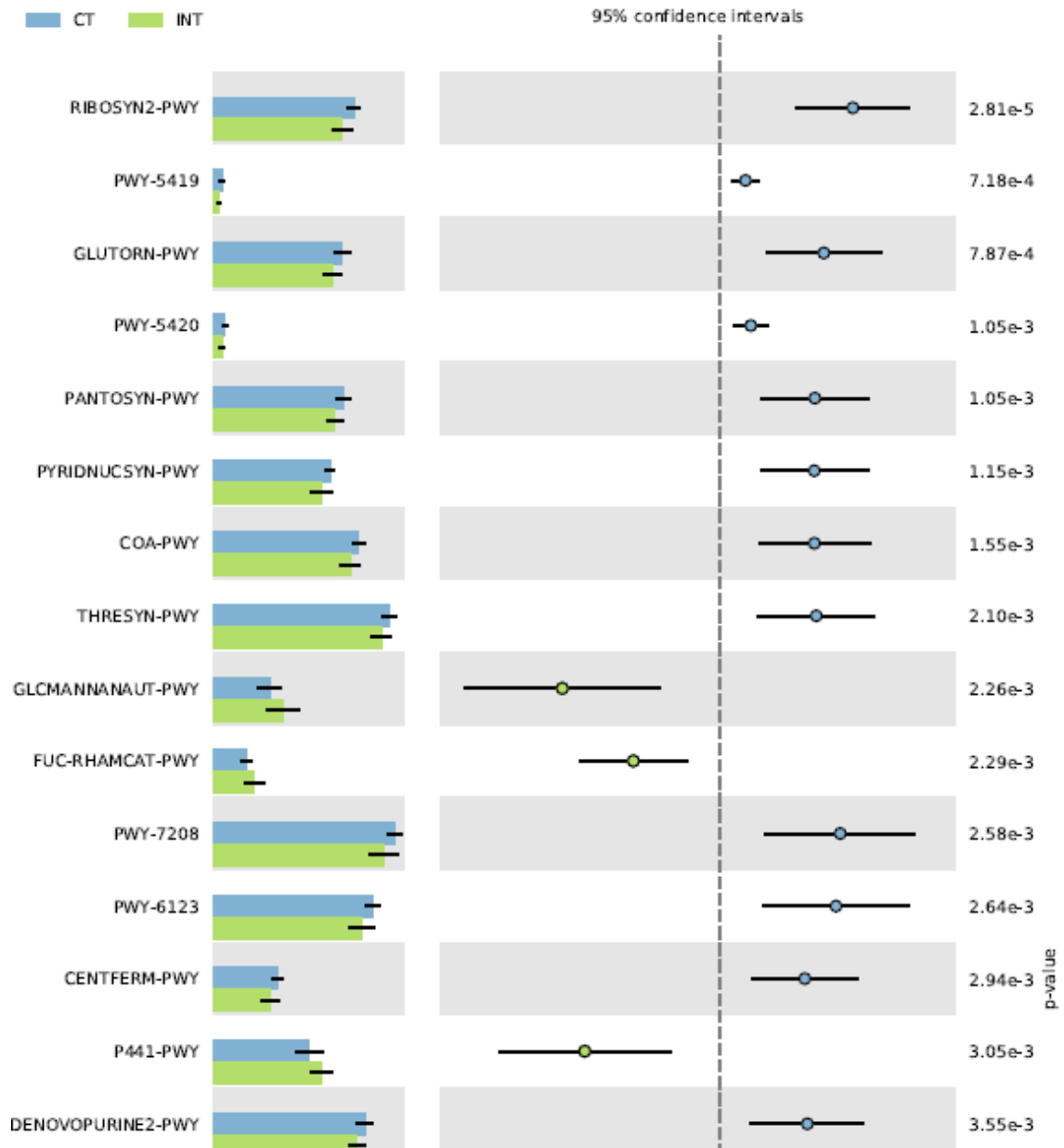


Figura 79. Las contribuciones predichas de los datos metagenómicos extraídos de MetaCyc para el análisis funcional de microbiota intestinal entre diabéticos en tratamiento con metformina (DM2) y controles sin diabetes (CT). Observamos 60 rutas metabólicas diferentes entre grupos. Se muestran las vías metabólicas que alcanzaron un grado de significancia estadística $p < 0,005$

Se observan 13 rutas metabólicas relacionadas con la síntesis de las menaquinonas y las demetilmenaquinonas con mayor actividad en microbiota intestinal del grupo DM2. Estos componentes se caracterizan por su capacidad lipofílica y se encuentran en muchas especies bacterianas, ya que las quinonas funcionan como componentes redox reversibles de la cadena de transferencia de electrones. Otra de las vías predominantes en microbiota intestinal del grupo DM2 son las relacionadas con la síntesis del grupo hemo; presentes tanto en los procesos metabólicos de oxidación como de transcripción de proteínas. Las rutas de síntesis de aminoácidos como alanina o triptófano también se muestran incrementadas, a igual, que dos rutas relacionadas con la síntesis de precursores de nucleótidos (ionosina 5P). No obstante, hay vías degradación o asimilación predominantes entre DM2 como es el catabolismo de azúcares o SCFAs (degradación de propionato). En microbiota intestinal del grupo CT observamos un incremento de las vías relacionadas con la síntesis de aminoácidos (L-treonina, L-lisina o L-isoleucina), biosíntesis de tiazoles (precursor de vitamina B1), precursores de isoprenoides, biosíntesis de flavinas,

síntesis de azúcares, aumento de generación de SFCAs, aumento de la producción de NAD⁺ y predominancia de las vías de síntesis y degradación de nucleótidos.



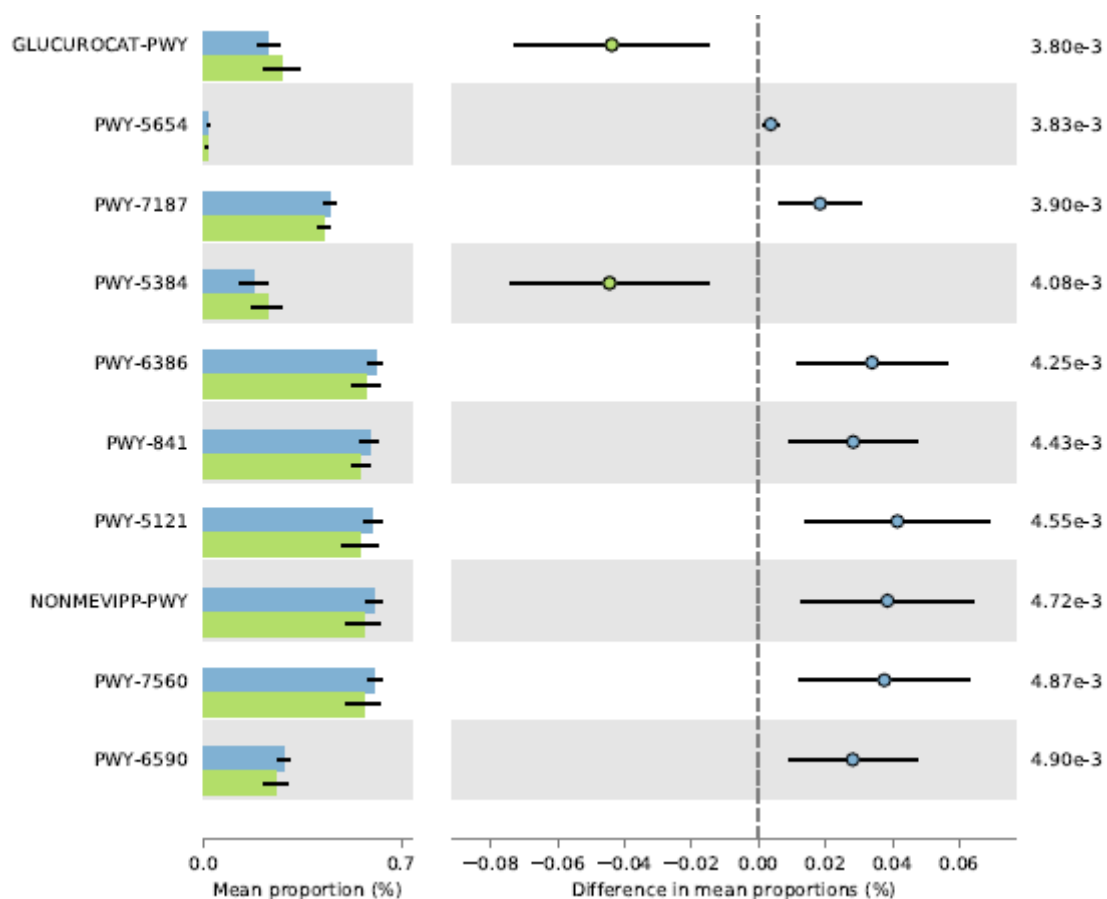


Figura 80. Las contribuciones de las vías predichas extraídas de los datos metagenómicos de MetaCyc para el análisis funcional de microbiota intestinal entre diabéticos tipo 2 en tratamiento con metformina (DM2) y controles sin diabetes (CT). Observamos 25 rutas metabólicas diferentes entre grupos. Se muestran las vías metabólicas que alcanzaron un grado de significancia estadística $p < 0,005$

En el resultado del análisis funcional se observa un incremento de vías de degradación o asimilación de aminas y azúcares como la sucrosa, ramnosa, glucoronidos o fructosa dentro de microbiota intestinal de INT. Sin embargo, en microbiota intestinal del grupo CT hay mayor actividad de vías relacionadas con la síntesis de nucleótidos, aminoácidos (treonina), biosíntesis de flavina, producción de SCFAs, coenzima A y precursores de los isoprenoides.

DISCUSIÓN

1. Diferencias taxonómicas y funcionales en microbiota intestinal de tolerantes e intolerantes gastrointestinales a metformina.

En el presente estudio se han descrito las características basales de microbiota intestinal de pacientes con historia de intolerancia a metformina y sus cambios subyacentes, tras la introducción de metformina en dosis progresivas. Los resultados de nuestro trabajo ponen de manifiesto la existencia de diferencias taxonómicas y funcionales en el microbioma intestinal de los intolerantes a metformina y, consecuentemente, estas diferencias podrían interferir o justificar la situación de intolerancia gastrointestinal. Sumatoriamente, en nuestro estudio observacional determinamos que aproximadamente 1 de cada 4 pacientes con posible intolerancia a metformina registrada pueden tolerar el fármaco, siempre y cuando se reintroduzca en dosis crecientes. Los pacientes con DM2 reclutados en nuestro estudio con antecedentes de intolerancia gastrointestinal a metformina y reclasificados, secundariamente, en tres grupos según su grado de tolerancia a metformina no presentaban diferencias en las características clínico-antropométricas. Asimismo, la administración de fármacos antidiabéticos entre los grupos también se distribuía de forma homogénea. La ausencia de diferencias en tratamientos antidiabéticos o variables clínico-antropométrica en los grupos clasificados como intolerantes precoces a metformina, intolerantes a metformina a dosis progresivas o tolerantes mejoran la robustez de los resultados extraídos en el análisis taxonómico y funcional.

En el análisis basal de microbiota intestinal se observaron diferencias a nivel de Filos en la comparación de los dos subgrupos clasificados como intolerantes a metformina. Concretamente, el filo Cyanobacteria, se muestra enriquecido entre los intolerantes precoces o tempranos a metformina. La presencia de Cyanobacteria se ha relacionado como promotor de disbiosis intestinal en situaciones como la erradicación de *Helicobacter pylori*, aunque no hay bibliografía que relacione este filo con la presencia de diabetes²⁶⁴. La proporción de los Filos Bacteroidetes y Firmicutes no mostraron diferencias entre los tres subgrupos clasificados según grado de tolerancia a metformina. Los cambios en la ratio de los Filos Bacteroidetes/Firmicutes son agentes ampliamente reconocidos como implicados en la disbiosis intestinal. En líneas generales, las enfermedades metabólicas reducen la proporción de Bacteroidetes, a favor de un aumento de los Filos Firmicutes y Proteobacterias¹⁶⁰, aunque también hay grupos de investigación que no han llegado a observar diferencias entre sujetos diabéticos y sujetos con tolerancia a la glucosa normal²⁶⁵. En el estudio de la alfa y beta diversidad microbiana de las muestras fecales tampoco se encontraron diferencias entre los tres grupos de pacientes a nivel basal, lo cual nos ayuda corroborar la homogeneidad de la disbiosis intestinal presente entre los pacientes reclutados como probables intolerantes a metformina²⁶⁶.

Profundizando en los resultados taxonómicos de nuestro estudio se observa un incremento de abundancia relativa en la familia *Clostridaceae* dentro del grupo de intolerantes precoces. La presencia de este taxón se ha localizado, previamente, en otras enfermedades inflamatorias, concretamente, se observa una mayor abundancia relativa entre los pacientes con la enfermedad inflamatoria intestinal asociada a artropatía o en pacientes con artritis reumatoide respecto a controles sanos²⁶⁷. Otra de las diferencias significativas a nivel de Familia viene determinada por el taxón *Prevotellaceae*. Las muestras

fecales basales de los pacientes tolerantes a metformina tienen mayor abundancia relativa de *Prevotellaceae*. Este taxón se caracteriza por la producción de butirato que es fuente predilecta por los colonocitos para la obtención de energía. Por otro lado, en la valoración de géneros bacterianos de nuestro análisis taxonómico hay que destacar la presencia del género *Subdoligranulum*. Este género bacteriano se ha correlacionado positivamente con la presión arterial sistólica o diastólica y conforma parte de las bacterias productoras de SCFAs²⁶⁸. Los dos subgrupos de intolerantes tuvieron una abundancia relativa superior de este género durante el análisis basal de microbiota intestinal respecto a los pacientes tolerantes. Las diferencias observadas sobre *Subdoligranulum* no se mantuvieron al secuenciar microbiota intestinal tras la administración de metformina. Según nuestros resultados, la mayor abundancia de *Subdoligranulum* en los dos grupos de intolerantes a metformina lo relacionan como un posible biomarcador de presencia de intolerancia gastrointestinal. Sin embargo, estudios previos muestran un enriquecimiento del género *Subdoligranulum* en los sujetos con DM2 y tratamiento con metformina^{219 269}. Las diferencias entre nuestros resultados y los trabajos previos podrían radicar en la clasificación de los grupos de intervención para el análisis del microbioma. Los primeros trabajos se centraron en describir la presencia de *Subdoligranulum* en sujetos DM2 con o sin metformina, respecto a grupos controles sin diabetes. En contraposición, nuestro trabajo ha clasificado los grupos de estudio según presencia o ausencia de intolerancia gastrointestinal a metformina. Así pues, con el presente trabajo no podemos descartar que el valor medio, del género *Subdoligranulum*, en los intolerantes a metformina pueda ser comparativamente inferior respecto a la población sana. Por tanto, según los resultados extraídos, en este presente trabajo de investigación, la presencia de *Subdoligranulum* podría interferir en la tolerancia gastrointestinal a metformina.

En las muestras fecales basales del grupo de tolerantes a metformina destaca la presencia del género *Megamonas*, y sus especies *Megamonas Rupellensis* y *Megamonas Funiformes*; con mayor abundancia relativa respecto a los sujetos intolerantes a metformina. No obstante, durante la intervención no se observaron modificaciones significativas en porcentaje de cambio de su abundancia relativa. Cabe destacar que la presencia del género *Megamonas* ha sido descrita en la caracterización del perfil de microbiota intestinal de intolerantes a la lactosa. Concretamente, en un reciente estudio con dos grupos definidos como intolerantes o tolerantes a la lactosa a los que se le administraba 250 ml de leche por día, durante cuatro semanas. En los resultados tras la intervención se destacó una disminución de la abundancia relativa del género *Megamonas* entre los intolerantes a la lactosa²⁷⁰. A nivel de estudios realizados en modelos animales destaca un trabajo en terneros, donde el género *Megamonas* se muestra de forma superior en la población de terneros sanos versus terneros con diarrea²⁷¹. En las muestras fecales finales del grupo con tolerancia a metformina se confirma que la abundancia relativa de *Megamonas funiformes* continúa siendo superior respecto a los no tolerantes. Así pues, el género *Megamonas* podría ser un biomarcador involucrado en preestablecer la presencia de tolerancia a metformina antes de la introducción del fármaco y, por tanto, una reducción de este biomarcador podría favorecer la presencia de diarrea en caso de iniciar metformina. Los intolerantes gastrointestinales precoces a metformina son el grupo con menor presencia del género *Phascolarctobacterium*, aunque sin

llegar a la significancia estadística cuando se analizan las diferencias entre los tres grupos. Este género bacteriano se caracteriza por ser un productor sustancial de acetato o propionato. Además, *Phascolarctobacterium* podría aumentar su abundancia en microbiota intestinal tras la exposición a berberina o metformina, según estudios realizados en ratones obesos. A nivel de nuestro estudio se visualizaron diferencias significativas con *Phascolarctobacterium ssp.*, siendo predominante entre los tolerantes, respecto a los dos subgrupos de intolerantes en situación basal. Por otro lado, el taxón *Phascolarctobacterium faecium* fue superior en microbiota intestinal de tolerantes a metformina en el punto final. Específicamente, *P. faecium* se ha correlacionado positivamente con un estado de ánimo positivo en humanos²⁷² y su reducción con la alteración del metabolismo glucémico²⁷³. *P. faecium* se distribuye ampliamente a través del tracto gastrointestinal humano y sus niveles pueden variar a lo largo de la vida humana, disminuyendo entre la población anciana²⁷³. Se desconoce su papel en la colonización de microbiota intestinal humana, pero algunos estudios lo relacionan con efectos beneficiosos sobre el hígado graso no alcohólico en modelos de rata²⁷⁴.

Las especies de *Sutterella* se han asociado con frecuencia con enfermedades humanas, como el autismo, el síndrome de Down y la enfermedad inflamatoria intestinal, pero el impacto de estas bacterias en la salud aún no está claro^{216 275}. En nuestro análisis se observa una mayor abundancia relativa de *Sutterella Wadsworthensis* en el grupo de tolerantes a metformina respecto a los intolerantes precoces. Por el contrario, *Bacteroides xylanisolvens*, bacteria gram negativa, presenta una abundancia relativa superior entre los intolerantes precoces de metformina, pero estas diferencias no se mantienen tras la administración de metformina. Por el contrario, *Bacteroides xylanisolvens* fue enriquecido en el análisis de las muestras fecales finales de los tolerantes a metformina versus intolerantes a metformina en dosis progresivas. La administración de metformina supuso un incremento de la abundancia relativa de tres especies bacterianas en el grupo de tolerantes a metformina, respecto a los no tolerantes en dosis progresivas: *Megamonas Funiformes*, *B.xylanisolvens* y *Blautia Producta*. Además, el comportamiento en el diferencial de cambio de abundancia relativa fue diferente entre tolerantes versus no tolerantes, en relación a los taxones *B.xylanisolvens* y *Blautia Producta*. Por lo consiguiente, se consideraron que los incrementos en abundancia relativa en estas dos especies fueron secundarios a la exposición de la metformina en microbiota intestinal del huésped y, a su vez, se podrían considerar como probables biomarcadores favorecedores de la tolerancia gastrointestinal. En un estudio realizado en ratones *Blautia Producta* fue una especie clave en la restauración de microbiota intestinal comensal de ratones que habían sido colonizados por enterococos resistentes a vancomicina tras la administración de tratamiento antibiótico²⁷⁶. Además de lo anterior, *Blautia spp* también podrían contribuir a mantener la homeostasis de la glucosa debido a su capacidad para equilibrar mediadores pro y antiinflamatorios de la respuesta inmune²⁷⁷. Sin embargo, los beneficios secundarios de la presencia de *Blautia spp* en DM2 aún son controvertidos y, contradictoriamente a nuestros datos, el género *Blautia* en conjunto con la presencia de *Tyzzrella*, *Holdemanella* y *Oscillabacter* se correlacionaron con la presencia de diarrea tras la administración de metformina en sujetos con DM2 y etnia japonesa²⁷⁸.

En el caso de la especie *B.xylanivsolvens*, su presencia en el análisis de la microbiota intestinal

fue descrita superior dentro de la DM1 respecto a población sin diabetes. *B.xylanivsolvens* es una de las especies involucradas en la descomposición del xilano en el intestino humano, junto con *Bacteroides ovatus* o *Bacteroides fragilis*. Además, presenta la capacidad de producir succinato, propionato o acetato a partir de muchos azúcares como son la glucosa, manitol, sacarosa, glicerol, fructosa o galactosa. Esta capacidad podría favorecer una mejora de la obtención de sustratos energéticos en microbiota intestinal²⁷⁹. Otra bacteria gram negativa, *Prevotella Stercorea*, perteneciente al orden de los *Bacteriodales*, exhibió diferencias entre grupos. Los pacientes tolerantes a metformina presentaron una predominancia de *P. Stercorea* a nivel basal respecto a los intolerantes precoces a metformina.

A nivel de la secuenciación de géneros bacterianos durante análisis basal se observaron diferencias en los niveles de *Veillonella* y *Serratia*, dado que mostraron un enriquecimiento entre en los intolerantes durante la progresión de dosis. *Serratia* ha sido asociado previamente a la obesidad abdominal²⁸⁰ y la presencia *Veillonella* ha sido relacionada con una disminución de la diversidad microbiana en la población infantil con DM1 respecto a controles sanos. Entre las funciones conocidas de *Veillonella* se encuentra su capacidad de competir por el lactato como fuente de energía con las bacterias productoras de butirato. El resultado es la producción de propionato en la fermentación láctica en vez de butirato. Esto podría influir en la síntesis de mucina en los enterocitos y aumentaría la permeabilidad intestinal a través de la alteración de las uniones estrechas²⁸¹. Por otro lado, es llamativo el hallazgo de niveles superiores del género *Clostridium* entre los intolerantes precoces a metformina respecto a los intolerantes a dosis progresivas, se trata de un biomarcador que se ha correlacionado de forma positiva con la presencia de obesidad. En nuestro estudio los pacientes tolerantes a metformina versus los intolerantes a metformina no presentan diferencias en la distribución de peso ni IMC, aunque si exhibían obesidad. A priori, la presencia del género *Clostridium* no debería haberse mostrado con una distribución diferente entre grupos a nivel basal. Así pues, hipotetizamos que la presencia de *Clostridium* entre los intolerantes a metformina podría estar implicada en la aparición de los efectos adversos digestivos de metformina^{282 283}. Estos hallazgos van en consonancia con la bibliografía previa, puesto que en microbiota intestinal de los pacientes DM2 sin tratamiento con metformina se ha observado una predominancia de bacterias oportunistas y elevación de marcadores de inflamación de bajo grado. La reducción de la diversidad bacteriana conduce al aumento de bacterias patógenas e inflamación intestinal provocando la activación de la respuesta inmune innata con la activación de los TLR, incremento de citocinas proinflamatorias y endotoxemia intestinal^{219 247}. Estas respuestas inmunes innatas o la propia liberación de sustancias tóxicas como el H₂S en el medio intestinal pueden contribuir a la aparición del intestino permeable con el acceso de componentes microbianos desde el lumen hacia al torrente sanguíneo favoreciendo la inflamación sistémica¹⁴². La microbiota intestinal de pacientes DM2 sin tratamiento con metformina se caracteriza por una mayor presencia de los géneros *Eubacterium* y *Clostridiaceae SMB53* o niveles más bajos de SCFA, debido a la reducción de la presencia de bacterias productoras de butirato como *Roseburia*, *Subdoligranulum* y de *Clostridiales*.^{248 250}

En el estudio longitudinal de las muestras fecales de los intolerantes a dosis progresivas no han mostrado modificaciones en la diversidad ni taxonomía debido a la ausencia de exposición de dosis

terapéutica de metformina el suficiente tiempo como para modificar microbiota intestinal basal. En el caso de los pacientes que sí presentaron tolerancia a metformina durante el estudio longitudinal tampoco han presentado cambios a nivel de la biodiversidad alfa o beta. Sin embargo, si se han observado cambios taxonómicos, los pacientes tolerantes a metformina presentaron una reducción de la abundancia relativa de *Ruminococcus gnavus*. Múltiples estudios asocian la presencia *Ruminococcus gnavus* como una bacteria prevalente en la enfermedad de Crohn. Además, en su análisis funcional destaca la capacidad de esta bacteria de sintetizar y secretar un polisacárido de glucoromanano complejo con una cadena principal de ramnosa y cadenas laterales de glucosa. Este polisacárido ejerce la función de inducción de secreción de toxinas inflamatorias como el TNF α que son dependientes de la activación de TLR4²⁸⁴. La disminución de la presencia de este taxón durante la intervención podría significar que metformina puede ejercer de forma indirecta un efecto antiinflamatorio protector a nivel intestinal.

En los resultados extraídos del análisis de microbiota intestinal de las muestras fecales finales destaca la presencia del género *Eubacterium*. La microbiota intestinal de los pacientes no tolerantes a metformina durante la titulación de dosis exhibieron un enriquecimiento superior de *Eubacterium*. Anteriormente, se había descrito un incremento del género *Eubacterium* en microbiota intestinal de pacientes con DM2 de etnia africana respecto a controles sanos²⁸⁵. En la dirección opuesta, se encuentran los resultados observados en mujeres europeas con DM2, dónde hay depleción de *Eubacterium spp* respecto a población sin alteración del metabolismo glucídico²¹⁵. En la literatura previa los cambios en el perfil de microbiota de pacientes expuestos por primera vez a metformina se han relacionado con un enriquecimiento de los taxones *Escherichia spp* o *Intestibacter* y reducción de *Intestinibacter bartlettii*²⁴⁸
251 286.

Los distintos estudios que han analizado la repercusión de metformina en el microbioma intestinal no son homogéneos en su metodología, se difieren en tiempo y dosis de administración de metformina, momento de análisis de microbiota intestinal, tiempo de evolución de la diabetes, controles utilizados, edad o etnias incluidas. En la literatura actual sólo hay un ensayo randomizado aleatorizado cruzado en humanos dónde se introduce metformina observándose un incremento de hasta 84 taxones tras cuatro meses de tratamiento. Estos taxones pertenecían mayormente a los filos Firmicutes y Proteobacterias²⁴⁸.

En nuestro estudio de las rutas metabólicas predichas por PICRUSt de las muestras fecales previa a la introducción a metformina observamos que los pacientes que serán tolerantes al fármaco presentan incrementadas las vías de síntesis de aminoácidos (biosíntesis de lisina o metionina). En cambio, en los dos subgrupos de intolerantes a metformina las vías metabólicas más activas son las relacionadas con la degradación de azúcares o aminoácidos, de forma similar a lo que sucede en las dietas ricas en productos de origen animal. Además, en el grupo de tolerantes a metformina se observa un incremento de las vías de producción de nucleótidos, síntesis de riboflavinas y precursores de coenzima A en comparación con el subgrupo de no tolerantes a metformina durante la titulación de dosis. En la literatura previa se había expuesto que la microbiota intestinal de pacientes DM2 sin metformina presenta un aumento de la actividad de genes microbianos relacionados con el metabolismo oxidativo y de genes relacionados con

la degradación de ribosa, glicina, triptófano y piruvato^{287 248 256}. La acción de la metformina sobre la microbiota intestinal se ha relacionado con el aumento de diferentes vías relacionadas con el metabolismo central de los carbohidratos (sistema de fosfotransferasa, metabolismo del piruvato, butirato y propionato), así como con el metabolismo de los aminoácidos²⁴⁸. Entre los no tolerantes a metformina durante la progresión de dosis la vía de degradación de arginina está incrementada respecto a los tolerantes en situación basal. Al comparar entre sí los dos subgrupos de intolerantes a metformina observamos que los intolerantes precoces presentan tres vías relacionadas con la degradación de metionina incrementadas respecto a los no tolerantes. Así pues, podríamos teorizar que los pacientes con mayor posibilidad de intolerancia a metformina presentan el anabolismo proteico bacteriano disminuido. Por otra parte, está incrementada la vía de poliisoprenoides a nivel basal en el grupo que tolerará metformina respecto a los que no toleraran el fármaco en dosis progresivas y, concretamente, esta ruta metabólica puede estar involucrada con la producción de LPS. Sin embargo, el incremento de LPS no siempre se correlaciona con inflamación, en pacientes intervenidos de cirugía bariátrica se ha observado un incremento de LPS sin aumento de la inflamación sistémica²⁸⁸.

Cuando valoramos a nivel longitudinal el análisis funcional de microbiota observamos que sólo los tolerantes presentan cambios, e hipotetizamos como hemos comentado, anteriormente, en el análisis de la biodiversidad, que no ha habido tiempo suficiente de exposición al fármaco para visualizar modificaciones en las rutas metabólicas predichas de los intolerantes a dosis progresivas. Los pacientes tolerantes a metformina presentaron algunas modificaciones en la expresión de rutas relacionadas con metabolismo de los aminoácidos. Concretamente, un incremento de la vía de degradación de histidina y disminución de la biosíntesis de L-lisina, L-treonina y L metionina tras la tolerancia a metformina. Además, de un enriquecimiento de la producción de vitamina B6 (coenzima presente en procesos de biosíntesis de aminoácidos y peptidoglicanos), pero acompañado de una reducción de la producción de peptidoglicanos respecto a la situación inicial. Los incrementos de la vía de producción de vitamina B6 ya se habían visualizado previamente en población sana a la que se le administrada en corto periodo metformina²⁸⁹. Cabe destacar también que la única vía diferenciadora en el análisis funcional de microbiota intestinal durante el punto final fue la mayor actividad de la biosíntesis de vitamina B5 entre los pacientes tolerantes a metformina. Así pues, se precisarán más estudios que consigan desarrollar más ampliamente el papel de metformina en la síntesis de vitaminas del grupo B y su repercusión dentro del huésped.

Por otro lado, con el objetivo de un estudio más profundo de las vías metabólicas que se habían diferenciado entre los grupos basalmente decidimos analizar su evolución tras la administración de metformina. Curiosamente, tras la administración de metformina la mayoría de estas vías mostraron una tendencia inversa en su predominancia. Especialmente, aquellas rutas metabólicas que al menos mostraron una tendencia diferente basalmente entre los diferentes grupos de tolerantes a metformina e intolerantes a metformina en dosis progresivas. Metformina podría ser responsable de cambios en los sustratos en el lumen y, secundariamente, favorecer cambios en la abundancia relativa bacteriana. Previamente, en una población mexicana dónde se estudió microbiota intestinal de pacientes con alteración del metabolismo de glucídico en diferente grado y tratamiento se observaron más actividad de

las rutas metabólicas metabolismo de energía, carbohidratos, aminoácidos y lípidos en los sujetos con DM2 en tratamiento con metformina²¹⁷. En definitiva, se requieren nuevos estudios metagenómicos adicionales para identificar cuáles son los mecanismos por los que metformina puede promover la actividad de ciertas rutas metabólicas y qué supone estos cambios para la salud metabólica del huésped.

2. Diferencias taxonómicas y funcionales en microbiota intestinal de intolerantes a metformina versus controles con diabetes mellitus tipo 2 en tratamiento con metformina y controles sin diabetes.

Una vez confirmada nuestra población de verdaderos intolerantes a metformina nos dispusimos a comparar las muestras fecales con una población con DM2 en tratamiento con metformina y un grupo control sin diabetes. Los controles seleccionados fueron pareados por sexo y edad. El sexo femenino fue más mayor sobre el masculino en el reclutado de pacientes intolerantes a metformina y, por ello, los dos grupos controles se aparearon según sexo y edad, evitándose que las diferencias encontradas pudiesen ser atribuibles a edad o sexo de nuestras poblaciones estudiadas. En el análisis de las variables clínica-antropométricas el grupo control presentaron niveles tensión arterial sistólica medios más elevados en consulta que los diabéticos con metformina o intolerantes. Se decidió recoger pacientes controles sin diabetes que no presentaran diferencias en peso o IMC con el resto de los pacientes reclutados, es decir, controles con obesidad sin diabetes dado que los pacientes con intolerancia a metformina tenían un IMC medio de 32,4 kg/m². El objetivo venía determinado por extraer diferencias en el análisis taxonómico o funcional que no fueran dependientes del estado de obesidad/sobrepeso de los intolerantes a metformina. El estudio de la diversidad microbiana es uno de los principales indicadores de salud microbiana. En nuestro estudio la betadiversidad comparada entre los intolerantes a metformina con los grupos controles de diabéticos con metformina y sin diabetes se ha mostrado claramente diferente. Concretamente, al realizar el estudio por parejas los intolerantes a metformina continúan difiriendo de la muestra de pacientes diabéticos con metformina. Sin embargo, no observamos diferencias cuando comparamos la betadiversidad de las muestras fecales de los pacientes controles sin diabetes respecto a todos los intolerantes a metformina. Así pues, podríamos decir que los pacientes con metformina muestran una expresión microbiota intestinal más diferente respecto al resto²⁴⁹. En la evaluación de alfa diversidad que se encarga del estudio de la riqueza de especies en las muestras estudiadas no se observaron diferencias entre los tres grupos a estudio²⁹⁰.

En la evaluación del análisis taxonómico a nivel de Filos destaca la presencia incrementada del Filo *Verrucomicrobia* entre los controles sin diabetes respecto a intolerantes a metformina y diabéticos con metformina. Cuando se realiza el análisis por parejas observamos como la presencia de *Verrucomicrobia* se mantiene superior en el grupo de controles respecto al resto de grupos. Sin embargo, no se observan diferencias estadísticamente significativas entre diabéticos en tratamiento con metformina e intolerantes a metformina; aunque la proporción media de *Verrucomicrobia* es mayor entre los diabéticos con metformina. Este filo se considera un agente protector de la barrera intestinal,

favoreciendo un ambiente antiinflamatorio y mejorando la sensibilidad a la insulina. En modelos animales alimentados con dieta rica en grasas o dieta normocalórica metformina puede presentar la capacidad de incrementar la abundancia relativa del filo *Verrucomicrobia*²⁵⁴. Añadido a lo anterior, el filo *Verrucomicrobia* es también conocido por mejorar el metabolismo de la glucosa en modelos animales²⁹¹. El agotamiento de la *Verrucomicrobia* podría tener como resultado el crecimiento de *Proteobacterias* con carácter patógeno como *Escherichia* y *Shigella*^{212 283}.

Por otro lado, en la actualidad no hay resultados uniformes en los cambios observados en la proporción de los Filos *Firmicutes* y *Bacteroidetes* tras la administración de metformina como se ha discutido anteriormente. Sin embargo, en población mexicana tras un año de administración de metformina se ha observado una disminución de la abundancia relativa del Filo *Firmicutes* en un 50%. En modelos animales, concretamente, ratones, se ha observado un cambio de las especies de *Firmicutes* en las primeras etapas de la diabetes hacia un enriquecimiento de las especies de *Bacteroidetes* en las últimas etapas de la diabetes^{292 217}. En nuestra población podemos observar cómo los niveles medios de *Bacteroidetes* entre los intolerantes a metformina son los más inferiores si los comparamos con diabéticos con metformina y controles sin diabetes. En el caso de Filo *Firmicutes* se observa una abundancia relativa ligeramente superior entre los intolerantes a metformina en comparación a los diabéticos con metformina, pero sin diferencias estadísticamente significativas en el análisis multivariante. Una de las posibles causas de ausencia de diferencias en la abundancia relativa de los fillos *Bacteroidetes* y *Firmicutes* es probablemente secundaria a la reducida muestra de pacientes de nuestro estudio. No obstante, los miembros pertenecientes al filo *Bacteroidetes* también se han asociado con enfermedades metabólicas en humanos, aunque con resultados poco homogéneos. Cuando profundizamos en la diversidad dentro de los *Bacteroidetes* se revela una vasta diversidad en genomas y capacidades, lo que explica en parte, cómo no todos los miembros pueden responder de igual forma a las mismas condiciones ambientales.

Al valorar la taxonomía del grupo de intolerantes a metformina observamos cómo hay una mayor expresión de las familias *Enterobacteriaceae* y *Porphyromonadaceae*. Los taxones *Escherichia spp* y *Shigella spp* son dos biomarcadores pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* y relacionadas con la intolerancia a metformina en pacientes sanos a los que se le administró el fármaco un corto periodo de tiempo²⁵¹. Concretamente, las muestras fecales basales de aquellos que experimentaron mayor sintomatología digestiva describieron niveles superiores de *Escherichia-Shigella spp*. Previamente, sabíamos que la administración de metformina favorece el crecimiento de *E. Coli*, siendo una bacteria con cualidades patógenas, por lo que se ha hipotetizando la posibilidad de que estos taxones sean causantes de la intolerancia gastrointestinal²⁴⁸. En nuestro estudio, está incrementada la familia *Enterobacteriaceae* a nivel de los intolerantes a metformina en la comparación entre los tres grupos, sin embargo, cuando se comparan las familias por parejas, los diabéticos con metformina también presentaron abundancia relativa superior de *Enterobacteriaceae* respecto a los controles. Estos resultados contradicen lo observado en microbiota intestinal de población Escandinavia, dónde la familia *Enterobacteriaceae* fue superior solamente entre los pacientes DM2 en tratamiento con metformina respecto a los pacientes sin tratamiento²⁵⁵. En cambio, en la comparación de las familias bacterianas entre las parejas de intolerantes

y diabéticos con metformina sólo observamos diferencias en la familia *Porphyromonadaceae*. Se encuentran clasificados dentro del orden *Bacteroidales* y comprende los géneros *Porphyromonas*, *Barnesiella* o *Butyrivimonas*. En un estudio previo realizado en ratas donde se administró berberina se observaron cambios a nivel del taxón *Porphyromonadaceae*. Más específicamente, berberina se ha caracterizado por ser un fármaco con capacidad de inducir diarrea a igual que sucede con metformina²⁹³. Característicamente, en este estudio se observó incremento de la abundancia relativa de las familias *Porphyromonadaceae* y *Prevotellaceae*, así como los géneros *Parabacteroides*, *Prevotellaceae_UCG-001* y *Prevotellaceae_NK3B31*. Cabe destacar que berberina presenta un potencial antidiabético y similitudes con metformina actuando a través de la enzima AMPK, regulando metabolismo energético y la sensibilidad de los tejidos a la insulina²⁹³. Por último, a nivel de familia se observa un enriquecimiento de taxones *Rikenellaceae*, *Desulfuvibrionaceae*, *Oxalobacteriaceae* en el grupo control respecto a los intolerantes o diabéticos con metformina. *Rikenellaceae* es una productora habitual de butirato y se ha visualizado aumentada en los individuos normopeso y reducida en las situaciones de sobrepeso u obesidad, correlacionándose inversamente al IMC²⁹⁴. A nivel de géneros bacterianos destaca la presencia del género *Blautia* a nivel de los intolerantes respecto a los diabéticos con metformina y controles. El género *Blautia* se ha encontrado aumentado en tres estudios transversales de microbiota en pacientes con DM2²⁶⁹, aunque de forma contraria también se ha observado depleción del género *Blautia* en microbiota intestinal de pacientes recientemente diagnosticados de diabetes y que aún no habían iniciado tratamiento antidiabético.²¹⁸ La recuperación de los niveles del género *Blautia* puede ser secundario a la administración de tratamientos antidiabéticos. Aunque el papel del género *Blautia* en las enfermedades metabólicas es controvertido, por ejemplo, en población infantil parece que la depleción de este género se correlaciona positivamente con la obesidad y la resistencia a la insulina. Sin embargo, hay que tener presente las diferencias existentes entre las propias especies de *Blautia*, específicamente, *Blautia coccooides* ejerce un papel proinflamatorio en el huésped incrementando la secreción TNF α e IL-10. En dirección opuesta, supuestamente, se encontraría *Blautia Luti*, que se considera agente protector de sobrepeso u obesidad en edad infantil ²⁹⁵, sin embargo, en nuestros resultados *B. luti* es superior entre los sujetos con diabetes, independientemente de la presencia de tratamiento con metformina. Asimismo, el género *Blautia* también se ha asociado con la presencia de diarrea en el síndrome intestino irritable en población caucásica²⁹⁶, pero hasta el momento no hay evidencia de su relación con otras enfermedades gastrointestinales.

Profundizando en los resultados a nivel género se observa un enriquecimiento de otros taxones como son *Clostridium* y *Ruminococcus_1* a nivel de los intolerantes a metformina. Estos géneros bacterianos se mantuvieron superiores tanto en el análisis comparativo entre los tres grupos como en la comparación por pares con pacientes diabéticos con metformina. El género *Clostridium* puede mermar su abundancia relativa en microbiota intestinal tras la exposición a metformina en individuos sanos, por lo que nuestros resultados podrían en consonancia a los datos previos sobre este género²⁵¹. En este mismo estudio de individuos sanos a los que se le introdujo metformina se observó un enriquecimiento de la especie, *Bilophila wadsworthia*, conocida por ser un miembro importante de bacterias sulfidogénicas en

el intestino humano y se ha relacionado directamente con diferentes trastornos metabólicos crónicos o neoplásicos como el cáncer de colon. El sulfuro de hidrógeno, producido por bacterias sulfidogénicas autóctonas, desencadena vías proinflamatorias e hiperproliferación, y es característicamente genotóxico^{251 297}. En nuestros resultados se mostraron niveles superiores de *Bilophila*, pero no de su especie *Bilophila wassworthia*, en microbiota intestinal de los pacientes intolerantes a metformina. En nuestro trabajo el género bacteriano *Bilophila* estaba menos representado entre los diabéticos con metformina, por lo que podríamos hipotetizar que su depleción en microbiota intestinal es secundaria al tratamiento antidiabético con metformina. No obstante, hay otras causas que interfieren en la abundancia de *Bilophila*, entre ellas, la adherencia a un patrón dietético rico en grasas, el cual favorece la presencia de organismos tolerantes a la bilis como *Bilophila*. En la bibliografía actual se han descrito tanto enriquecimiento como depleción del género *Bilophila* en microbiota de pacientes con diabetes mellitus en tratamiento con metformina, por lo que queda por esclarecer su papel en microbiota intestinal y enfermedades metabólicas²⁹⁸.

El género *Paraprevotella* tuvo una mayor representación entre los diabéticos con metformina respecto a los intolerantes. Se trata de un taxón previamente relacionado con disbiosis intestinal enfermedades autoinmunes como el Behcet o la tiroiditis autoinmune²⁹⁹. A nivel del grupo control destaca la presencia incrementada del género *Akkermansia* respecto a microbiota intestinal de intolerantes a metformina. Este taxón es ampliamente conocido por su potencial beneficioso en el huésped y se representa mermado en enfermedades metabólicas como la obesidad, enfermedad cardiovascular o diabetes. Se trata de un género relacionado con la degradación de mucina y la protección de la barrera intestinal. Asimismo, tanto en estudios de ratones con dietas ricas en grasas como en población con DM2 su presencia se correlaciona negativamente con los niveles de glucosa plasmático o con Hb1Ac^{246 253}. En concreto, su especie más representativa, *Arkkemansia Muciniphila*, está habitualmente presente en los DM2 en tratamiento crónico con metformina. Esta capacidad de metformina de favorecer tanto la producción de SCFAs como la presencia de *A. Muciniphila* se relaciona con un potencial efecto antiinflamatorio de este fármaco entre los DM2²¹⁸. En nuestro estudio no se observaron diferencias estadísticamente significativas a nivel de *Arkkemansia* o *A. muciniphila* entre las muestras fecales de diabéticos con metformina y grupo control. Otro de los géneros bacterianos que aparecen reducidos entre los intolerantes metformina con potencial beneficio para el huésped es *Alistipes*. Hay evidencia científica previa que lo considera como un género bacteriano con efectos protectores contra algunas enfermedades tales como la fibrosis hepática, colitis, inmunoterapia contra el cáncer y enfermedades cardiovasculares³⁰⁰. Por último, otros taxones con mayor representación entre los controles sin diabetes fueron los géneros *Barnesiella* o *Herbaspirillum*. En el caso de *Barnesiella* sus especies se han correlacionado negativamente con la colonización de *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina en intestinos de ratones, por lo que se puede considerar como un taxón potencialmente beneficioso para el huésped³⁰¹. Sin embargo, *Herbaspirillum* es un género más desconocido y con mayor presencia a nivel medioambiental. Estamos ante un género perteneciente al Filo *Proteobacteria* y se caracterizan principalmente, por tener propiedades fijadoras de nitrógeno.

En los resultados arrojados a nivel de especies bacterianas observamos como en microbiota intestinal de los controles sin diabetes presentan una mayor abundancia de *Barnesiella intestinihominis*. Se trata de una especie bacteriana con un papel potencialmente beneficioso para el huésped. *B.intestinihominis* en modelos murinos se ha asociado a la presencia de un porcentaje superior de masa magra y mayor capacidad funcional entre los ratones ancianos. Por otra parte, se ha visualizado en humanos que pacientes diagnosticados con cáncer colorrectal presentaron una reducción de abundancia relativa de *B.intestinihominis*, acompañada, asimismo, con menor presencia de otras especies con conocido potencial beneficioso como pueden ser *F. prausnitzii*, *Alistipes finegoldii*, *Bacteroides eggerthii* y *Eubacterium siraeum*³⁰². En nuestro análisis taxonómico a nivel de especies se observa una predominancia de *Ruminococcus sp* en el grupo clasificado como intolerantes a metformina. Este resultado se mantuvo superior tanto en la comparación de especies de muestras fecales de diabéticos con metformina como en el caso de los controles sin diabetes. Así pues, puede considerarse como un biomarcador característicamente diferenciador de microbiota intestinal de intolerantes a metformina. El género *Ruminococcus* y algunas de sus especies son conocidas por presentar capacidad proinflamatoria a nivel gastrointestinal; asociándose su presencia a enfermedades como el colon irritable o correlacionándose de forma positiva en el desarrollo de DM2³⁰³.

A nivel del grupo de diabéticos con metformina destaca la superioridad en abundancia relativa de la especie *Paraprevotella Clara* respecto al resto de grupos. El género *Paraprevotella* se caracteriza por la producción de ácido succínico y acético como principales productos de fermentación, pero aún se desconocen las implicaciones que pueden conllevar sobre la salud humana. *Bacteroides Coprocola* también fue superior en el grupo de pacientes con DM2 y tratamiento con metformina, pero las diferencias sólo se mantuvieron en la comparación con los pacientes intolerantes a metformina. Curiosamente, parece ser que las especies de *B. Coprocola* contenidas dentro de microbiota intestinal de población con DM2 desarrollan diferencias a nivel de polimorfismos de un nucleótido respecto a población sana. En total, se han identificado 65 genes diferentes en *B. coprocola* dentro de población con DM2 y parte de esos cambios se atribuyeron a genes que codifican las glicosil -hidrolasas³⁰⁴. En las muestras fecales de los intolerantes respecto a los diabéticos con metformina se observa un enriquecimiento de las especies *Ruminococcus sp*, *Streptococcus Salivarius* y *Butyricimonas sp*. La presencia de *Streptococcus salivarius* se ha asociado a un potencial beneficio en la mucosa oral, planteándose su beneficio como probiótico³⁰⁵. *Butyricimonas sp* presenta en su estructura homología con péptidos desencadenantes en la respuesta autoinmune de la artritis reumatoide. Concretamente, el péptido Filamina A presentado por HLA-DR tiene homología con epítopos de proteínas de *Prevotella sp.* y *Butyricimonas sp*³⁰⁶. Consecuentemente, las especies *Ruminococcus sp* y *Butyricimonas sp* presentan un potencial patogénico a nivel del huésped favoreciendo la disbiosis intestinal en los pacientes intolerantes a metformina o incluso pudiendo colaborar en el desarrollo de enfermedades de índole autoinmune o inflamatorias.

En los resultados arrojados sobre las especies bacterianas cuantificadas en intolerantes a metformina y controles sin diabetes se determinaron un incremento de la abundancia relativa de *Blautia*

Luti, *Ruminococcus sp*, *Sutterella sp*, *Bacteroides salivarus* y *Eubacterium hadrum* entre los intolerantes a metformina. Las especies que se encontraron en menor predominancia respecto los controles fueron *Roseburia faecis*, *Akkermansia Muciniphila*, *Alipstes onderdonkii* y *Phascolartobacterium sp*. En los intolerantes a metformina destaca el número mermado de especies bacterianas fundamentalmente productoras de SCFAs. Específicamente, el género *Roseburia* se caracteriza por ser productora de butirato y, en concreto, su especie *Roseburia faecis*, se asociada a dietas enriquecidas en cereales de granos completos. En el caso de las especies bacterianas pertenecientes al género *Alistipes* hay evidencia científica que las relacionan con efectos protectores contra algunas enfermedades: fibrosis hepática, colitis, inmunoterapia contra el cáncer y enfermedades cardiovasculares. Por el contrario, otros trabajos indican que el género *Alistipes* estaría implicado como agente patógeno en la presencia de cáncer colorrectal o interrelacionado en enfermedades mentales como la depresión^{300 307}. En el análisis por pares de las especies bacterianas de diabéticos con metformina volvimos a observar un aumento de la abundancia relativa de *Blautia Luti*, acompañada de una reducción de las especies *Barnisiella intestinihominis*, *Bacteroides coprophilus* y *Eubacterium siraeum*, en comparación con las muestras del grupo control sin diabetes.

Los resultados extraídos de PICRUSt sobre las muestras fecales de pacientes intolerantes a metformina, DM2 en tratamiento con metformina y controles determinaron que las rutas metabólicas predichas eran, característicamente, más opuestas entre los pacientes con DM2 en tratamiento con metformina y los controles. Las vías metabólicas predichas por MetaCyc sitúan a los pacientes intolerantes a metformina en una situación intermedia entre los tres grupos analizados. Más específicamente, observamos que hay un incremento de las rutas metabólicas de biosíntesis azúcares dentro de los DM2 con metformina, concretamente, la síntesis de sucrosa. Por el lado contrario, los pacientes controles sin diabetes en nuestro trabajo muestran a nivel del metabolismo hidrocarbonado un incremento de actividad en las vías relacionadas con la degradación de azúcares. Estos hallazgos corroboran datos descritos previamente a nivel de funcionalidad, donde se observa un incremento de la actividad del metabolismo hidrocarbonado en pacientes con DM2 en tratamiento con metformina, por ejemplo, se ha observado una mayor actividad del metabolismo central de los carbohidratos (sistema de fosfotransferasa, piruvato, butirato y propionato)^{248 287 308}. Previamente, otros estudios funcionales realizados en pacientes DM2, sin contemplar la presencia o ausencia de tratamiento con metformina, habían mostrado un aumento de genes relacionados con el transporte de transmembrana de glucosa, aumento del transporte y metabolismo de los aminoácidos ramificados e incremento de las rutas de sulfato reducción³⁰⁹.

En los resultados de este presente trabajo sobre el metabolismo de los aminoácidos se ha observado una mayor actividad de vías metabólicas relacionadas con biosíntesis de aminoácidos en los grupos control y diabéticos tipo 2 en tratamiento con metformina. Anteriormente, en el estudio multicéntrico de *Forslund et al*²¹⁹ se había descrito que los sujetos con DM2 en ausencia de tratamiento con metformina presentaban una mayor actividad de genes relacionados con la degradación de triptófano, respecto a pacientes sin diabetes; pero también acompañada de una disminución de actividad

de los genes microbianos relacionados con la degradación de los aminoácidos treonina o arginina. Se desconoce que implicaciones pueden generar en el huésped, aunque la presencia incrementada de triptófano en el lumen intestinal puede dar lugar a la formación de indol y sus derivados gracias a la acción de microbiota. El indol mejora la inflamación intestinal y estimula la producción de GLP1, además, los derivados de indol, como el ácido indol-3-propiónico poseen efectos beneficiosos sobre diabetes y enfermedades metabólicas protegiendo la permeabilidad intestinal y modulación de la respuesta inmune de la mucosa²¹⁹. En nuestro análisis funcional de los intolerantes a metformina destaca la baja actividad de rutas relacionadas con la síntesis de aminas o poliaminas; los cuales son compuestos derivados de los aminoácidos y darán lugar a la producción de hormonas o neurotransmisores que pueden interactuar a nivel gastrointestinal. Sobre el metabolismo de los aminoácidos, el trabajo *Wu et al* observó que metformina actuaba enriquecimiento las rutas relacionadas con el metabolismo de los aminoácidos a los dos y cuatro meses de tratamiento²⁴⁸. Además, este aumento de actividad de las rutas metabólicas de los aminoácidos se mantiene incluso al comparar pacientes con DM2 en tratamiento de larga data con metformina y pacientes en situación de prediabetes²¹⁷. Consecuentemente, podríamos hipotetizar que el tratamiento con metformina favorece la actividad de rutas metabólicas de biosíntesis de aminoácidos simulando a la situación de población sin diabetes.

En el metabolismo lipídico hay un incremento de la síntesis de LPS entre los DM2 con metformina en comparación con los intolerantes a metformina y controles. El grupo de *Forslund et* considera que metformina podría reducir la absorción de LPS mediante el incremento de la presencia de butirato y propionato²¹⁹. No obstante, hay datos de otros trabajos donde se ha visualizado un aumento de las vías de producción de LPS en presencia de metformina tanto en pacientes sanos como diabéticos^{217 248 289}. Tradicionalmente, el LPS derivado de microbiota intestinal se ha considerado como uno de los principales factores involucrados en el inicio y progresión de la inflamación sistémica y enfermedades metabólicas. Sin embargo, en los últimos años se han publicado varios trabajos dónde se ha evaluado la acción de LPS como silenciador de la respuesta inmune a través de la señalización de TLR4. Los miembros del orden de los *Bacteroidales* son bacterias gram negativas dominantes en el microbioma intestinal humano y poseen la capacidad de producir formas antagónicas de LPS, impulsando el silenciamiento inmune para el resto de la comunidad microbiana³¹⁰. En cambio, los LPS derivados de *E. Coli* contienen la capacidad de generar una cascada inflamatoria mediadas por las citocinas dependientes de NFκB (IL-10, TNFα, IL-1β e IL-6)²⁸². Por lo tanto, en lugar de sólo evaluar la mera cantidad de periférica de LPS procedente del microbioma se necesita hacer hincapié en la naturaleza y composición de los diferentes subtipos de LPS; que parecen determinar el nivel de activación inmune desencadenada mediada por microbiota intestinal. En el análisis de las vitaminas más expresadas comparativamente entre los grupos destaca la presencia de aumento de actividad de las rutas relacionadas con la producción de vitamina K1 (filoquinona) o vitamina K2 (menaquinona) a nivel de DM2 con metformina. La vitamina K pertenece a la familia de las vitaminas liposolubles y la conforman dos subtipos biológicamente activos, que son la filoquinona, más abundante a nivel de los vegetales o la menaquinona presente en huevos, carnes y quesos. A su vez, la menaquinona está compuesta por catorce componentes, los más comunes son la menaquinona 4 o menaquinona 7.

Tanto la ubiquinona como la menaquinona son portadores de electrones liposolubles en las membranas celulares y son esenciales para la respiración celular. Las células eucariotas pueden sintetizar ubiquinona, pero no menaquinona, mientras que los procariontes pueden sintetizar ambas. La importancia de menaquinona a nivel metabólico radica en que se le atribuyen propiedades beneficiosas como son la mejora de la insulinoresistencia o la posible reducción de riesgo de aparición de DM2 mediado por propiedades antiinflamatorias o disminución de la producción de TG³¹¹. Por otro lado, la influencia de las quinonas es determinante en el metabolismo microbiano para la producción de energía o la utilización de sustratos como el carbono, nitrógeno y de biosíntesis de compuestos indispensables. Además, la vitamina K es cofactor enzimático de γ -glutamyl carboxilasa que es esencial para la conversión de glutamato a su metabolito residual, γ -carboxi glutamato³¹². Por lo tanto, la capacidad de microbiota intestinal para sintetizar o reutilizar quinonas puede determinar su crecimiento y replicación a nivel de la simbiosis con el huésped. La acción de metformina parece favorecer un metabolismo energético más eficiente en microbiota intestinal comensal. Asimismo, los niveles de cianocobalamina en el análisis funcional de microbiota fueron superiores entre los DM2 con metformina en contraste con los intolerantes; que arrojaron menor actividad de esta ruta. Las cobalaminas son sintetizadas en su integridad por los organismos procariontes, es decir, son sintetizadas por algunos microbios intestinales. El mayor sustrato biodisponible de las cobalaminas en los humanos se obtiene por la dieta y pueden contribuir en la configuración de la estructura y/o función de las comunidades microbianas intestinales humanas. En situación de colonización por *Helicobacter Pylori* se ha observado que los cambios subyacentes en microbiota intestinal conllevaron a una reducción de las rutas relacionadas con la síntesis de cianocobalamina³¹³. Esta situación hace dilucidar que en presencia de disbiosis intestinal se favorece la reducción de cianocobalamina en microbiota intestinal. En nuestro trabajo los intolerantes a metformina fueron los que determinaron niveles más inferiores de rutas relacionadas con biosíntesis de cianocobalamina. Por otro lado, destaca entre DM2 con metformina la mayor actividad de rutas relacionadas con la biosíntesis del grupo hemo o metabolismo de las porfirinas. La evidencia científica previa considera que el tratamiento con metformina presenta la capacidad de regular genes relacionados con la síntesis de metaloproteínas o transporte de metales en la microbiota intestinal del huésped²⁴⁸.

En el análisis de PICRUSt por parejas se obtuvieron una mayor predominancia de vías de degradación entre los intolerantes a metformina respecto a los DM2 con metformina. Concretamente, están incrementadas las vías de degradación de aminoácidos aromáticos entre los intolerantes a metformina. A su vez, desarrollaron menor actividad de las vías de síntesis de azúcares y mevalonato; más predominantes en los DM2 con metformina. Esta predominancia de vías de degradación y asimilación se mantuvo en el análisis comparativo con el grupo control, donde continuamos observamos una mayor degradación de azúcares como sucrosa, ramnosa, glucoronidos o fructosa. Asimismo, se presenta un detrimento de las vías de biosíntesis de los sustratos energéticos como nucleótidos, aminoácidos (treonina) o SCFAs. Las implicaciones en el huésped en el incremento de las rutas de degradación o asimilación en pacientes intolerantes a metformina precisarán de nuevos trabajos para determinar su rol dentro del huésped.

En líneas generales se presupone que el desarrollo de microbiota intestinal que presente alta actividad del catabolismo proteico conllevará a connotaciones negativas, puesto que habrá mayor contenido de productos de desecho como fenoles, sulfuros o amonio. En otros estudios anteriores se ha observado que la situación de diabetes proporciona una disminución de rutas metabólicas a nivel de microbiota intestinal. En un estudio previo llevado a cabo en pacientes con enfermedad cardiovascular establecida, al comparar la presencia o ausencia de DM2 se observó que había una mayor depleción de genes encargados del metabolismo de carbohidratos, lípidos, aminoácidos y energía en los sujetos con DM2³¹⁴. En el análisis funcional por pares los pacientes DM2 con metformina presentan un detrimento de algunas de las rutas de biosíntesis en relación con el grupo control. Asimismo, se observan una mayor degradación de azúcares o SCFAs entre los pacientes DM2 con metformina respecto a los controles sin diabetes. Sin embargo, a nivel de las rutas metabólicas de los aminoácidos en ambos grupos se observa un enriquecimiento de rutas de biosíntesis. En el caso de los DM2 con metformina hay enriquecimiento de la síntesis de triptófano o alanina, estos resultados se pueden relacionar con observado en el estudio de Forslund *et al*²¹⁹. Como se ha descrito previamente, hubo un descenso de las rutas de degradación de triptófano en sujetos con DM2 sin tratamiento con metformina, que parece revertirse con la exposición de metformina según nuestros resultados.

Las vías de producción de SCFAs, característicamente, se encuentran con mayor presencia a nivel del grupo control, en contraposición con los pacientes intolerantes a metformina, exhiben la menor actividad de rutas metabólicas productoras de SCFAs. Estos datos van en consonancia con la evidencia científica que propone a metformina como agente modulador de la ecología bacteriana, fomentando la presencia de bacterias productoras SCFAs, como *Shewanella*, *Lactobacillus*, *Arkkemansia*, *Prevotella*, *Blautia*, *Bidobacterium*, *Megasphaera* o *Butyrivibrio*²⁹⁸. La presencia de niveles superiores circulantes de SCFAs se asocia a numerosos beneficios para el huésped que van desde la protección contra cáncer colorrectal hasta la regulación del metabolismo energético mediante mecanismos reguladores del apetito o homeostasis de la glucosa. Generalmente, el filo *Firmicutes* y, especialmente, *Faecalibacterium*, *Roseburia*, y *Bifidobacterium*, producen butirato; mientras que *Bacteroidetes* producen acetato y propionato. Los SCFA modulan el metabolismo de los lípidos y la glucosa del huésped a través de receptores ligados a proteínas G (GPR41 y GPR43). Particularmente, el propionato es sustrato para la gluconeogénesis y reduce la lipogénesis inhibiendo la síntesis de ácidos grasos^{204 315}. Otro de sus potenciales beneficios es que su reducción a nivel colónica se ha asociado a presencia de diarrea. El mecanismo fisiológico por el que SCFAs protege de la diarrea es mediante la estimulación de la absorción de agua a nivel colónico a través del intercambio apical del sistema Na-H, SCFA-HCO₃ y Cl-SCFA²⁹³.

En última instancia, destaca una mayor actividad de vías metabólicas relacionadas con la biosíntesis de NAD⁺ y de la coenzima A (CoA) en microbiota de controles respecto a los diabéticos con metformina o intolerantes. En concreto, NAD⁺ es uno de los cofactores más importantes en las reacciones redox celulares de los organismos y, además, se encuentra involucrada en mecanismos de control epigenético que modulan el metabolismo y el envejecimiento. La CoA es un cofactor enzimático que regula diferentes reacciones enzimáticas implicadas en el metabolismo intermedio de la oxidación de los

ácidos grasos, carbohidratos y aminoácidos, así pues, se favorece un metabolismo microbiano más eficiente entre los controles. Las vías de oxidación de sulfuro y alcoholes están más representadas entre los controles sobre los intolerantes o diabéticos en tratamiento con metformina. La oxidación de alcoholes es un proceso de detoxificación que supone la conversión de SCFAs, aunque es menos eficiente para el huésped porque produce aldehídos como productos de degradación. En las rutas metabólicas predichas entre pacientes diabéticos en tratamiento con metformina se habían reportado datos de aumento de la capacidad de la reducción de sulfato o incremento de hidrógeno colónico, que no se ha podido corroborar en nuestra población a estudio. Las bacterias reductoras de sulfato son capaces de reducir el sulfato a sulfuro de hidrógeno gaseoso, pero necesitan utilizar equivalentes reductores como el lactato, piruvato, etanol, formiato, SCFAs y los aminoácidos^{142 219}. Los beneficios o perjuicios de la producción de hidrógeno de sulfuro es un tema controvertido. El exceso de producción de H₂S se ha relacionado con aparición de enfermedades inflamatorias intestinales en el huésped, sin embargo, puede ser beneficioso su presencia para las bacterias al aumentar la resistencia a los antibióticos y protegerlos de las especies reactivas de oxígeno.

Limitaciones del estudio

Hemos detectado las siguientes limitaciones:

1. Población muestral de reducido tamaño, si bien no hay trabajos previos realizados en sujetos con intolerancia a metformina.
2. No se realizó registro dietético durante la intervención
3. Nuestra población presentaba otras enfermedades metabólicas como sobrepeso u obesidad.
4. No se correlacionaron variables clínicas analíticas con los resultados taxonómicos o funcionales.
5. No se realizaron correlaciones con variables clínica-analíticas con los resultados taxonómicos o funcionales
6. Estudio no aleatorizado
7. La población de intervención pertenece a una única área sanitaria.

CONCLUSIONES

1. En caso de intolerancia gastrointestinal a metformina la administración del fármaco en dosis crecientes mitigará los síntomas en 1 de 4 pacientes.
2. La intolerancia gastrointestinal a metformina puede estar favorecida por biomarcadores presentes en microbiota intestinal del huésped, concretamente, *Subdoligranulum*, fue marcadamente superior en los sujetos intolerantes. En cambio, *Megamonas funiforme* fue un biomarcador predominante en los sujetos que no exhiben intolerancia gastrointestinal.
3. Los sujetos con intolerancia a metformina presentan un microbioma constituido por bacterias de mayor potencial patógeno e incremento de vías metabólicas relacionadas con las vías de asimilación/ degradación de azúcares y aminoácidos.
4. *Blautia spp* puede estar implicado en la tolerancia a metformina, pero aún queda por aclarar su asociación con las enfermedades metabólicas como la diabetes o la obesidad.
5. La abundancia relativa de *Ruminococcus gnavus*, patógeno relacionado con la presencia de enfermedades inflamatorias se reduce en presencia de tolerancia gastrointestinal a metformina.
6. Basalmente, los sujetos intolerantes a metformina presentan mayor actividad de vías metabólicas de degradación y los sujetos tolerantes a metformina presentan mayor actividad de vías metabólicas de síntesis. Después de la administración de metformina se observan cambios en dirección opuesta en las vías metabólicas respecto al punto basal, además de incremento de la biosíntesis de vitamina B entre los sujetos tolerantes a metformina.
7. La diabetes mellitus tipo 2 induce una situación de disbiosis intestinal que el tratamiento con metformina puede mitigar tanto mejorando la ecología bacteriana como induciendo cambios en la actividad de los genes microbianos: incremento de las vías productoras de menaquinonas, metabolismo de los aminoácidos o la producción de SCFAs.

ANEXO 1



Dra. Dña. Gloria Luque Fernández, Secretaria del CEI Provincial de Málaga

CERTIFICA:

Que en la sesión de CEI de fecha: 22/02/2018 ha evaluado la propuesta de D/Dña.: Araceli Muñoz Garach, referido a la Modificación del Proyecto de Investigación: "Cambios en la microbiota en pacientes con diabetes tipo " e intolerancia a metformina tras reintroducción de la misma".

Este Comité lo considera ética y metodológicamente correcto.

La composición del CEI en esta sesión es la siguiente:

- Dra. Marta Camacho Caro (UGC Ginecología)
- Dra. Paloma Campo Mozo (UGC Alegia)
- Dr. José C. Fernández García (UGC Endocrinología y Nutrición)
- Dra. Mª Victoria de la Torre Prados (UGC UMI)
- Dr. Andrés Fontalba Navas (UGC Salud Mental)
- D. Alfonso García Guerrero (UGC CS Colonia de Santa Inés)
- Dr. José L. Guerrero Orriach (UGC Anestesia y Reanimación)
- Dr. Ricardo Guijarro Merino (UGC M. Interna)
- Dr. Antonio López Téllez (Médico de Familia)
- Dra. Gloria Luque Fernández (Investigación)
- Dra. Mª Mercedes Márquez Castilla (Médico Familia)
- Dra. Cristobalina Mayorga Mayorga (Laboratorio)
- Dr. Francisco J. Mérida de la Torre (Laboratorio)
- Dr. Antonio Pérez Rielo (UGC UCI)
- D. Ramón Porras Sánchez (RRHH-Abogado)
- Dra. Mª Angeles Rosado Souvirón (UGC Farmacia)
- Dña. Virginia Salinas Pérez (UGCI Oncología-Enfermera)
- Dr. Benito Soriano Fernández (Médico Familia)

Lo que firmo en Málaga, a 16 de Marzo de 2018



Fdo.: Dra. Gloria Luque-Fernández
Secretaria del CEI



ANEXO 2

HOJA DE INFORMACIÓN AL PARTICIPANTE EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA Y CONSENTIMIENTO INFORMADO

Nombre y apellidos:

NHC:

Edad:

Sexo:

Teléfono de contacto:

TÍTULO DEL ESTUDIO: CAMBIOS EN LA MICROBIOTA EN PACIENTES CON DIABETES TIPO 2 E INTOLERANCIA A METFORMINA TRAS REINTRODUCCIÓN DE LA MISMA.

Investigadores principales: Dra. Araceli Muñoz Garach. FEA Endocrinología y Nutrición y Dra Cristina María Díaz Perdigones. MIR Endocrinología y Nutrición

Teléfono: 951 032 648 / 951 032 658.

UGC de Endocrinología y Nutrición. Hospital Universitario Virgen de la Victoria. Málaga.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

Su participación en este estudio es voluntaria y usted puede anular su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento sin tener que dar explicaciones y sin que por ello se altere su relación con el médico ni se produzca perjuicio en su tratamiento o en la atención que usted pueda necesitar. También debe saber que puede ser excluida del estudio si (el promotor) o los investigadores del estudio lo consideran oportuno. Su participación en el estudio no supondrá ningún gasto ni beneficio económico para usted.

DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

En los últimos años son muy numerosos los trabajos que han relacionado la microbiota intestinal con el desarrollo de enfermedades de alta prevalencia como son la diabetes tipo 2 y la obesidad. La obesidad por si misma se asocia con cambios en la composición de la microbiota intestinal con tendencia al sobrecrecimiento de microorganismos con una mayor eficiencia en la

obtención de la energía de la dieta. Son varios los mecanismos que relacionan la microbiota con la aparición de insulinoresistencia y diabetes, entre ellos destacan los cambios en la permeabilidad intestinal, endotoxemia, interrelación con ácidos biliares, cambios en la proporción de tejido adiposo marrón y efectos asociados al uso de fármacos como la metformina.

El objetivo de este estudio es estudiar la microbiota en pacientes con diabetes tipo 2 e intolerancia a metformina, en sujetos con diferente grado de obesidad con y sin síndrome metabólico.

Son pocos los trabajos que han relacionado los cambios en la microbiota asociados al tratamiento con metformina, la mediación más utilizada para la diabetes tipo 2. Sus resultados sugieren una mediación por parte de la metformina sobre la microbiota intestinal de forma parcial por sus efectos terapéuticos y en parte por sus efectos adversos. Aún se requiere mayor validación para establecer la causalidad y aclarar que mecanismos median en este proceso.

Para ello, analizaremos la flora intestinal en muestra de heces y determinaremos los niveles plasmáticos de glucosa, insulina y otras variables bioquímicas antes y a los 90 días de la reintroducción del tratamiento con metformina. De forma paralela a la toma de muestras se procederá a la recogida de datos antropométricos y clínicos, que se asociarán a sus muestras biológicas.

Excepcionalmente, y siempre que así lo autorice, se podría volver a contactar con usted para solicitar información adicional. Usted no será informado de los proyectos de investigación en los que se utilicen sus muestras, ni los investigadores informarán de los resultados de las pruebas genéticas a usted o a su médico, a menos que los resultados de las pruebas con su material biológico o derivado pudieran ayudarle a usted o a su médico a hacer algo para su salud o la salud de su familia.

PRIVACIDAD Y CONFIDENCIALIDAD

Sus datos serán tratados con la más absoluta confidencialidad según lo dispuesto en las leyes nacionales (LO15/1999, LGC5/2002 y por la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica) y europeas (95/46/CE). Dado que durante la realización de los proyectos de investigación se generará información genética sensible, estas leyes quieren ayudar a los investigadores a evitar accesos involuntarios a esta información que podrían exponer a los pacientes y a sus familias a efectos adversos económicos, legales, psicológicos, y/o sociales. De acuerdo a la LO15/1999, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de los datos, así como puede solicitar la destrucción de las muestras, para lo cual deberá dirigirse a investigador responsable del estudio, Dra. Araceli Muñoz Garach (FEA Endocrinología y Nutrición. Hospital Universitario Virgen de la Victoria de Málaga. Teléfono: 951 032 648 / 951 032 658).

Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código y sólo el investigador principal podrá relacionar dichos datos con usted y con su historia clínica.

Si se publican los resultados del estudio, sus datos personales no serán publicados y su identidad permanecerá anónima.

INFORMACIÓN SOBRE MUESTRAS BIOLÓGICAS

Se conservará una muestra de su sangre hasta que finalice el estudio. Se guardará congelada en la Unidad de Investigación del Hospital Virgen de la Victoria, donde será custodiada por los investigadores participantes en el estudio. El tubo que contiene esta sangre no lleva su nombre ni ninguna otra marca que la identifique. Únicamente un código que sólo el investigador principal del estudio, la Dra. Muñoz y la Dra Díaz conoce que pertenece a usted.

Si usted no desea participar más en el estudio y usted lo quiere así, todas sus muestras identificables, que hayan sido obtenidas exclusivamente para este estudio serán destruidas para evitar la realización de un nuevo análisis.

Antes de firmar, lea detenidamente el documento, haga todas las preguntas que considere oportunas, y si lo desea, consúltelo con todas las personas que considere necesario. En caso de duda debe dirigirse a la Dra. Muñoz Garach o la Dra Díaz.

MODELO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO POR ESCRITO

TÍTULO DEL ESTUDIO: CAMBIOS EN LA MICROBIOTA EN PACIENTES CON DIABETES TIPO 2 E INTOLERANCIA A METFORMINA TRAS REINTRODUCCIÓN DE LA MISMA.

Participante:

Yo (nombre y apellidos) _____

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con:

Dra. Araceli Muñoz Garach. FEA de Endocrinología y Nutrición.

Dra Cristina María Díaz Perdigones MIR Endocrinología y Nutrición

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1º Cuando quiera

2º Sin tener que dar explicaciones.

3º Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio a través de la firma de este consentimiento informado del que recibo una copia.

Málaga, a de de 2018

FIRMA DEL PARTICIPANTE

FIRMA DEL INVESTIGADOR

Aportación científica

Comunicaciones en congresos nacionales

Díaz –Perdigones, CM; Muñoz-Garach, Araceli; Cornejo-Pareja, Isabel María; Moreno-Indias, Isabel; Damas-Fuentes, Miguel; Tinahones-Madueño, Francisco José

En busca del origen de la intolerancia a metformina a través del estudio de la microbiota intestinal de pacientes con diabetes mellitus tipo 2

XVI Congreso Sociedad Española de Diabetes, Sevilla, 2019

Díaz- Perdigones, CM; Muñoz-Garach, Araceli; Moreno-Indias, Isabel; Mancha-Doblas, Isabel, Cornejo-Pareja, Isabel María y Tinahones-Madueño, Fco José

Metformina un viejo fármaco aún por descubrir: intolerancia gastrointestinal y microbiota

61º Congreso Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición, Bilbao, 2019

Díaz-Perdigones, CM; Moreno-Indias, Isabel; Muñoz-Garach, Araceli; Álvarez-Bermúdez, María Dolores, Mancha-Doblas, Isabel y Tinahones-Madueño, Fco José.

Microbiota intestinal y su posible interacción en la intolerancia a metformina

62º Congreso Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición, Sevilla, 2020

Comunicaciones en congresos internacionales

Microbiota changes in type 2 diabetes patients intolerant to metformin after drug reintroduction

Muñoz-Garach, Araceli; Díaz-Perdigones, CM, Moreno-Indias, IM; Molina-Vegas, María, Cornejo-Pareja, Isabel y Tinahones-Madueño, Fco José

Congress European Endocrinology, 2019

Publicaciones en revistas

Díaz-Perdigones, C. M., Muñoz-Garach, A., Álvarez-Bermúdez, M. D., Moreno-Indias, I. & Tinahones, F. J. Gut microbiota of patients with type 2 diabetes and gastrointestinal intolerance to metformin differs in composition and functionality from tolerant patients. *Biomed. Pharmacother.* **145**, (2022).

Muñoz-Garach, A., Diaz-Perdigones, C. & Tinahones, F. J. Gut microbiota and type 2 diabetes mellitus. *Endocrinol. y Nutr.* **63**, (2016).

BIBLIOGRAFÍA

1. Seino, Y. *et al.* Report of the committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus. *J. Diabetes Investig.* **1**, 212–228 (2010).
2. Of, D. & Mellitus, D. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* **37**, 81–90 (2014).
3. Weyer, C., Bogardus, C., Mott, D. M. & Pratley, R. E. The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* **104**, 787–794 (1999).
4. Tests, D. & Diabetes, F. O. R. 2. Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care* **38**, S8–S16 (2015).
5. ADA. Screening for Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* **26**, 1–4 (2003).
6. Goldenberg, R. & Punthakee, Z. Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes, Prediabetes and Metabolic Syndrome. *Can. J. Diabetes* **37**, 8–11 (2013).
7. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetesd2018. (2017). doi:10.2337/dc18-S002
8. Care, D. & Suppl, S. S. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2020. *Diabetes Care* **43**, S14–S31 (2020).
9. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas, 9th edn. Brussels, Belgium. Atlas de la Diabetes de la FID* (2019).
10. Lopez-Bastida, J., Boronat, M., Moreno, J. O. & Schurer, W. Costs, outcomes and challenges for diabetes care in Spain. *Global. Health* **9**, 17 (2013).
11. Soriguer, F. *et al.* Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: The Di@bet.es Study. *Diabetologia* **55**, 88–93 (2012).
12. Cervero, P. B., Álvarez, E. D., Fernández, G. C. & Greñu, C. D. De. ORIGIN A LES Pre vale ncia de diabe te s me llitus e into le rancia a la gluco sa e n po blació n e ntre 3 0 y 7 5 año s e n As turias , Es paña. **202**, 421–427 (2010).
13. Rojo-Martínez, G. *et al.* Incidence of diabetes mellitus in Spain as results of the nation-wide cohort di@bet.es study. *Sci. Rep.* **10**, 1–9 (2020).
14. Animaw, W. & Seyoum, Y. Increasing prevalence of diabetes mellitus in a developing country and its related factors. *PLoS One* **12**, e0187670 (2017).
15. Ng, M., Fleming, T., Robinson, M., Thomson, B. & Graetz, N. Global, regional and national prevalence of overweight and obesity in children and adults 1980-2013: A systematic analysis.

- Lancet* **384**, 766–781 (2014).
16. Hammarström, A. & Annandale, E. A conceptual muddle: An empirical analysis of the use of ‘sex’ and ‘gender’ in ‘gender-specific medicine’ journals. *PLoS One* **7**, (2012).
 17. Kharroubi, A. T. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World J. Diabetes* **6**, 850 (2015).
 18. Lyssenko, V. *et al.* Clinical risk factors, DNA variants, and the development of type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* **359**, 2220–2232 (2009).
 19. Zeggini, E. & McCarthy, M. I. TCF7L2: The biggest story in diabetes genetics since HLA? *Diabetologia* **50**, 1–4 (2007).
 20. Villareal, D. T. *et al.* TCF7L2 variant rs7903146 affects the risk of type 2 diabetes by modulating incretin action. *Diabetes* **59**, 479–485 (2010).
 21. Manuscript, A. Loss-of-function mutations in SLC30A8 protect against type 2 diabetes. *Nat Genet.* **46**, 357–363 (2014).
 22. The SIGMA (Slim Initiative in Genomic Medicine for the Americas) Type 2 Diabetes *et al.* Sequence variants in SLC16A11 are a common risk factor for type 2 diabetes in Mexico. *Nature* **506**, 97–101 (2014).
 23. Kwak, S. H. & Park, K. S. Recent progress in genetic and epigenetic research on type 2 diabetes. *Exp. Mol. Med.* **48**, e220-8 (2016).
 24. Care, D. & Suppl, S. S. 3. Prevention or Delay of Type 2 Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2020. *Diabetes Care* **43**, S32–S36 (2020).
 25. O’Connor, L. M. *et al.* Dietary dairy product intake and incident type 2 diabetes: A prospective study using dietary data from a 7-day food diary. *Diabetologia* **57**, 909–917 (2014).
 26. M., K. Y., G., D. & P., P. Effect of diet on type 2 diabetes mellitus: a review. *Diabetes. Metab. Res. Rev.* **30**, 24–33 (2013).
 27. Fox, C. S. *et al.* Update on prevention of cardiovascular disease in adults with type 2 diabetes mellitus in light of recent evidence: A scientific statement from the American Heart Association and the American diabetes association. *Diabetes Care* **38**, 1777–1803 (2015).
 28. Guasch-Ferré, M. *et al.* Olive oil intake and risk of cardiovascular disease and mortality in the PREDIMED Study. *BMC Med.* **12**, 1–11 (2014).
 29. DeFronzo, R. A. From the triumvirate to the ominous octet: A new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes* **58**, 773–795 (2009).
 30. Abdul-Ghani, M. A., Tripathy, D. & DeFronzo, R. A. Contributions of β -Cell Dysfunction and Insulin Resistance to the Pathogenesis of Impaired Glucose Tolerance and Impaired Fasting Glucose.

Diabetes Care **29**, 1130–1139 (2006).

31. Gerich, J. E. Role of the kidney in normal glucose homeostasis and in the hyperglycaemia of diabetes mellitus: Therapeutic implications. *Diabet. Med.* **27**, 136–142 (2010).
32. Dunning, B. E. & Gerich, J. E. The role of α -cell dysregulation in fasting and postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes and therapeutic implications. *Endocr. Rev.* **28**, 253–283 (2007).
33. Enhanced Skeletal Muscle for Effective Glucose Homeostasis. **121**, 133–163 (2014).
34. Alsahli, M. & Gerich, J. E. Renal glucose metabolism in normal physiological conditions and in diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **133**, 1–9 (2017).
35. Clore, J. N., Stillman, J. & Sugerman, H. Glucose-6-phosphatase flux in vitro is increased in type 2 diabetes. *Diabetes* **49**, 969 LP – 974 (2000).
36. Costes, S., Langen, R., Gurlo, T., Matveyenko, A. V. & Butler, P. C. β -Cell failure in type 2 diabetes: A case of asking too much of too few? *Diabetes* **62**, 327–335 (2013).
37. Alejandro, E. U., Gregg, B., Blandino-Rosano, M., Cras-Meneur, C. & Bernal-Mizrachi, E. Natural history of beta-cell adaptation and failure in type 2 diabetes. *Mol Asp. Med* **1**, 19–41 (2014).
38. Kahn, S. E., Cooper, M. E. & Del Prato, S. Pathophysiology and Treatment of Type 2 Diabetes: Perspectives on the past, present and future. *Lancet* **383**, 1068–1083 (2015).
39. Gromada, J., Franklin, I. & Wollheim, C. B. A-Cells of the Endocrine Pancreas: 35 Years of Research But the Enigma Remains. *Endocr. Rev.* **28**, 84–116 (2007).
40. Malenica, M. *et al.* Importance of inflammatory markers and IL-6 for diagnosis and follow up of patients with type 2 diabetes mellitus. *Med. Glas. (Zenica)*. **14**, 169–175 (2017).
41. Herder, C. & Brunner, E. Elevated Levels of the Anti-Inflammatory Interleukin-1 Receptor Antagonist Precede the Onset of Type 2 Diabetes The Whitehall II Study. *Diabetes Care* **32**, 421–423 (2009).
42. Liu, J. J. *et al.* Expression of the kynurenine pathway enzymes in the pancreatic islet cells. Activation by cytokines and glucolipototoxicity. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1852**, 980–991 (2015).
43. Maiese, K. New insights for oxidative stress and diabetes mellitus. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2015**, 46–49 (2015).
44. Back, S. & Kaufman, R. Endoplasmic reticulum stress and type 2 diabetes. *Annu. Rev. Biochem.* 767–793 (2012). doi:10.1146/annurev-biochem-072909-095555. Endoplasmic
45. Yu, C. *et al.* The orphan nuclear receptor NR4A1 protects pancreatic β -cells from endoplasmic reticulum (ER) stress-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* **290**, 20687–20699 (2015).

46. Yagihashi, S., Inaba, W. & Mizukami, H. Dynamic pathology of islet endocrine cells in type 2 diabetes: β -Cell growth, death, regeneration and their clinical implications. *J. Diabetes Investig.* **7**, 155–165 (2016).
47. Ebato, C. *et al.* Autophagy Is Important in Islet Homeostasis and Compensatory Increase of Beta Cell Mass in Response to High-Fat Diet. *Cell Metab.* **8**, 325–332 (2008).
48. Samuel, V. T. & Shulman, G. I. Mechanisms for insulin resistance: Common threads and missing links. *Cell* **148**, 852–871 (2012).
49. Cusi, K. *et al.* Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase – and MAP kinase – mediated signaling in human muscle. **105**, 311–320 (2000).
50. Zhou, Q. L. *et al.* Analysis of insulin signalling by RNAi-based gene silencing. *Biochem. Soc. Trans.* **32**, 817 LP – 821 (2004).
51. Madonna, R. & De Caterina, R. Atherogenesis and diabetes: Focus on insulin resistance and hyperinsulinemia. *Rev. Esp. Cardiol.* **65**, 309–313 (2012).
52. Garcia-guerra, L. *et al.* Role in Insulin Resistance and Obesity. *Diabetes* **59**, 2407–2417 (2010).
53. Shin, C. & Choi, D.-S. Essential Roles for the Non-Canonical I κ B Kinases in Linking Inflammation to Cancer, Obesity, and Diabetes. *Cells* **8**, 178 (2019).
54. Manuscript, A. & Inflammation, C. NIH Public Access. **38**, 872–878 (2012).
55. Medina-Gomez, G., Gray, S. & Vidal-Puig, A. Adipogenesis and lipotoxicity: role of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) and PPAR γ coactivator-1 (PGC1). *Public Health Nutr.* **10**, 1132–1137 (2007).
56. Onyango, A. N. The Contribution of Singlet Oxygen to Insulin Resistance. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, 1–14 (2017).
57. Weisberg, S. P. *et al.* Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* **112**, 1796–1808 (2003).
58. Martins, A. R. *et al.* Mechanisms underlying skeletal muscle insulin resistance induced by fatty acids : importance of the mitochondrial function. *Lipids Health Dis.* **11**, 30 (2012).
59. Trayhurn, P. Hypoxia and Adipocyte Physiology: Implications for Adipose Tissue Dysfunction in Obesity. *Annu. Rev. Nutr.* **34**, 207–236 (2014).
60. Messineo, S. *et al.* Cooperation between HMGA1 and HIF-1 contributes to hypoxia-induced VEGF and visfatin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* **7**, 1–9 (2016).
61. Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A. & Semenza, G. L. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**,

- 5510–5514 (1995).
62. Chang, Y. C., Hee, S. W., Hsieh, M. L., Jeng, Y. M. & Chuang, L. M. The role of organelle stresses in diabetes mellitus and obesity: Implication for treatment. *Anal. Cell. Pathol.* **2015**, (2015).
 63. David, J. A., Rifkin, W. J., Rabbani, P. S. & Ceradini, D. J. The Nrf2/Keap1/ARE Pathway and Oxidative Stress as a Therapeutic Target in Type II Diabetes Mellitus. *J. Diabetes Res.* **2017**, 4826724 (2017).
 64. Sivitz, W. I. & Yorek, M. A. Mitochondrial Dysfunction in Diabetes: From Molecular Mechanisms to Functional Significance and Therapeutic Opportunities. *Antioxid. Redox Signal.* **12**, 537–577 (2010).
 65. Patti, M.-E. & Corvera, S. The Role of Mitochondria in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes. *Endocr. Rev.* **31**, 364–395 (2010).
 66. Wang, C.-H. & Wei, Y.-H. Role of mitochondrial dysfunction and dysregulation of Ca²⁺ homeostasis in the pathophysiology of insulin resistance and type 2 diabetes. *J. Biomed. Sci.* **24**, 70 (2017).
 67. Ye, J. Role of Insulin in the Pathogenesis of Free Fatty Acid-Induced Insulin Resistance in Skeletal Muscle. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets* **7**, 65–74 (2007).
 68. Ye, J. Mechanisms of insulin resistance in obesity Jianping. *Front Med* **7**, 14–24 (2013).
 69. Reusch, J. E. B. & Manson, J. E. Management of Type 2 Diabetes in 2017. *Jama* **317**, 1015 (2017).
 70. Garber, A. J. *et al.* CONSENSUS STATEMENT BY THE AMERICAN ASSOCIATION OF CLINICAL ENDOCRINOLOGISTS AND AMERICAN COLLEGE OF ENDOCRINOLOGY ON THE COMPREHENSIVE TYPE 2 DIABETES MANAGEMENT ALGORITHM – 2017 EXECUTIVE SUMMARY. *Endocr. Pract.* **23**, 207–238 (2017).
 71. Evert, A. B. *et al.* Nutrition therapy recommendations for the management of adults with diabetes. *Diabetes Care* **36**, 3821–3842 (2013).
 72. Complications, R. Evidence-Based Nutrition Principles and Recommendations for the Treatment and NUTRITION THERAPY FOR. **26**, (2003).
 73. Barzilay, J. I. & Bush, M. A. DIABETES MANAGEMENT Comprehensive Diabetes. **21**, (2015).
 74. Garber, A. J., Abrahamson, M. J. & Barzilay, J. I. AACE / ACE Consensus Statement CONSENSUS STATEMENT BY THE AMERICAN ASSOCIATION OF CLINICAL ENDOCRINOLOGISTS AND AMERICAN COLLEGE OF ENDOCRINOLOGY ON THE COMPREHENSIVE TYPE 2 DIABETES MANAGEMENT ALGORITHM – 2017 EXECUTIVE SUMMARY. **23**, 207–238 (2017).
 75. King, P., Peacock, I. & Donnelly, R. The UK prospective diabetes study (UKPDS): clinical and

- therapeutic implications for type 2 diabetes. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **48**, 643–8 (1999).
76. Bailey, C. J. Metformin: Effects on Micro and Macrovascular Complications in Type 2 Diabetes. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **22**, 215–224 (2008).
 77. Matthews, D. R. & Neil, H. A. W. 10-Year Follow-up of Intensive Glucose Control in Type 2 Diabetes. (2008).
 78. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). *Lancet* **352**, 854–865 (2017).
 79. Marín-Peñalver, J. J., Martín-Timón, I., Sevillano-Collantes, C. & Cañizo-Gómez, F. J. del. Update on the treatment of type 2 diabetes mellitus. *World J. Diabetes* **7**, 354 (2016).
 80. Sanchez-rangel, E. & Inzucchi, S. E. Metformin : clinical use in type 2 diabetes. 1586–1593 (2017). doi:10.1007/s00125-017-4336-x
 81. Garber, A. J. *et al.* Consensus statement by the American Association of clinical Endocrinologists and American College of Endocrinology on the comprehensive type 2 diabetes management algorithm - 2020 executive summary. *Diabetes Care* **26**, 107–139 (2021).
 82. Care, D. & Suppl, S. S. 9. Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment: Standards of Medical Care in Diabetes-2020. *Diabetes Care* **43**, S98–S110 (2020).
 83. Handelsman, Y. *et al.* AACE / ACE Guidelines AMERICAN ASSOCIATION OF CLINICAL ENDOCRINOLOGISTS AND AMERICAN COLLEGE OF ENDOCRINOLOGY – CLINICAL PRACTICE GUIDELINES FOR DEVELOPING A DIABETES MELLITUS COMPREHENSIVE CARE PLAN – 2015 AACE Task Force for Developing a Diabetes Compre. **21**, (2015).
 84. Moon, M. K. *et al.* Combination Therapy of Oral Hypoglycemic Agents in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes Metab. J.* **41**, 357 (2017).
 85. Abdul-Ghani, M. & DeFronzo, R. A. Is it time to change the type 2 diabetes treatment paradigm? Yes! GLP-1 ras should replace metformin in the type 2 diabetes algorithm. *Diabetes Care* **40**, 1121–1127 (2017).
 86. Thrasher, J. Pharmacologic Management of Type 2 Diabetes Mellitus : Available Therapies. *Am. J. Cardiol.* **120**, S4–S16 (2017).
 87. Jackson, C. C. *et al.* Diabetes Care in the School Setting : A Position Statement of the American Diabetes Association. **38**, 1958–1963 (2015).
 88. Tamez-Pérez, H. E., Gonzalez-Guajardo, E. E. & Tamez-Peña, A. L. Re: Consensus statement by the American association of clinical endocrinologists and American college of endocrinology on the comprehensive type 2 diabetes management algorithm - 2019 Executive summary. *Endocr.*

- Pract.* **25**, 622 (2019).
89. Thrasher, J. Pharmacologic Management of Type 2 Diabetes Mellitus : Available Therapies. *Am. J. Med.* **130**, S4–S17 (2017).
 90. The Treat-to-Target Trial. **26**, (2003).
 91. Suppl, S. S., Giugliano, D., Maiorino, M. I., Bellastella, G. & Esposito, K. Approaches to Glycemic Treatment . Sec . 7 . In Standards of Medical Care in Diabetes d 2016 . *Diabetes Care* 2016 ; **39**, 86–87 (2016).
 92. Francini, F. & Schinella, G. R. Natural Products for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus *. 975–994 (2015).
 93. Bailey, C. J. & Bailey, C. J. Metformin : historical overview. 1566–1576 (2017). doi:10.1007/s00125-017-4318-z
 94. Rena, G., Pearson, E. R. & Sakamoto, K. Molecular mechanism of action of metformin : old or new insights ? 1898–1906 (2013). doi:10.1007/s00125-013-2991-0
 95. Rena, G., Hardie, D. G. & Pearson, E. R. The mechanisms of action of metformin. 1577–1585 (2017). doi:10.1007/s00125-017-4342-z
 96. Liang, X. & Giacomini, K. M. Transporters Involved in Metformin Pharmacokinetics and Treatment Response. *J. Pharm. Sci.* **106**, 2245–2250 (2017).
 97. Ito, S. *et al.* Potent and Specific Inhibition of mMate1-Mediated Efflux of Type I Organic Cations in the Liver and Kidney by Pyrimethamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **333**, 341–350 (2010).
 98. Shikata, E. *et al.* Human organic cation transporter (OCT1 and OCT2) gene polymorphisms and therapeutic effects of metformin. *J. Hum. Genet.* **52**, 117 (2006).
 99. Shu, Y. *et al.* Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1 (OCT1) on metformin action. **117**, (2007).
 100. Graham, G. G. *et al.* Clinical Pharmacokinetics of Metformin. *Clin. Pharmacokinet.* **50**, 81–98 (2011).
 101. Marathe, P. H. *et al.* Effect of altered gastric emptying and gastrointestinal motility on metformin absorption. (2000).
 102. McCreight, L. J., Bailey, C. J. & Pearson, E. R. Metformin and the gastrointestinal tract. *Diabetologia* **59**, 426–435 (2016).
 103. Scheen, A. J. Will delayed release metformin provide better management of diabetes type 2? *Expert Opin. Pharmacother.* **17**, 627–630 (2016).

104. Song, R. Mechanism of metformin: A tale of two sites. *Diabetes Care* **39**, 187–189 (2016).
105. DeFronzo, R. A. *et al.* Once-daily delayed-release metformin lowers plasma glucose and enhances fasting and postprandial GLP-1 and PYY: results from two randomised trials. *Diabetologia* **59**, 1645–1654 (2016).
106. Owen, M. R., Doran, E. & Halestrap, A. P. complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. **614**, 607–614 (2000).
107. Violette, B. *et al.* Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clinical Science (London, England : 1979)* **122**, 253–270 (2012).
108. Mitochondrial, C., Unit, B., Trust, W., Building, M. R. C. & Road, H. Effects of metformin and other biguanides on oxidative phosphorylation in mitochondria. **487**, 475–487 (2014).
109. Fontaine, E., Ave, N., Rigoulet, M. & Leverve, X. Dimethylbiguanide Inhibits Cell Respiration via an Indirect Effect Targeted on the Respiratory Chain Complex I *. **275**, 223–228 (2000).
110. Drzewoski, A. S. and J. Molecular Action of Metformin in Hepatocytes: An Updated Insight. *Current Diabetes Reviews* **11**, 175–181 (2015).
111. Stephenne, X., Foretz, M. & Taleux, N. Metformin activates AMP-activated protein kinase in primary human hepatocytes by decreasing cellular energy status. 3101–3110 (2011). doi:10.1007/s00125-011-2311-5
112. Hawley, S. A. *et al.* Resource Use of Cells Expressing g Subunit Variants to Identify Diverse Mechanisms of AMPK Activation. *Cell Metab.* **11**, 554–565 (2010).
113. Zhang, C. *et al.* Letter Metformin Activates AMPK through the Lysosomal Pathway. *Cell Metab.* **24**, 521–522 (2016).
114. He, L. *et al.* Metformin and Insulin Suppress Hepatic Gluconeogenesis by Inhibiting cAMP Signaling Through Phosphorylation of CREB Binding Protein (CBP). **137**, 635–646 (2010).
115. Pawlyk, A. C., Giacomini, K. M., Mckee, C., Shuldiner, A. R. & Florez, J. C. Metformin Pharmacogenomics : Current Status and Future Directions. **63**, 2590–2599 (2014).
116. LaMoia, T. E. & Shulman, G. I. Cellular and Molecular Mechanisms of Metformin Action. *Endocr. Rev.* **42**, 77–96 (2021).
117. Madiraju, A. K. *et al.* HHS Public Access. **510**, 542–546 (2014).
118. Alshawi, A. & Agius, L. Low metformin causes a more oxidized mitochondrial NADH/NAD redox state in hepatocytes and inhibits gluconeogenesis by a redox-independent mechanism. *J. Biol. Chem.* **294**, 2839–2853 (2019).
119. Castro, M., Castillo, V., Ochoa, A. & Godínez, S. La Metformina Y Sus Aplicaciones Actuales En La

- Clínica. *Med Int Méx* **30**, 562–574 (2014).
120. West, J. B. Highlighted Topics. 2483–2489 (2000).
 121. Marek, B., Kajdaniuk, D., Rokicka, D., Szymborska-kajaneck, A. & Strojek, K. Metformin — a new old drug. **68**, 482–496 (2017).
 122. Zhou, G. *et al.* Role of AMP-Activated Protein Kinase in Mechanism of Metformin Action Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J. Clin. Invest.* **108**, 1167–1174 (2001).
 123. Care, D. & Suppl, S. S. 8. Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment: *Standards of Medical Care in Diabetes—2018.* *Diabetes Care* **41**, S73–S85 (2018).
 124. Schlender, L. *et al.* Efficacy and safety of metformin in the management of type 2 diabetes mellitus in older adults: a systematic review for the development of recommendations to reduce potentially inappropriate prescribing. *BMC Geriatr.* **17**, 227 (2017).
 125. Penfornis, A., Blicklé, J. F., Fiquet, B., Quéré, S. & Dejager, S. How are patients with type 2 diabetes and renal disease monitored and managed? Insights from the observational OREDIA study. *Vasc. Health Risk Manag.* **10**, 341–352 (2014).
 126. Heaf, J. Metformin in chronic kidney disease: Time for a rethink. *Perit. Dial. Int.* **34**, 353–357 (2014).
 127. Leung, A. A. *et al.* Risk of Heart Failure in Patients With Recent-Onset Type 2 Diabetes: Population-Based Cohort Study. *J. Card. Fail.* **15**, 152–157 (2009).
 128. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* **352**, 837–853 (2018).
 129. Eurich, D. T. *et al.* Comparative safety and effectiveness of metformin in patients with diabetes mellitus and heart failure systematic review of observational studies involving 34 000 patients. *Circ. Hear. Fail.* **6**, 395–402 (2013).
 130. McMurray, J. J. V. *et al.* ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart. *Eur. Heart J.* **33**, 1787–1847 (2012).
 131. Khan, R., Foster, G. R. & Chowdhury, T. A. Managing Diabetes in Patients with Chronic Liver Disease. *Postgrad. Med.* **124**, 130–137 (2012).
 132. Li, Y., Liu, L., Wang, B., Wang, J. & Chen, D. Metformin in non-alcoholic fatty liver disease: A

- systematic review and meta-analysis. *Biomed. reports* **1**, 57–64 (2013).
133. Gangopadhyay, K. K. & Singh, P. Consensus Statement on Dose Modifications of Antidiabetic Agents in Patients with Hepatic Impairment. *Indian J. Endocrinol. Metab.* **21**, 341–354 (2017).
134. Gilligan, M. Metformin and Vitamin B12 Deficiency. *Arch Intern Med* **162**, 484–485 (2002).
135. Khan, A., Shafiq, I. & Hassan Shah, M. Prevalence of Vitamin B12 Deficiency in Patients with Type II Diabetes Mellitus on Metformin: A Study from Khyber Pakhtunkhwa. *Cureus* **9**, e1577 (2017).
136. Olt, S. Investigation of the vitamin b12 deficiency with peripheral neuropathy in the type 2 diabetes mellitus using metformin. *North. Clin. Istanbul* **4**, 233–236 (2017).
137. Lalau, J.-D. Lactic Acidosis Induced by Metformin. *Drug Saf.* **33**, 727–740 (2010).
138. Defronzo, R., Fleming, G. A., Chen, K. & Bicsak, T. A. Metformin-associated lactic acidosis: Current perspectives on causes and risk. *Metabolism.* **65**, 20–29 (2016).
139. Bonnet, F. & Scheen, A. Understanding and overcoming metformin gastrointestinal intolerance. *Diabetes, Obesity and Metabolism* (2017). doi:10.1111/dom.12854
140. Hermans, M. P., Ahn, S. A. & Rousseau, M. F. What is the phenotype of patients with gastrointestinal intolerance to metformin? *Diabetes and Metabolism* **39**, 322–329 (2013).
141. Lee, H. Effect of Metformin on Metabolic Improvement and Gut Microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 5935–5943 (2014).
142. Cabreiro, F. Metformin Joins Forces with Microbes. *Cell Host Microbe* **19**, 1–3 (2016).
143. Pollak, M. The effects of metformin on gut microbiota and the immune system as research frontiers. *Diabetologia* 1662–1667 (2017). doi:10.1007/s00125-017-4352-x
144. Burton, J. H. *et al.* Addition of a Gastrointestinal Microbiome Modulator to Metformin Improves Metformin Tolerance and Fasting Glucose Levels. *J. Diabetes Sci. Technol.* **9**, 808–814 (2015).
145. Dujic, T. *et al.* Association of Organic Cation Transporter 1 With Intolerance to Metformin in Type 2 Diabetes: A GoDARTS Study. *Diabetes* **64**, 1786–1793 (2015).
146. Dujic, T., Zhou, K., Tavendale, R. & Palmer, P. C. N. A. Europe PMC Funders Group Effect of Serotonin Transporter 5HTTLPR Polymorphism on Gastrointestinal Intolerance to Metformin : A GoDARTS Study. **39**, 1896–1901 (2016).
147. Hoffmann, I. S., Roa, M., Torrico, F. & Cubeddu, L. X. Ondansetron and metformin-induced gastrointestinal side effects. *Am. J. Ther.* **10**, 447–451 (2003).
148. Padwal, R. S. *et al.* Effect of gastric bypass surgery on the absorption and bioavailability of metformin. *Diabetes Care* **34**, 1295–1300 (2011).

149. McCreight, L. J. *et al.* Pharmacokinetics of metformin in patients with gastrointestinal intolerance. *Diabetes, Obes. Metab.* **20**, 1593–1601 (2018).
150. Reasner, C. *et al.* The effect of initial therapy with the fixed-dose combination of sitagliptin and metformin compared with metformin monotherapy in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes, Obes. Metab.* **13**, 644–652 (2011).
151. Jabbour, S. & Ziring, B. Advantages of Extended-Release Metformin in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Postgrad. Med.* **123**, 15–23 (2011).
152. Tannock, G. W. New perceptions of the gut microbiota: Implications for future research. *Gastroenterol. Clin. North Am.* **34**, 361–382 (2005).
153. Selber-Hnativ, S. *et al.* Human Gut Microbiota: Toward an Ecology of Disease. *Front. Microbiol.* **8**, 1265 (2017).
154. Sirisinha, S. The potential impact of gut microbiota on your health: Current status and future challenges. *Asian Pacific J. Allergy Immunol.* **34**, 249–264 (2016).
155. Balzola, F., Bernstein, C., Ho, G. T. & Lees, C. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing: Commentary. *Inflamm. Bowel Dis. Monit.* **11**, 28 (2010).
156. Palmer, C., Bik, E. M., DiGiulio, D. B., Relman, D. A. & Brown, P. O. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol.* **5**, 1556–1573 (2007).
157. Dominguez-Bello, M. G. *et al.* Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 11971–11975 (2010).
158. Schwiertz, A. *et al.* Development of the intestinal bacterial composition in hospitalized preterm infants in comparison with breast-fed, full-term infants. *Pediatr. Res.* **54**, 393–399 (2003).
159. Le Hurou-Luron, I., Blat, S. & Boudry, G. Breast- v. formula-feeding: Impacts on the digestive tract and immediate and long-term health effects. *Nutr. Res. Rev.* **23**, 23–36 (2010).
160. Vaishampayan, P. A. *et al.* Comparative metagenomics and population dynamics of the gut microbiota in mother and infant. *Genome Biol. Evol.* **2**, 53–66 (2010).
161. Mitsuoka, T. Establishment of intestinal bacteriology. *Biosci. Microbiota, Food Heal.* **33**, 99–116 (2014).
162. Peterson, J. *et al.* The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res.* **19**, 2317–2323 (2009).
163. Nash, A. K. *et al.* The gut mycobiome of the Human Microbiome Project healthy cohort. *Microbiome* **5**, 153 (2017).
164. Harmsen, H. J. M. & de Goffau, M. C. The Human Gut Microbiota. in *Microbiota of the Human*

Body: Implications in Health and Disease (ed. Schwartz, A.) 95–108 (Springer International Publishing, 2016). doi:10.1007/978-3-319-31248-4_7

165. Bik, E. M. *et al.* Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 732–7 (2006).
166. Pei, Z. *et al.* Bacterial biota in the human distal esophagus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 4250–4255 (2004).
167. Hayashi, H., Takahashi, R., Nishi, T., Sakamoto, M. & Benno, Y. Molecular analysis of jejunal, ileal, caecal and rectosigmoidal human colonic microbiota using 16S rRNA gene libraries and terminal restriction fragment length polymorphism. *J. Med. Microbiol.* **54**, 1093–1101 (2005).
168. Arumugam, M. *et al.* Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* **473**, 174–180 (2013).
169. Gail A. Cresci. The Gut Microbiome: What we do and don't know. *Nutr Clin Med* **176**, 139–148 (2016).
170. Durbán, A. *et al.* Assessing Gut Microbial Diversity from Feces and Rectal Mucosa. *Microb. Ecol.* **61**, 123–133 (2011).
171. Cornejo-Pareja, I., Muñoz-Garach, A., Clemente-Postigo, M. & Tinahones, F. J. Importance of gut microbiota in obesity. *Eur. J. Clin. Nutr.* **72**, 26–37 (2019).
172. Brown, K., DeCoffe, D., Molcan, E. & Gibson, D. L. Diet-induced dysbiosis of the intestinal microbiota and the effects on immunity and disease. *Nutrients* **4**, 1095–1119 (2012).
173. Requena, T., Martínez-Cuesta, M. C. & Peláez, C. Diet and microbiota linked in health and disease. *Food Funct.* (2018). doi:10.1039/C7FO01820G
174. Festi, D. *et al.* Gut microbiota and metabolic syndrome. *World J. Gastroenterol.* **20**, 16079–16094 (2014).
175. Voreades, N., Kozil, A. & Weir, T. L. Diet and the development of the human intestinal microbiome. *Front. Microbiol.* **5**, 1–9 (2014).
176. Shen, W., Gaskins, H. R. & McIntosh, M. K. Influence of dietary fat on intestinal microbes, inflammation, barrier function and metabolic outcomes. *J. Nutr. Biochem.* **25**, 270–280 (2014).
177. Flandroy, L. *et al.* The impact of human activities and lifestyles on the interlinked microbiota and health of humans and of ecosystems. *Sci. Total Environ.* **627**, 1018–1038 (2018).
178. Cani, P. D. & Everard, A. Talking microbes: When gut bacteria interact with diet and host organs. *Mol. Nutr. Food Res.* **60**, 58–66 (2016).
179. Etxeberria, U. *et al.* Impact of Polyphenols and Polyphenol-Rich Dietary Sources on Gut Microbiota Composition. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 9517–9533 (2013).

180. Yang, B. G., Hur, K. Y. & Lee, M. S. Alterations in gut microbiota and immunity by dietary fat. *Yonsei Med. J.* **58**, 1083–1091 (2017).
181. Barko, P. C., McMichael, M. A., Swanson, K. S. & Williams, D. A. The Gastrointestinal Microbiome: A Review. *J. Vet. Intern. Med.* 9–25 (2017). doi:10.1111/jvim.14875
182. Jackson, M. *et al.* Signatures of early frailty in the gut microbiota. *Genome Med.* **8**, 1–11 (2016).
183. García-Peña, C., Álvarez-Cisneros, T., Quiroz-Baez, R. & Friedland, R. P. Microbiota and Aging. A Review and Commentary. *Arch. Med. Res.* (2018). doi:10.1016/j.arcmed.2017.11.005
184. Thursby, E. & Juge, N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem. J.* **474**, 1823–1836 (2017).
185. Korpela, K. *et al.* Intestinal microbiome is related to lifetime antibiotic use in Finnish pre-school children. *Nat. Commun.* **7**, 1–8 (2016).
186. Gomaa, E. Z. Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *Antonie Van Leeuwenhoek* **113**, 2019–2040 (2020).
187. Stearns, J. C. *et al.* Ethnic and diet-related differences in the healthy infant microbiome. *Genome Med.* **9**, 1–12 (2017).
188. Deschasaux, M. *et al.* Depicting the composition of gut microbiota in a population with varied ethnic origins but shared geography. *Nat. Med.* **24**, 1526–1531 (2018).
189. Mayneris-Perxachs, J. *et al.* Gut microbiota steroid sexual dimorphism and its impact on gonadal steroids: Influences of obesity and menopausal status. *Microbiome* **8**, 1–15 (2020).
190. Illiano, P., Brambilla, R. & Parolini, C. *The mutual interplay of gut microbiota, diet and human disease. FEBS Journal* **287**, (2020).
191. Laparra, J. M. & Sanz, Y. Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. *Pharmacol. Res.* **61**, 219–225 (2010).
192. Flint, H. J., Duncan, S. H., Scott, K. P. & Louis, P. Links between diet, gut microbiota composition and gut metabolism. *Proc. Nutr. Soc.* **74**, 13–22 (2015).
193. Min, Y. W. & Rhee, P. L. The Role of Microbiota on the Gut Immunology. *Clin. Ther.* **37**, 968–975 (2015).
194. Faria, A. M. C., Reis, B. S. & Mucida, D. Tissue adaptation: Implications for gut immunity and tolerance. *J. Exp. Med.* **214**, 1211–1226 (2017).
195. Gopalakrishnan, V., Helmink, B. A., Spencer, C. N., Reuben, A. & Wargo, J. A. The Influence of the Gut Microbiome on Cancer, Immunity, and Cancer Immunotherapy. *Cancer Cell* **33**, 570–580 (2018).

196. Devaraj, S., Hemarajata, P. & Versalovic, J. The Human Gut Microbiome and Body Metabolism: Implications for Obesity and Diabetes. *Clin. Chem.* **59**, 617–628 (2014).
197. Khan, M. J., Gerasimidis, K., Edwards, C. A. & Shaikh, M. G. Role of Gut Microbiota in the Aetiology of Obesity: Proposed Mechanisms and Review of the Literature. *J. Obes.* **2016**, (2016).
198. Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S. & Gordon, J. I. Human gut microbes associated with obesity. *Nature* **444**, 1022 (2006).
199. Murphy, E. F. *et al.* Composition and energy harvesting capacity of the gut microbiota: relationship to diet, obesity and time in mouse models. *Gut* **59**, 1635 LP – 1642 (2010).
200. Marchesi, J. R. *et al.* The gut microbiota and host health: A new clinical frontier. *Gut* **65**, 330–339 (2016).
201. Ussar, S., Fujisaka, S. & Kahn, C. R. Interactions between host genetics and gut microbiome in diabetes and metabolic syndrome. *Mol. Metab.* **5**, 795–803 (2016).
202. Wikoff, W. R. *et al.* Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 3698–3703 (2009).
203. Abenavoli, L. *et al.* Gut microbiota and obesity: A role for probiotics. *Nutrients* **11**, 1–27 (2019).
204. Morrison, D. J. & Preston, T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes* **7**, 189–200 (2016).
205. de La Serre, C. B. *et al.* Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* **299**, G440–G448 (2010).
206. Hardie, D. G. & Pan, D. A. Regulation of fatty acid synthesis and oxidation by the AMP-activated protein kinase. *Biochem. Soc. Trans.* **30**, 1064 LP – 1070 (2002).
207. Gomes, A. C., Hoffmann, C. & Mota, J. F. The human gut microbiota: Metabolism and perspective in obesity. *Gut Microbes* **9**, 308–325 (2018).
208. Boutagy, N. E. *et al.* HHS Public Access. 11–20 (2017).
doi:10.1016/j.biochi.2015.06.020.Metabolic
209. Aguirre, M. & Venema, K. Does the Gut Microbiota Contribute to Obesity? Going beyond the Gut Feeling. *Microorganisms* **3**, 213–235 (2015).
210. Karlsson, F. H. *et al.* Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature* **498**, 99 (2013).
211. Larsen, N. *et al.* Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS One* **5**, (2010).

212. Zhang, X. *et al.* Human Gut Microbiota Changes Reveal the Progression of Glucose Intolerance. *PLoS One* **8**, (2013).
213. Sedighi, M. *et al.* Comparison of gut microbiota in adult patients with type 2 diabetes and healthy individuals. *Microb. Pathog.* **111**, 362–369 (2017).
214. Zhao, L. *et al.* Comprehensive relationships between gut microbiome and faecal metabolome in individuals with type 2 diabetes and its complications. *Endocrine* **66**, 526–537 (2019).
215. Karlsson, F. H. *et al.* Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature* **498**, 99–103 (2013).
216. Allin, K. H. *et al.* Aberrant intestinal microbiota in individuals with prediabetes. doi:10.1007/s00125-018-4550-1
217. Chávez-Carbajal, A. *et al.* Characterization of the gut microbiota of individuals at different T2D stages reveals a complex relationship with the host. *Microorganisms* **8**, (2020).
218. Gaike, A. H. *et al.* The Gut Microbial Diversity of Newly Diagnosed Diabetics but Not of Prediabetics Is Significantly Different from That of Healthy Nondiabetics. *mSystems* **5**, (2020).
219. Forslund, K. *et al.* Disentangling the effects of type 2 diabetes and metformin on the human gut microbiota. *Nature* **528**, 262–266 (2015).
220. Cunningham, A. L., Stephens, J. W. & Harris, D. A. Gut microbiota influence in type 2 diabetes mellitus (T2DM). *Gut Pathog.* **13**, 1–13 (2021).
221. Cani, P. D., Bibiloni, R., Knauf, C., Neyrinck, A. M. & Delzenne, N. M. Changes in gut microbiota control metabolic diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* **57**, 1470–81 (2008).
222. Tanti, J. F., Ceppo, F., Jager, J. & Berthou, F. Implication of inflammatory signaling pathways in obesity-induced insulin resistance. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **3**, 1–15 (2013).
223. Amar, J. *et al.* Involvement of tissue bacteria in the onset of diabetes in humans: evidence for a concept. *Diabetologia* **54**, 3055–3061 (2011).
224. Suárez-Zamorano, N. *et al.* Microbiota depletion promotes browning of white adipose tissue and reduces obesity. *Nat. Med.* **21**, 1497–1501 (2015).
225. Chiang, J. Y. Recent advances in understanding bile acid homeostasis. *F1000Research* **6**, 2029 (2017).
226. Ridlon, J., Kang, D., Hylemon, P. & Bajaj, J. Bile acids and the Gut Microbiome. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **30**, 332–338 (2014).
227. Li, T. & Chiang, J. Y. L. Bile acids as metabolic regulators. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **31**, 159–165 (2015).

228. Ryan, P. M., Stanton, C. & Caplice, N. M. Bile acids at the cross-roads of gut microbiome-host cardiometabolic interactions. *Diabetol. Metab. Syndr.* **9**, 1–12 (2017).
229. Sonne, D. P. *et al.* Postprandial Plasma Concentrations of Individual Bile Acids and FGF-19 in Patients With Type 2 Diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **101**, 3002–3009 (2016).
230. Gérard, C. & Vidal, H. Impact of gut microbiota on host glycemic control. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **10**, 1–13 (2019).
231. Allin, K. H., Nielsen, T. & Pedersen, O. Mechanisms in endocrinology: Gut microbiota in patients with type 2 diabetes mellitus. *Eur. J. Endocrinol.* **172**, R167–R177 (2015).
232. Larraufie, P. *et al.* SCFAs strongly stimulate PYY production in human enteroendocrine cells. *Sci. Rep.* **8**, 74 (2018).
233. Lyu, M. *et al.* Balancing herbal medicine and functional food for prevention and treatment of cardiometabolic diseases through modulating gut microbiota. *Front. Microbiol.* **8**, (2017).
234. Puddu, A., Sanguineti, R., Montecucco, F. & Viviani, G. L. Evidence for the gut microbiota short-chain fatty acids as key pathophysiological molecules improving diabetes. *Mediators Inflamm.* **2014**, (2014).
235. Serena, C. *et al.* Elevated circulating levels of succinate in human obesity are linked to specific gut microbiota. *ISME J.* **12**, 1642–1657 (2018).
236. Hooda, S., Vester Boler, B. M., Kerr, K. R., Dowd, S. E. & Swanson, K. S. The gut microbiome of kittens is affected by dietary protein:carbohydrate ratio and associated with blood metabolite and hormone concentrations. *Br. J. Nutr.* **109**, 1637–1646 (2013).
237. Grasset, E. *et al.* A Specific Gut Microbiota Dysbiosis of Type 2 Diabetic Mice Induces GLP-1 Resistance through an Enteric NO-Dependent and Gut-Brain Axis Mechanism. *Cell Metab.* **25**, 1075-1090.e5 (2017).
238. Parnell, J. A. & Reimer, R. A. Weight loss during oligofructose supplementation is associated with decreased ghrelin and increased peptide YY in overweight and obese adults. *Am. J. Clin. Nutr.* **89**, 1751–1759 (2009).
239. Hong, Y. H. *et al.* Acetate and propionate short chain fatty acids stimulate adipogenesis via GPCR43. *Endocrinology* **146**, 5092–5099 (2005).
240. Delzenne, N. M., Neyrinck, A. M. & Cani, P. D. Modulation of the gut microbiota by nutrients with prebiotic properties: Consequences for host health in the context of obesity and metabolic syndrome. *Microb. Cell Fact.* **10**, S10 (2011).
241. Shin, N.-R. *et al.* An increase in the *Akkermansia* spp. population induced

- by metformin treatment improves glucose homeostasis in diet-induced obese mice. *Gut* **63**, 727 LP – 735 (2014).
242. Bauer, P. V *et al.* Metformin Alters Upper Small Intestinal Microbiota that Impact a Glucose-SGLT1-Sensing Glucoregulatory Pathway. *Cell Metab.* **27**, 101-117.e5 (2018).
243. Lee, H. *et al.* Modulation of the gut microbiota by metformin improves metabolic profiles in aged obese mice. *Gut Microbes* 1–11 (2017). doi:10.1080/19490976.2017.1405209
244. Zhou, Z.-Y. *et al.* Metformin exerts glucose-lowering action in high-fat fed mice via attenuating endotoxemia and enhancing insulin signaling. *Acta Pharmacol. Sin. Acta Pharmacol. Sin. Acta Pharmacol. Sin.* **3721**, 1063–1075 (2016).
245. Zhang, X. *et al.* Modulation of gut microbiota by berberine and metformin during the treatment of high-fat diet-induced obesity in rats. *Sci. Rep.* **5**, 14405 (2015).
246. Derrien, M., Belzer, C. & de Vos, W. M. Akkermansia muciniphila and its role in regulating host functions. *Microb. Pathog.* **106**, 171–181 (2017).
247. Mardinoglu, A., Boren, J. & Smith, U. Confounding Effects of Metformin on the Human Gut Microbiome in Type 2 Diabetes. *Cell Metab.* **23**, 10–12 (2016).
248. Wu, H. *et al.* Metformin alters the gut microbiome of individuals with treatment-naive type 2 diabetes, contributing to the therapeutic effects of the drug. *Nat. Publ. Gr.* **23**, (2017).
249. Montandon, S. A. & Jornayvaz, F. R. Effects of antidiabetic drugs on gut microbiota composition. *Genes (Basel)*. **8**, (2017).
250. Ma, W. *et al.* Metformin alters gut microbiota of healthy mice: Implication for its potential role in gut microbiota homeostasis. *Front. Microbiol.* **9**, 1–8 (2018).
251. Bryrup, T. *et al.* Metformin-induced changes of the gut microbiota in healthy young men: results of a non-blinded, one-armed intervention study. *Diabetologia* 1024–1035 (2019). doi:10.1007/s00125-019-4848-7
252. Elbere, I. *et al.* Association of metformin administration with gut microbiome dysbiosis in healthy volunteers. (2018). doi:10.1371/journal.pone.0204317
253. De La Cuesta-Zuluaga, J. *et al.* Metformin is associated with higher relative abundance of mucin-degrading akkermansia muciniphila and several short-chain fatty acid-producing microbiota in the gut. *Diabetes Care* **40**, 54–62 (2017).
254. Zhang, Q. & Hu, N. Effects of Metformin on the Gut Microbiota in Obesity and Type 2 Diabetes Mellitus. (2020). doi:10.2147/DMSO.S286430
255. Huang, F. *et al.* Anthropometric and metabolic improvements in human type 2 diabetes after

- introduction of an Okinawan-based Nordic diet are not associated with changes in microbial diversity or SCFA concentrations. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **69**, 729–740 (2018).
256. Rosario, D. *et al.* Understanding the representative gut microbiota dysbiosis in metformin-treated type 2 diabetes patients using genome-scale metabolic modelling. *Front. Physiol.* **9**, 775 (2018).
257. Louis, P. & Flint, H. J. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. 1–8 (2018). doi:10.1111/j.1574-6968.2009.01514.x
258. Brunkwall, L. & Orho-Melander, M. The gut microbiome as a target for prevention and treatment of hyperglycaemia in type 2 diabetes: from current human evidence to future possibilities. *Diabetologia* **60**, 943–951 (2017).
259. Foretz, M., Guigas, B. & Viollet, B. Understanding the glucoregulatory mechanisms of metformin in type 2 diabetes mellitus. *Nat. Rev. Endocrinol.* **15**, 569–589 (2019).
260. Bahne, E. *et al.* Involvement of glucagon-like peptide-1 in the glucose-lowering effect of metformin. *Diabetes, Obes. Metab.* **18**, 955–961 (2016).
261. Sillner, N., Walker, A., Koch, W., Witting, M. & Schmitt-Kopplin, P. Metformin impacts cecal bile acid profiles in mice. *J. Chromatogr. B* **1083**, 35–43 (2018).
262. Sun, L. *et al.* Gut microbiota and intestinal FXR mediate the clinical benefits of metformin. *Nat. Med.* **24**, 1919–1929 (2018).
263. Rodriguez, J., Hiel, S. & Delzenne, N. M. Metformin: old friend, new ways of action-implication of the gut microbiome? *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **21**, 294–301 (2018).
264. Hsu, P.-I. *et al.* Helicobacter pylori eradication with bismuth quadruple therapy leads to dysbiosis of gut microbiota with an increased relative abundance of Proteobacteria and decreased relative abundances of Bacteroidetes and Actinobacteria. *Helicobacter* **23**, e12498 (2018).
265. Shah, V. *et al.* Composition Diversity and Abundance of Gut Microbiome in Prediabetes and Type 2 Diabetes. *J. Diabetes Obes.* **2**, 108–114 (2015).
266. Balsega, A. & Gómez-Rodríguez, C. Diversidad alfa, beta y gamma: ¿cómo medimos diferencias entre comunidades biológicas? *Nov. Acta Científica Compostel.* **26**, 39–45 (2019).
267. Muñoz Pedrego, D. A. *et al.* An Increased Abundance of Clostridiaceae Characterizes Arthritis in Inflammatory Bowel Disease and Rheumatoid Arthritis: A Cross-sectional Study. *Inflamm. Bowel Dis.* **25**, 902–913 (2019).
268. Van Hul, M. *et al.* From correlation to causality: the case of Subdoligranulum. *Gut Microbes* **12**, 1–13 (2020).

269. Gurung, M. *et al.* Role of gut microbiota in type 2 diabetes pathophysiology. *EBioMedicine* **51**, 1–9 (2020).
270. Li, X. *et al.* Effects of whole milk supplementation on gut microbiota and cardiometabolic biomarkers in subjects with and without lactose malabsorption. *Nutrients* **10**, (2018).
271. Gomez, D. E., Arroyo, L. G., Costa, M. C., Viel, L. & Weese, J. S. Characterization of the Fecal Bacterial Microbiota of Healthy and Diarrheic Dairy Calves. *J. Vet. Intern. Med.* **31**, 928–939 (2017).
272. Li, L. *et al.* Gut microbes in correlation with mood: case study in a closed experimental human life support system. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* **28**, 1233–1240 (2016).
273. Wu, F. *et al.* *Phascolarctobacterium faecium* abundant colonization in human gastrointestinal tract. *Exp. Ther. Med.* **14**, 3122–3126 (2017).
274. Panasevich, M. R. *et al.* Gut microbiota are linked to increased susceptibility to hepatic steatosis in low-aerobic-capacity rats fed an acute high-fat diet. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **311**, G166–G179 (2016).
275. Mukhopadhyay, I. *et al.* A comprehensive evaluation of colonic mucosal isolates of *Sutterella wadsworthensis* from inflammatory bowel disease. *PLoS One* **6**, 1–10 (2011).
276. Sampaio, C. *et al.* Cooperating commensals restore colonization resistance to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Cell Host & Microbe* **155**, 1683–1695 (2015).
277. Label, O. & Trial, C. crossm Structural Alteration of Gut Microbiota during the Amelioration of Human Type 2 Diabetes with Hyperlipidemia by Metformin and a Traditional Chinese Herbal Formula : a. **9**, 1–12 (2018).
278. Nakajima, H. *et al.* The effects of metformin on the gut microbiota of patients with type 2 diabetes: A two-center, quasi-experimental study. *Life* **10**, 1–15 (2020).
279. Higuchi, B. S. *et al.* Intestinal dysbiosis in autoimmune diabetes is correlated with poor glycemic control and increased interleukin-6: A pilot study. *Front. Immunol.* **9**, 1689 (2018).
280. Kashtanova, D. A. *et al.* Gut microbiota in patients with different metabolic statuses: Moscow study. *Microorganisms* **6**, 1–9 (2018).
281. Leiva-Gea, I. *et al.* Gut microbiota differs in composition and functionality between children with type 1 diabetes and MODY2 and healthy control subjects: A case-control study. *Diabetes Care* **41**, 2385–2395 (2018).
282. Saad, M. J. A., Santos, A. & Prada, P. O. Linking Gut Microbiota and Inflammation to Obesity and

- Insulin Resistance. *Physiology* (2016). doi:10.1152/physiol.00041.2015
283. Ahmad, A. *et al.* Analysis of gut microbiota of obese individuals with type 2 diabetes and healthy individuals. *PLoS One* **14**, 1–15 (2019).
284. Henke, M. T. *et al.* Ruminococcus gnavus, a member of the human gut microbiome associated with Crohn's disease, produces an inflammatory polysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**, 12672–12677 (2019).
285. Bel, S. *et al.* Gut Microbiome Profiles Are Associated With Type 2 Diabetes in Urban Africans. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* | www.frontiersin.org **1**, 63 (2020).
286. Zhong, H. *et al.* Distinct gut metagenomics and metaproteomics signatures in prediabetics and treatment-naïve type 2 diabetics. *EBioMedicine* **47**, 373–383 (2019).
287. Forslund, K. *et al.* Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota. *Nature* **528**, 262–266 (2015).
288. Tremaroli, V. *et al.* Roux-en-Y Gastric Bypass and Vertical Banded Gastroplasty Induce Long-Term Changes on the Human Gut Microbiome Contributing to Fat Mass Regulation. *Cell Metab.* **22**, 228–238 (2015).
289. Elbere, I. *et al.* Baseline gut microbiome composition predicts metformin therapy short-term efficacy in newly diagnosed type 2 diabetes patients. *PLoS One* **15**, 1–19 (2020).
290. Turnbaugh, P. J. *et al.* The human microbiome project: exploring the microbial part of ourselves in a changing world. *Nature* **449**, 804–810 (2007).
291. Gold, E. B. *et al.* Phytoestrogen and fiber intakes in relation to incident vasomotor symptoms: Results from the Study of Women's Health Across the Nation. *Menopause* **20**, 308–314 (2013).
292. Johnson, E. L., Heaver, S. L., Walters, W. A. & Ley, R. E. Microbiome and metabolic disease: revisiting the bacterial phylum Bacteroidetes. *Journal of Molecular Medicine* **95**, 1 (2017).
293. Yue, S. J. *et al.* Berberine treatment-emergent mild diarrhea associated with gut microbiota dysbiosis. *Biomed. Pharmacother.* **116**, (2019).
294. Koo, S. H. *et al.* A pilot study to examine the association between human gut microbiota and the host's central obesity. *JGH Open* **3**, 480–487 (2019).
295. Benítez-Páez, A. *et al.* Depletion of Blautia Species in the Microbiota of Obese Children Relates to Intestinal Inflammation and Metabolic Phenotype Worsening. *mSystems* **5**, 1–13 (2020).
296. Brunkwall, L., Ericson, U., Nilsson, P. M., Orho-Melander, M. & Ohlsson, B. Self-reported bowel symptoms are associated with differences in overall gut microbiota composition and enrichment of Blautia in a population-based cohort. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 1–7 (2020).

doi:10.1111/jgh.15104

297. Feng, Z. *et al.* A human stool-derived *Bilophila wadsworthia* strain caused systemic inflammation in specific-pathogen-free mice. *Gut Pathog.* **9**, 1–10 (2017).
298. Lee, C. Bin, Chae, S. U., Jo, S. J., Jerng, U. M. & Bae, S. K. The relationship between the gut microbiome and metformin as a key for treating type 2 diabetes mellitus. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, (2021).
299. Ye, Z. *et al.* A metagenomic study of the gut microbiome in Behcet's disease. *Microbiome* **6**, 1–13 (2018).
300. Parker, B. J., Wearsch, P. A., Veloo, A. C. M. & Rodriguez-Palacios, A. The Genus *Alistipes*: Gut Bacteria With Emerging Implications to Inflammation, Cancer, and Mental Health. *Front. Immunol.* **11**, 1–15 (2020).
301. Ubeda, C. *et al.* Intestinal microbiota containing *Barnesiella* species cures vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* colonization. *Infect. Immun.* **81**, 965–973 (2013).
302. Lustgarten, M. S. Microbiota From High-Functioning Older Adults. 1–24 (2019).
doi:10.1016/j.exger.2019.110722.Muscle
303. Hills, R. D. *et al.* Gut microbiome: Profound implications for diet and disease. *Nutrients* **11**, 1–40 (2019).
304. Chen, Y. *et al.* Gut metagenomes of type 2 diabetic patients have characteristic singlenucleotide polymorphism distribution in *Bacteroides Coprocola*. *Microbiome* **5**, 1–7 (2017).
305. Wescombe, P. A., Hale, J. D. F., Heng, N. C. K. & Tagg, J. R. Developing oral probiotics from *Streptococcus salivarius*. *Future Microbiol.* **7**, 1355–1371 (2012).
306. Pianta, A. *et al.* Two rheumatoid arthritis-specific autoantigens correlate microbial immunity with autoimmune responses in joints. *J. Clin. Invest.* **127**, 2946–2956 (2017).
307. Tilg, H. & Moschen, A. R. Microbiota and diabetes: an evolving relationship. *Gut* **63**, 1513–1521 (2014).
308. Gutiérrez-Repiso, C. *et al.* Mucosa-associated microbiota in the jejunum of patients with morbid obesity: alterations in states of insulin resistance and metformin treatment. *Surg. Obes. Relat. Dis. Off. J. Am. Soc. Bariatr. Surg.* (2020). doi:10.1016/j.soard.2020.04.008
309. Qin, J. *et al.* A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* **490**, 55 (2012).
310. d'Hennezel, E., Abubucker, S., Murphy, L. O. & Cullen, T. W. Total Lipopolysaccharide from the Human Gut Microbiome Silences Toll-Like Receptor Signaling. *mSystems* **2**, (2017).

311. Li, Y., Chen, J. P., Duan, L. & Li, S. Effect of vitamin K2 on type 2 diabetes mellitus: A review. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **136**, 39–51 (2018).
312. Ravcheev, D. A. & Thiele, I. Genomic analysis of the human gut microbiome suggests novel enzymes involved in quinone biosynthesis. *Front. Microbiol.* **7**, 1–14 (2016).
313. Wang, D. *et al.* Alterations in the human gut microbiome associated with *Helicobacter pylori* infection. *FEBS Open Bio* **9**, 1552–1560 (2019).
314. Sanchez-Alcoholado, L. *et al.* Role of gut microbiota on cardio-metabolic parameters and immunity in coronary artery disease patients with and without type-2 diabetes mellitus. *Front. Microbiol.* **8**, 1–12 (2017).
315. Louis, P. & Flint, H. J. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environ. Microbiol.* **19**, 29–41 (2017).