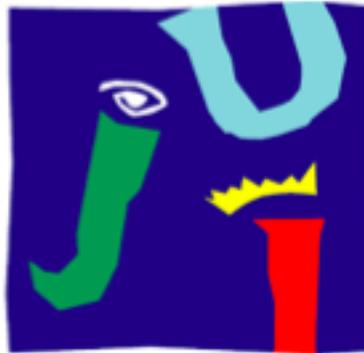


UNIVERSITAT JAUME I

TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN MEDICINA



**RELACIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL CON LA
DIABETES MELLITUS TIPO 2**

Revisión sistemática

Autora: Mireia Queralt Blanch

DNI: 46277432Y

Tutor: Juan Vicente Sánchez Andrés

Departamento: Medicina

Curso: 2021/2022

Tabla de contenido

<i>Tabla de contenido</i>	<i>II</i>
1. HOJA DE AUTORIZACIÓN	IV
2. ABREVIATURAS	V
3. RESUMEN	VI
3.1. Abstract	VI
4. EXTENDED SUMMARY	VII
4.1. Objectives.....	VII
4.2. Summary	VII
4.3. Systematic review	VIII
4.4. Conclusions.....	IX
5. INTRODUCCIÓN	1
5.1. Diabetes Mellitus.....	1
5.2. Microbiota intestinal	2
6. JUSTIFICACIÓN	4
6.1. Objetivos	4
7. METODOLOGÍA DE LA BÚSQUEDA	4
7.1. Bases de datos.....	4
7.2. Estrategia de búsqueda	5
7.3. Criterios de inclusión y exclusión	6
7.4. Selección de estudios y extracción de datos	7
7.5. Evaluación del riesgo de sesgo.....	8
8. RESULTADOS	10
8.1. Diagrama de flujo	10
8.2. Tabla de extracción de datos	11
8.3. Análisis de los estudios.....	17
9. DISCUSIÓN	24
10. CONCLUSIONES	33
11. AGRADECIMIENTOS	34
12. BIBLIOGRAFÍA- REFERENCIAS	35
13. MATERIAL SUPLEMENTARIO- ANEXOS	39

Índice de tablas y figuras

Tabla 1. Estrategia de búsqueda	6
Tabla 2. Evaluación del riesgo de sesgo	9
Tabla 3. Análisis de la literatura incluida en el estudio	17
Tabla 4. Evaluación individual del riesgo de sesgo de cada artículo incluido en el estudio	40
Figura 1. Diagrama de flujo	10
Figura 2. Proceso de desarrollo de DM.....	28

1. HOJA DE AUTORIZACIÓN



TRABAJO DE FIN DE GRADO (TFG) - MEDICINA

EL/LA PROFESOR/A TUTOR/A hace constar su **VISTO BUENO** para la Defensa Pública del Trabajo de Fin de Grado y **CERTIFICA** que el/la estudiante lo ha desarrollado a lo largo de 6 créditos ECTS (150 horas)

TÍTULO del TFG:

RELACIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL CON LA DIABETES MELLITUS

ALUMNA: Mireia Queralt Blanch

DNI: 46277432Y

PROFESOR TUTOR: Juan Vicente Sánchez Andrés

JUAN VICENTE|
SANCHEZ|
ANDRES

Firmado digitalmente por
JUAN VICENTE|SANCHEZ|
ANDRES
Fecha: 2022.06.28 15:40:35
+02'00'

Fdo (Tutor/a):

COTUTOR/A INTERNO/A (Sólo en casos en que el/la Tutor/a no sea profesor/a de la Titulación de Medicina):

Fdo (CoTutor/a interno):

2. ABREVIATURAS

- **4hbt**: 4-hydroxybenzoyl-CoA thioesterasa
- **ABC pathway**: ATP-binding cassette
- **AtoAD**: acetoacetyl-CoA transferase system
- **BaiB**: gen para la coenzima A ligasa
- **BCAA**: aminoácidos de cadena ramificada
- **BCDA**: 3 β -chenodeoxycholic acid
- **BCM**: Body Composition Monitor
- **BMI**: Índice de Masa Corporal
- **Buk**: butirato kinasa
- **But**: Butiril CoA acetatO- CoA- transferasa
- **DAO**: diamino oxidase
- **FFQ**: Food Frequency Questionnaire
- **FTI**: índice de tejido graso
- **GbcA**: glicina betaína monooxigenasa PAO1
- **GLP1**: glucagon-like peptide-1
- **HAAO**: 3-Hidroxiantranilato 3,4-dioxigenasa
- **HEI**: Healthy Eating Index
- **HOMA-B**: Función célula beta pancreática
- **HOMA-IR**: Homeostatic model assessment-insulin resistance
- **IFN γ** : Interferon gamma
- **IPA-Q**: International Physical Activity Questionnaire
- **KEGG**: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
- **LPS**: Lipopolisacáridos
- **LTI**: índice de tejido magro
- **NF- κ B**: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
- **OMS**: Organización Mundial de la Salud
- **PPAR- γ** : Peroxisomal proliferator activated receptors
- **SCFA**: Ácidos grasos de cadena corta
- **sPrC**: Small Proline-rich proteins
- **TLR**: Receptores Toll-Like
- **TMAO**: Trimethylamine N oxide
- **TNF- α** : Factor de necrosis tumoral α

3. RESUMEN

La Diabetes Mellitus es una enfermedad que afecta a la homeostasis de la glucosa. La tipo 2, más frecuente a nivel mundial (90%), se produce por una falta de producción o de efecto de la insulina. En el presente trabajo se intenta establecer la influencia de la microbiota sobre el desarrollo de la patología y encontrar las diferencias existentes entre la microbiota de enfermos y la microbiota en sanos. Se ha realizado una revisión en dos bases de datos diferentes, de la cual se han extraído 18 artículos que cumplieran con los criterios de inclusión y exclusión. Las conclusiones extraídas de la literatura seleccionada apuntan a una disbiosis y disminución de la diversidad de la microbiota en enfermos. El ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* está incrementado por lo general en pacientes diabéticos y obesos, y existe un notable descenso de las bacterias productoras de butirato. El aumento de endotoxemia (LPS) propicia la inflamación de base propia de esta enfermedad. No obstante, diferentes factores pueden influir en el resultado de estos estudios. Un ejemplo claro sería la metformina, tratamiento de primera línea de esta patología, que altera de forma clara las conclusiones acerca de la diversidad de la microbiota en diabéticos. Existen multitud de estudios en la actualidad sobre la microbiota; no obstante, la mayoría son de un bajo grado de evidencia, o presentan resultados contradictorios. Se concluye que, en esta cuestión, se requieren más estudios con un mayor grado de evidencia científica para poder aportar conclusiones válidas al respecto.

3.1. Abstract

Diabetes Mellitus is a pathology that affects glucose homeostasis. Type 2 is the most frequent one globally (90%), and it is caused by a lack of insulin production or action. This paper tries to establish the relation between microbiota and the diabetes, and determine the differences between patient's microbiota and non-patient's microbiota. A research has been done in two different databases, from which 18 articles have been selected, complying the inclusion and exclusion criteria. Conclusions from said articles point to a dysbiosis and a microbiota variability decrease in patients. *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio increases in obese diabetic

patients, and there is a marked decrease in butyrate-producing bacteria. The rise of endotoxemia (LPS) promotes underlying inflammation of the disease. Nowadays, there are quite a variety of studies about microbiota; however, most of them show a low grade of scientific evidence, or are contradictory. Nevertheless, many factors may influence the study's results. Metformin, the first-line treatment, would be a clear example because it alters conclusions about microbiota diversity in people with diabetes. It can be concluded that this issue needs a deeper study with more substantial scientific evidence to draw valid conclusions.

4. EXTENDED SUMMARY

4.1. Objectives

This work aims to investigate the influence of the microbiota on the development of type 2 diabetes mellitus and establish the differences between the patient's microbiota and the non-patient's microbiota.

4.2. Summary

Diabetes Mellitus is a metabolic disease that is increasing fast due to many factors concerning our day-to-day routines.

The adult incidence, according to the WHO, has been doubled globally. In 1980, prevalence numbers were around 4.7%; In 2014, they rose to 8.5%. Nowadays, 537 million adults live with this pathology around the world. It is expected to increase by 11.3% in 2030. Moreover, 541 million adults worldwide (10.6%), have impaired glucose tolerance, a risk factor to develop type 2 Diabetes.

This disease has become a public health problem due to its multiple associated complications and the morbidity and mortality that it entails.

Spain is the second country with the highest prevalence in Europe (14,8%); 5.1 million adults are diabetics, so its prevalence has been estimated to have increased by 42%. Furthermore, 30.3% (one third) are not diagnosed, which further increases costs because of a late diagnosis.

Type 2 diabetes (DMT2) is the most common type; 90% diabetics are this kind. It is caused by an intolerance to carbohydrates due to a decreased insulin sensitivity and a drop in insulin production. This hormone regulates the glucose homeostasis. The etiology is extremely diverse, with high importance of genetics, as well as environmental factors such as diet, age, exercise, obesity, and socioeconomic and demographic factors. Due to the current sedentary lifestyle and the diet quality, it is increasing also among children. Because they all are reversible factors, it is of great interest to look for new possible associated factors that could help prevent or change the course of this pathology.

Recent studies have stated a possible influence of the gut microbiota and its products on development of Diabetes mellitus. Its functions can be resumed in structural, immune system and metabolic, digesting and regulating nutrient absorption. The metabolism of indigestible fiber in gases, alcohols and short chain fatty acids (SCFA) is remarkable, those which regulate energy homeostasis and reduce local inflammation.

This complex ecosystem comprises bacteria, viruses, fungi and parasites. About bacteria, there are 150-170 different species; 90% dominated by the phylum *Firmicutes* and *Bacteroidetes*, and also others such as *Proteobacteria*, *Actinobacteria* and *Faecalibacteria*. These differences in bacterial concentrations can lead to the development of metabolic diseases, such as diabetes or obesity.

4.3. Systematic review

The present investigation is based on a review of gastrointestinal microbiota as a risk factor for the development of diabetes. This specific research has been made through two specialized databases such as PubMed and Web of Science, as other information tools such as Elsevier, WHO or SED. The keywords were *Diabetes Mellitus type 2*, *Microbiota*, *Gastrointestinal microbiota* and *Dysbiosis*. Moreover, we use some filters to narrow down the research and refine our results. Those being: studies published in last 10 years, and human studies.

- Inclusion criteria: Observational studies, diabetic patients, human studies, studies published in last 10 years, bacterial microbiota (changes in different species), adults and English or Spanish language.
- Exclusion criteria: Interventionist studies, systematic revisions, viral or fungi microbiota, oral or urine microbiota, metabolites studies.

4.4. Conclusions

Patients with Type 2 Diabetes are normally obese due to the pathogenesis of disease, because of an insulin resistance caused by adipose tissue, metabolic syndrome, etc. The *Firmicutes/ Bacteroidetes* ratio is increased in obese diabetic patients maybe because *Firmicutes* are related to nutrient transport and they use energy more effectively than *Bacteroidetes*, but this conclusion is still unclear. In the same way, those patients require the management of their pathology by antidiabetic drugs such as metformin. This drug is a clear confounder due to its ability to increase or decrease certain species of bacteria, but this is not entirely clear either. Many factors may influence the development of the disease, so its cause cannot be attributed only to a specific bacteria population. In general, the evidence about this question is contradictory so it is necessary to provide information through higher quality studies that may allow establishing a clear relationship between exposure and the developed pathology.

5. INTRODUCCIÓN

5.1. Diabetes Mellitus

La Diabetes Mellitus es una enfermedad metabólica que está aumentando a una velocidad vertiginosa debido a múltiples factores que, propiciados por el mundo actual, facilitan su aparición.

La incidencia de la diabetes en adultos, según la OMS, se ha duplicado a nivel mundial. En 1980 las cifras de prevalencia estaban en torno a un 4.7%; en 2014 ascendieron a 8.5%. En la actualidad, 537 millones de adultos de todo el mundo viven con la enfermedad. Se prevé que la cifra aumente a un 11.3% en 2030 y a un 12.2% en 2045. Además, 541 millones de adultos a nivel mundial, es decir, el 10,6% padecen intolerancia a la glucosa, lo que aumenta el riesgo de diabetes.

España es el segundo país con mayor prevalencia de diabetes en Europa, con unas cifras de 14.8%¹; 5.1 millones de adultos la padecen, por lo que se ha calculado que su prevalencia ha aumentado un 42% desde el 2019 al 2021. Esto significa que 1 de cada 7 adultos la padecen, por lo que el gasto sanitario que implica es considerable, alcanzando los 15.500 millones de dólares. Además, casi un tercio de las personas (30.3%) con la enfermedad no están diagnosticadas, lo que todavía acrecienta los costes debido a las complicaciones asociadas a un diagnóstico tardío.

La Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) es el tipo más frecuente de diabetes, siendo el 90% de la población diabética de este tipo ¹. Esta patología se produce por una intolerancia progresiva a los hidratos de carbono debido a, entre otros factores, una disminución de la efectividad de la insulina o una producción inadecuada de ésta. La función de esta hormona es la regulación de glucosa en sangre. La etiología es muy diversa, con gran cabida de la genética así como de la influencia de factores ambientales como la dieta, la edad, el ejercicio y el sedentarismo, la obesidad y los factores socioeconómicos y demográficos. Solía asociarse a la edad adulta pero,

debido al sedentarismo y a la dieta presentes en la actualidad, se está viendo con mayor asiduidad en niños.

Debido a sus múltiples complicaciones asociadas y la morbimortalidad que ello conlleva, esta enfermedad se ha convertido en un problema de salud pública. Los pacientes diabéticos tienen una esperanza de vida de 7 años menor que la población sana, así como un aumento de la edad vascular de hasta 15 años debido a la afectación de los vasos y nervios por la hiperglucemia mantenida. Esto supone mayor riesgo de enfermedad cardiovascular, neuropatías, retinopatías e insuficiencia renal. Debido a que son factores reversibles, es de gran interés el tratar de buscar nuevos posibles factores asociados que ayuden a prevenir o a cambiar el curso de la enfermedad.

5.2. Microbiota intestinal

En recientes estudios, se ha visto una posible influencia de la microbiota intestinal y sus productos en el desarrollo de la diabetes. La microbiota es el agregado de microorganismos que viven de forma fisiológica en el organismo. Actualmente, este conjunto está considerado como un órgano del cuerpo ². Las funciones de estas bacterias podrían resumirse a nivel estructural, protegiendo la barrera intestinal; ayudando y mejorando la función del sistema inmune; señalizando y conectando el sistema nervioso central con el tracto digestivo a través del sistema nervioso entérico; y a nivel metabólico, digiriendo y regulando la absorción de nutrientes. En este último plano, es destacable la metabolización de la fibra no digerible mediante distintos enzimas para la posterior utilización de los diferentes polisacáridos como fuente de carbono. El resultado es un conjunto de gases, alcoholes y ácidos grasos de cadena corta entre otros (SCFA'S; acetato, butirato y propionato), los cuales son absorbidos por el colon y regulan la homeostasis energética, además de reducir la inflamación localmente. Se ha visto que estos productos están relacionados directamente con el peso corporal, la

resistencia a la insulina, la actividad proinflamatoria y el metabolismo de ácidos biliares ³.

Gracias al cultivo de los microorganismos, el estudio de la microbiología ha sido posible durante décadas. Sin embargo, la metagenómica logra el estudio de un número mucho mayor de especies que no son cultivables mediante el estudio molecular del ADN. La subunidad 16 S del ARN ribosomal constituye la diana para la identificación del microorganismo. En el año 2008, se inició un proyecto a nivel internacional (iniciado por el Instituto Nacional de Salud), *The Human Microbiome Project*, cuya finalidad fue la descripción del genoma de la microbiota y la comprensión de su relación con las distintas enfermedades metabólicas. En 2013, la Unión Europea continuó el estudio mediante el proyecto “*MyNewGut*”.

En la actualidad, las técnicas moleculares de secuenciación masiva han permitido caracterizar este ecosistema con gran precisión. El método Sanger (de primera generación) fue sustituido por el de segunda por su mayor rendimiento, y este a la vez por el de tercera generación, todavía más detallado y revolucionario ⁴.

Este complejo ecosistema está formado por diferentes tipos de microorganismos; bacterias, virus, parásitos y hongos. Dentro de las bacterias, existen entre 150-170 especies diferentes ⁵; el 90% compuesto por el filo *Bacteroidetes* y *Firmicutes*, además de otros como *Proteobacteria*, *Actinobacteria* y *Faecalibacteria*. Las diferencias en el ratio de las distintas especies determinan el enterotipo, predispuesto genéticamente y modificado por factores como la dieta y el estilo de vida. El enterotipo 1 se caracteriza por la predominancia de *Bacteroides*; en el enterotipo 2 sobre todo existe el género *Prevotella* (ambos pertenecen al filo *Bacteroidetes*); el enterotipo 3 se basa en la familia *Ruminococcus* (pertenece al filo *Firmicutes*). El intestino se compone mayoritariamente por los géneros *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* y *Ruminococcus*, entre otros. Estas diferencias entre las concentraciones de las diferentes bacterias pueden propiciar diversas enfermedades metabólicas, como la diabetes o la obesidad.

6. JUSTIFICACIÓN

6.1. Objetivos

El objetivo general del presente trabajo de fin de grado es **indagar acerca de la influencia de la microbiota sobre el desarrollo de la diabetes mellitus 2 y establecer las diferencias existentes entre la microbiota de enfermos y la microbiota en sanos.**

Para conseguir el anterior objetivo general, se plantean ciertos objetivos específicos:

- Evaluar las diferencias de poblaciones de la microbiota entre individuos con la enfermedad e individuos sanos.
- Estudiar los diferentes productos de la microbiota intestinal y sus efectos endocrinológicos.
- Analizar su relación con enfermedades metabólicas (obesidad, síndrome metabólico).
- Establecer la relación de la microbiota sobre la intolerancia a la glucosa / resistencia a la insulina.
- Establecer posibles factores condicionantes (obesidad, metformina).

7. METODOLOGÍA DE LA BÚSQUEDA

7.1. Bases de datos

La actual revisión sistemática pretende aunar la información actualizada acerca de la relación entre la Diabetes Mellitus y los cambios en la microbiota gastrointestinal. Para ello, se ha realizado una búsqueda bibliográfica en dos bases de datos científicas, Pubmed y Web of Science, y se han empleado otras fuentes como Elsevier, la SED o la OMS.

7.2. Estrategia de búsqueda

Las palabras clave para esta búsqueda de artículos fueron: *Diabetes Mellitus, Type 2 (Mesh Terms), Microbiota (Mesh Terms), Gastrointestinal microbiome (Mesh Terms)* y *Dysbiosis (Mesh Terms)*.

La búsqueda se realizó a través de los términos MeSH (Medical Subject Headings) de Pubmed, empleando diferentes sinónimos de los dos temas principales con el booleano OR e incluyendo su búsqueda tanto en el título como en el abstract, para finalmente unir ambas materias mediante el booleano AND.

Se emplearon también dos filtros en dicha búsqueda para acotar un poco más el resultado; humanos y estudios publicados en los últimos 10 años, atendiendo a la actualización de las técnicas de secuenciación del microbioma (Next Generation Sequencing).

Así, la estrategia de búsqueda final sería la siguiente:

Base de datos	Búsqueda	Resultado sin filtros	Resultado con filtros
Pubmed	(((Microbiota [MeSH Terms]) OR (Microbiota [Title/Abstract])) OR (Gastrointestinal Microbiome [Title/Abstract])) OR (Dysbiosis [Title/Abstract]) AND (((Diabetes Mellitus, Type 2 [MeSH Terms]) OR (Diabetes Mellitus, Type 2 [Title/Abstract])) OR (Type 2 Diabetes [Title/Abstract])) OR (DM2 [Title/Abstract])) AND (((Microbiota [MeSH Terms]) OR (Microbiota	2052	1267

	[Title/Abstract]) OR (Gastrointestinal Microbiome [Title/Abstract]) OR (Dysbiosis [Title/Abstract])		
Web of Science (1517)	Microbiota (Publication/Source Titles) or Microbiota (title) or gastrointestinal microbiota (title) or dysbiosis (topic) AND Diabetes mellitus type 2 (Publication/Source Titles) or DM2 (topic) or Diabetes type 2 (topic) or type 2 diabetes (title)	340	250

Tabla 1. Estrategia de búsqueda

Con estos resultados, se decidió enfocar la búsqueda en los artículos de Pubmed y, aplicando los siguientes criterios de inclusión y exclusión, obtuvimos la estrategia definitiva que mencionamos a continuación.

7.3. Criterios de inclusión y exclusión

- Criterios de inclusión:
 - Estudios observacionales; transversales, de cohortes, casos y controles
 - Pacientes Diabéticos
 - Microbiota bacteriana: cambios en las diferentes poblaciones de bacterias
 - Estudios en humanos
 - Estudios en los últimos 10 años
 - Estudios en adultos (mayores de 18 años)

- Idioma inglés/ español
- Criterios de exclusión:
 - Estudios intervencionistas: ensayos clínicos
 - Revisiones sistemáticas, de opinión, revisiones narrativas, cartas al editor
 - Microbiota viral, fúngica...
 - Microbiota oral, vía urinaria, tópica...
 - Estudio de los diferentes metabolitos

7.4. Selección de estudios y extracción de datos

En un inicio, se obtuvieron 2392 estudios con los términos Mesh de las palabras clave. Aplicando las restricciones del tiempo de publicación (menos de 10 años) y de estudios en humanos, se localizaron 1517 artículos.

Mediante la lectura del título, y abstract si había cualquier duda, se descartaron 834 lecturas para poder obtener una investigación de mayor calidad que se ajustase a nuestros objetivos. Aplicando los criterios de inclusión y exclusión, el resultado pasó de 615 a 86 artículos.

Con la lectura completa de estos artículos, se eligieron 46 estudios. Puesto que el número seguía siendo elevado para poder realizar nuestro trabajo, decidimos acotar el objetivo a estudio en enfermos de Diabetes Mellitus, y excluir los estudios enfocados únicamente a pacientes resistentes a la insulina, con intolerancia a la glucosa o prediabéticos. Se descartaron los demás debido a múltiples razones; medición de la microbiota mediante muestra de sangre únicamente, estudio de obesidad, medición de metabolitos, estudio de prediabetes y resistencia a la insulina sin incluir a pacientes diabéticos...Una vez acotada la búsqueda, se seleccionaron 18 artículos; 9 de casos y controles y 9 transversales, que componen esta revisión sistemática.

7.5. Evaluación del riesgo de sesgo

Mediante la herramienta NOS (NewCastle Ottawa), evaluamos el riesgo de sesgo de nuestros artículos (detallado en anexos).

Artículos	Selección	Análisis NOS Comparabilidad	Exposición	Resultado
⁶ . Ahmad et al., 2019	*	*	***	5
⁷ . Z. Chen et al., 2021	****	**	**	8
⁸ . Chen et al., 2019	***	**	***	8
⁹ . Diener et al., 2021	***	**	*	6
¹⁰ . Doumatey et al., 2020	****	**	***	9
¹¹ . Kitten et al., 2021	*****	**	*	8
¹² . Kulkarni et al., 2021	***		***	6
¹³ . Li et al., 2020	*		**	3
¹⁴ . Maskarinec et al., 2021	****	**	***	9
¹⁵ . Navab-Moghadam et al., 2017)	***	**	***	8
¹⁶ . Sedighi et al., 2017	***	**	***	8

17. J. Wang et al., 2020	****	**	**	8
18. L. Wang et al., 2021	***	**	***	8
19. (X. Wang et al., 2017)	**		**	4
20. Wu et al., 2020	****	**	***	9
21. Zhang et al., 2021	****	*	***	8
22. X. Zhang et al., 2013	*****	**	***	10
23. X. Zhao et al., 2020)	*****		***	8

Tabla 2. Evaluación del riesgo de sesgo

➤ Leyenda:

- < 7= alto riesgo de sesgo
- >7= bajo riesgo de sesgo

8. RESULTADOS

8.1. Diagrama de flujo

A continuación, presentamos el diagrama de flujo, donde queda reflejado el proceso de búsqueda y la selección de artículos.

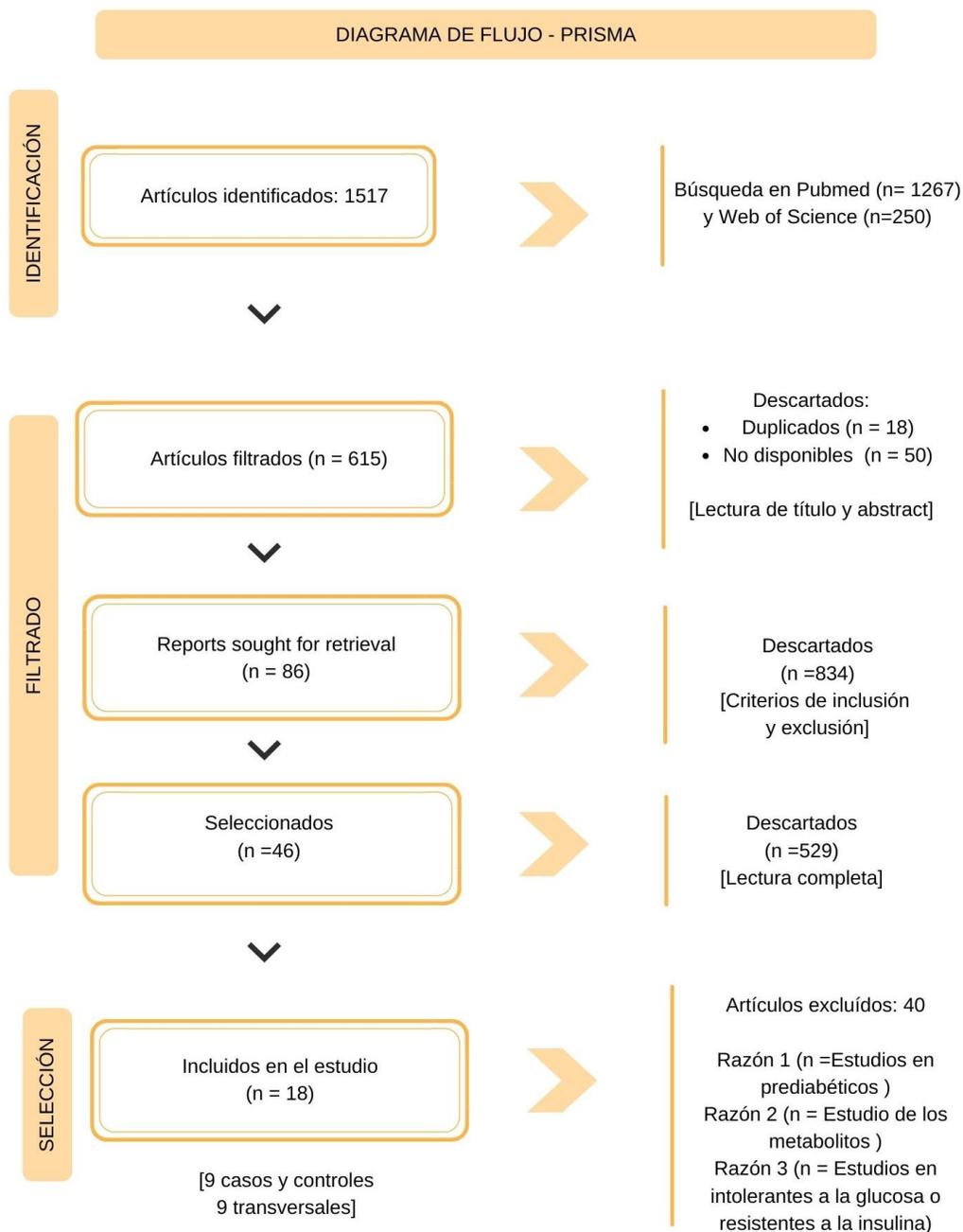


Figura 1. Diagrama de flujo

8.2. Tabla de extracción de datos

La tabla de extracción de datos sintetiza la información más relevante de los estudios incluidos en la revisión sistemática.

Artículos	País	Diseño	Muestra	Resultados	Ajuste por variables	Diagnóstico DM	Uso metformina	Ratio F/B X y B diversidad
⁶ Ahmad et al., 2019	Pakistan	Casos y controles	n=60 DM- obesos= 40 Control= 20	Incremento Firmicutes en obesos-DM; incremento de Acidobacteria, Deferribacteres, Gemmatimonadetes; Prevotella P4-76, Clostridiales, Staphylococcus. Incremento de Actinobacteria y Firmicutes (relacionado con glucosa alterada en ayunas) Incremento Fusobacteria Incremento GRAM-Dialister y Allisonella Descenso de Gammaproteobacteria Incremento de Verrucomicrobia y Elusimicrobia en Controles	sexo de similar distribución (no específica) Tiene en cuenta la obesidad	Previamente diagnosticada (inespecífico)	No	Ratio aumentado
⁷ Z. Chen et al., 2021	Holanda	Transversal	n=2166 RS cohort=1418 DM RS= 176 LLD cohort= 748 DM LLD=17	Asociación con menor HOMA-IR: Christensenellaceae, Marvinbryantia, Ruminococcaceae Asociación con menor riesgo de DM: Clostridiaceae, Peptostreptococaceae, Clostridium, Intestinibacter, Romboutsia	RS cohorte: 815 hombre/603 mujer LLD cohorte: 431 hombre/317 mujer Tiene en cuenta edad, sexo, alcohol, tabaco, educación, ingesta, actividad física, BMI, uso de fármacos	Criterios WHO	Sí	Diversidad-x asociada con disminución HOMA-IR Diversidad-b asociada con resistencia a la insulina

					para el control de lípidos			
⁸ Chen et al., 2019	Taiwán	Casos y controles	n=100 DM=50 Control=50	Incremento de Lactobacillus en DM Descenso de Clostridium coccoides y leptum	64 hombre/36 mujer Tiene en cuenta sexo, edad, BMI, y dieta	DM: Recientemente diagnosticada (inespecífico)	Sí 97% (análisis antes y después; incremento del descenso de Clostridium tras tratamiento)	
⁹ Diener et al., 2021	Méjico	Transversal	n=470 (427) DM= 48+17 PreDM=52+42 Control=214	Incremento en DM de Escherichia y Veillonella Descenso de Anaerostipes hadrus y Blautia Veillonella asociada a inflamación (PCR), grasa corporal y tensión arterial	122 hombre/30 8 mujer Tiene en cuenta factores de riesgo de DM2: sexo, edad, BMI, nutrición, la actividad física, antecedente familiar de DM2, dislipemia, PA alta	DM: previamente diagnosticada (inespecífico)	Sí (vuelta de los 4 géneros de bacterias a la normalidad)	Escherichia y Veillonella asociadas negativamente con la diversidad alfa Diversidad alfa: ruminococcaceae+
¹⁰ Doumate y et al., 2020	África	Casos y controles	n=291 DM=98 Control=193	Descenso de Firmicutes, (Clostridiaceae, Peptostreptococaceae) Incremento de Actinobacteria (coriobacteriaceae, bifidobacteriaceae), Bacteroidetes (Prevotella), Euryarchaeota, Tenericutes Desulfovibrio	Tiene en cuenta edad, sexo, y BMI	Criterios American Diabetes Associations (ADA)	Sí 98% en tratamiento (metformina, Sulfonilurea o combinación) Aumento de Verrucomicrobia	Ratio disminuido (descenso Firmicutes) Alfa diversidad mayor en casos (tratados) Beta diversidad relacionado con la DMT2
¹¹ Kitten et al., 2021	Méjico	Transversal	n=37 DM= 14 Control (NG)=23	Incremento de Firmicutes en DM, Proteobacteria y Verrucomicrobia Descenso Bacteroidetes	17 hombre/27 mujer Tiene en cuenta edad, sexo, tratamiento antidiabético	DM previamente diagnosticada (inespecífico)	Sí (86%) Posible descenso de Streptococo	Ratio aumentado No diferencias en la diversidad No diversidad beta por enfermedad CV en no-DM

				Controles: aumento Streptococco (enfermos CV)	o, nivel educacional HTA, dislipemia, antecedente s, HEI			
12. Kulkarni et al., 2021	India	Casos y controles	n=10 DM= 5 Control= 5	Incremento de bacterias inflamatorias (Lactobacillus ruminis, Ruminococcus gnavus, Bacteroides caccae, Butyricimonas, Collinsella aerofaciens, Prevotella copri, Bifidobacterium, Blautia, Dorea, Haemophilus Descenso de bacterias anti- inflamatorias (Faecalibacterium prausnitzii, Butyvirbio, Bacteroides uniformis, Prevotella stercorea, Veillonella parvula y dispar, Roseburia faecis	8 hombre/2 mujer	DM previamente diagnosticados (inespecifico)	No	Ratio aumentado
13 Li et al., 2020	China	Casos y controles	N1= 60 DM= 20 Control= 40 n2 (America comparison) =50 DM= 20 Control=30	Incremento Dorea, Fusobacterium,y Streptococcus Descenso de Bifidobacterium, Faecalibacterium y Akkermansia		DM previamente diagnosticada (inespecifico)	No	Ratio aumentado
14 Maskarin ec et al., 2021	5 etnias: Blanca, Africana americana, Hawaiana, Japonesa americana y Latina	Transversal	n=1702 DM=307 preDM=506 intolerancia glucosa=154 Control (NG)= 735	Actinobacteria, Firmicutes y Synergistetes inversamente relacionados con DM; Lentisphaere positivamente relacionado Firmicutes y Proteobacteria	844 hombre/85 8 mujer Tiene en cuenta sexo, etnia, edad, alcohol, tabaco, HEI, BMI,	Criterios American Diabetes Association (ADA)	Sí (202) Descenso de la alfa diversidad en estos pacientes (descenso de bifidobacterium y collinsella)	Ratio descendido (descenso Firmicutes) Diversidad alfa relacionada inversamente con el estatus de glucosa, mientras que diversidad beta diferente según el estado glicémico

				asociados a DMT2; Descenso de Clostridium, Lachnospira, Peptostreptococcaceae Incremento Escherichia-Shigella y Lachnospiraceae	actividad física			
¹⁵ Navab-Moghadam et al., 2017	Irán	Casos y controles	n=36 DM= 18 Control=18	Descenso de Bacteroidetes fragilis y Faecalibacterium prausnitzii en DMT2	Tiene en cuenta IPA-Q, BMI y alimentación (FFQ)	DM: Previamente diagnosticada (inespecífico)	No	
¹⁶ Sedighi et al., 2017	Irán	Casos y controles	n=36 DM= 18 Control=18	Incremento de Lactobacillus en DM Relativo incremento de Prevotella y Fusobacterium Descenso de Bifidobacterium	14 hombre/22 mujer Tiene en cuenta IPA-Q, BMI y alimentación	DM: previamente diagnosticada (inespecífico)	No	
¹⁷ J. Wang et al., 2020	China	Casos y controles	n= 171 (134) DM= 134 Control= 37	Incremento de Firmicutes Proteobacteria y Actinobacteria Descenso de Bacteroidetes Enterotipo Bacteroides (134): incremento en DM de Bacteroides, Bifidobacterium, Clostridium XIVa y XI, Parabacteroides Staphylococcus, Granulicatella, Porphyromonas, Blautia, Anaerostipes, Fusicatenibacter Enterococcus, Eggerthella y Flavonifractor Incremento en DM de Lactobacillus, Escherichia Shigella	69 hombre/ 65 mujer Ajustado por edad, género, BMI, TG, HDL, HOMA-B y HOMA-IR	Criterios WHO	Tto. antiDM	Ratio aumentado Disminución de la alfa diversidad en DM Gran diferencia en la beta diversidad entre DM y controles

				Incremento de Prevotella en grupo control				
¹⁸ L. Wang et al., 2021	China	Transversal	n=341 DM= 30 preDM= 33 Control=63	<p>Descenso de Bifidobacterium longum, Coprobacillus y Veillonella</p> <p>Incremento de Roseburia hominis, Porphyromonas bennonis y Paraprevotella.</p> <p>Descenso de Bifidobacterium= aumento de riesgo de desarrollo DM</p>	<p>46 hombre/80 mujer</p> <p>Tiene en cuenta edad, género, BMI, tabaco, HTA, antecedentes familiares de DM.</p>	Criterios WHO	No (incremento de Bifidobacterium)	No diferencias en la diversidad alfa; alta diversidad beta entre DM2 y grupo control
¹⁹ X. Wang et al., 2017	China	Casos y controles	<p>n1= 300 China DM=150 Control=150</p> <p>n2= 96 Suecia DM= 53 Control= 43</p> <p>n3= 352 Dinamarca DM=277 Control=75</p> <p>n4= 44 China DM=20 Control=24</p>	<p>Roseburia y otras productoras de butirato aumentadas en los controles</p> <p>Descenso de 4 especies de Haemophilus en DM</p> <p>Incremento de Lactobacillus, patógenos oportunistas, Streptococcus y Parabacteroides distasonis en DM</p>		DM previamente diagnosticado (inespecífico, MGWAS of DMT2)	Sí	
²⁰ Wu et al., 2020	Suecia	Transversal	<p>n1 (discovery cohort)1011 DM=? PreDM= 226 Bajo riesgo=297 Alto riesgo Control= 523</p> <p>n2 (validation cohort)= 484 DM=58 Intolerancia glucosa=132</p>	<p>Diferencia en abundancia entre mujeres y hombres en IGT de Clostridia, Faecalibacterium y Eubacterium</p> <p>Descenso de productoras de butirato en DM (Faecalibacterium, Clostridium, Alistipes, Pseudoflavonifractor y Oscillibacter spp)</p>	<p>Discovery cohort 443 hombre; 568 mujer</p> <p>Validación cohort 245 hombre; 240 mujer</p> <p>Tiene en cuenta sexo, edad, BMI, medicación</p>	Criterios WHO		

			Niveles Glu alterada=88 Control=206	<p>Descenso en prediabéticos de Clostridiales bacterium, Flavonifractor plautii, Coprococcus eutactus, Alistipes obesi, intestimonas butyriciproducens</p> <p>Incremento de Clostridium bolteae</p>				
²¹ Zhang et al., 2021	Shangai	Transversal	n=182 DM= 22 no obesos y 56 obesos Control=52 no obesos y 52 obesos	<p>Descenso de Faecalibacterium prausnitzii y Bacteroides stercoris en DM-NO (no obesos)</p> <p>Descenso Akkermansia muciniphila en DM NO</p>	96 hombre/86 mujer Tiene en cuenta la obesidad, la edad, el tabaco, la presencia de hígado graso	Criterios American Diabetes Association (ADA)	No	<p>DM-NO: ratio incrementado</p> <p>No diversidad alfa excepto entre los diabéticos O- NO (NO mayor diversidad)</p> <p>La diversidad era única en el grupo de diabéticos NO</p>
²² X. Zhang et al., 2013	China	Transversal	n=121 DM= 13 PreDM=64 Control=44	<p>Incremento Clostridia, Dorea, Prevotella, Collinsella y Betaproteobacteria</p> <p>Descenso de Streptococcus y bacterias productoras de butirato, Faecalibacterium, Akkermansia muciniphila y Haemophilus parainfluenzae</p> <p>Descenso de Verrucomicrobia e incremento de Betaproteobacteria en preDM</p>	12 hombre/32 mujer Tiene en cuenta BMI, edad y sexo	Criterios WHO	No	Ratio incrementado
²³ X. Zhao et al., 2020	China	Transversal	n= 316 DM= 137 Control=179	<p>Descenso Bacteroidetes, Bacteroides, Prevotella y Lachnospiraaceae</p> <p>Blautia, Faecalibacterium, Lachnospira, Roseburia, Pseudobutyrvibrio</p>	171 hombre/145 mujer	DM: Criterios específicos expuestos	No	<p>Diversidad disminuida en DM</p> <p>Ratio incrementado (descenso de Bacteroidetes)</p>

				Incremento Actinobacteria (bifidobacterium) Verrucomicrobia (Akkermansia) y Proteobacteria (Escherichia- Shigella, Subdoligranulum), Enterococcus y Lactobacillus				
--	--	--	--	---	--	--	--	--

Tabla 3. Análisis de la literatura incluida en el estudio

8.3. Análisis de los estudios

➤ Diversidad y enterotipo

La disbiosis y la disminución de diversidad en la microbiota de los pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2 es evidente. En la secuenciación del microbioma, estas diferencias se han clasificado en dos grupos; *diversidad alfa*, que indica la diversidad dentro de la muestra del paciente; y *diversidad beta*, la diversidad entre las muestras de los diferentes pacientes ⁶. Anteriormente se relacionaba la primera con múltiples enfermedades, pero se ha visto que esta conclusión es incierta puesto que hay resultados contradictorios al respecto ^{10,11}. En la investigación de Z. Chen et al ⁷, un aumento de alfa diversidad se vinculaba a una disminución de resistencia a la insulina y a una menor prevalencia de diabetes tipo 2, mientras que un aumento de diversidad beta se relacionaba con la resistencia a la insulina. No obstante, en el estudio de Doumatey et al ¹⁰, la alfa diversidad es mayor en el grupo de casos, aunque esto podría deberse a que el 97% estaban tratados con antidiabéticos. También afirma que la DMT2 está fuertemente asociada al perfil de abundancia del microbioma medido por la diversidad beta. De la misma manera, en el estudio de Kitten et al ¹¹, la diversidad alfa y beta no son significativas, lo que también podría estar relacionado con el uso de metformina en los pacientes.

Las dos comunidades más prevalentes en nuestro intestino son los *Firmicutes* y los *Bacteroidetes*. Así, en 2011 se introdujo un método para investigar la microbiota y su relación con diferentes enfermedades; basándose en la composición taxonómica, se clasificó la microbiota en 3 enterotipos. El primero dominado por los *Bacteroides*, el segundo encabezado por la *Prevotella*, y el último guiado por el

Ruminococcus. En el estudio de J. Wang et al ¹⁷, los pacientes se dividen en dos grupos, según los géneros predominantes de bacterias; 134 en el enterotipo *Bacteroides*, y 37 en el enterotipo *Prevotella*. En el primero, existe un incremento en los pacientes DMT2 de *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium XIVa y XI*, *Parabacteroides*, *Staphylococcus*, *Granulicatella*, *Porphyromonas*, *Blautia*, *Anaerostipes*, *Fusicatenibacter*, *Enterococcus*, *Eggerthella* y *Flavonifractor*. El *Enterococcus* y la *Granulicatella* están relacionados con la HbA1c; la *Eggerthella* (Actinobacteria, ⁶) con la glucosa plasmática en ayunas; *Eggerthella*, *Enterococcus* y *Bifidobacterium* con la glucosa plasmática 2 horas después de la comida; este último, junto con los *Bacteroides* y el *Fusicatenibacter* con el HOMA2-IR; y el *Clostridium XVIII* con el HOMA2-B. Además, *Eggerthella* y *Bifidobacterium* (abundantes en el grupo DMT2) están relacionados positivamente con el aumento de LPS y TNF α , factores proinflamatorios y endotóxicos que afectan directamente a la sensibilidad de la insulina. No obstante, el estudio de L. Wang ¹⁸ indica que existe un descenso de *Bifidobacterium*, correlacionado negativamente con los niveles de glucosa en ayunas y tras la ingesta, y que esto podría propiciar el desarrollo de la enfermedad. El género *Flavonifractor* y *pseudoflavonifractor* también se ha visto disminuido en pacientes con alto riesgo de DM y en pacientes diabéticos, respectivamente ²⁰.

El ratio marcador de enfermedad, *Firmicutes/ Bacteroidetes*, sigue sin tener una conclusión claramente establecida; la mayoría de resultados parece que relacionan el incremento de los *Firmicutes* con la Diabetes, con el consecuente descenso de los *Bacteroidetes* ^{17,21}. Sin embargo, esto puede estar influenciado por la obesidad y la dislipemia; por ejemplo, en el primer estudio, los pacientes presentaban altos niveles de triglicéridos por lo que se piensa que el resultado podía estar alterado debido a esta causa. No obstante, en el segundo, se aclara que este ratio aumenta en el grupo de pacientes diabéticos no obesos.

También existen resultados contradictorios al respecto, con un descenso de *Firmicutes* ^{10,14} y un aumento de *Actinobacterias* por encima de los *Bacteroidetes*. En el último estudio¹⁴, las *Actinobacterias* estaban disminuidas (*Collinsella* y

Bifidobacteria), posiblemente por el efecto de la metformina. Además, el género *Collinsella* está asociado positivamente a la insulina, péptido C y HOMA-IR, lo que iría más a favor de las conclusiones de los otros artículos ^{12,22}.

Pese a que algunos de los resultados no son estadísticamente significativos ¹⁶, en algunos estudios se observa el aumento de *Fusobacteria* ^{6,13}, relacionada con la producción de energía, la adhesión a las células epiteliales del huésped y respuestas inflamatorias.

➤ Características y función de los distintos filos

Dentro de los *Bacteroidetes*, se encuentra el género *Bacteroides*, encargado mayoritariamente de fermentar la fibra no digerible en ácidos grasos de cadena corta (SCFAs); el ácido propiónico, relacionado con la grasa visceral; el ácido acético y propiónico ligado a la homeostasis de la glucosa ²³. Se ha visto que hay un descenso en pacientes diabéticos de bacterias productoras de SCFA's (*Faecalibacterium*, *Roseburia*, *Blautia*, del filo *Firmicutes* ^{12,15,19}, *Bifidobacterium* y *Akkermansia*, del filo *Verrucomicrobia* ²², así como otros géneros de la familia *Lachnospiraceae*).

Dentro de los SCFA's, el ácido propiónico está asociado a la producción de butirato y este con GLP1, que se relaciona con la homeostasis de la glucosa, protección de la barrera intestinal y el estrés oxidativo. Los genes implicados en la biosíntesis de butirato desde carbohidratos (*but*, *buk*) y proteínas (*atoA/D* y *4hbt*) están disminuidos en prediabéticos y en pacientes DM del cohorte de validación ²⁰. De hecho, el incremento de *Christensenellaceae*, *Marvinbryantia*, *Ruminococcaceae* y *Clostridiaceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Clostridium*, *Intestinibacter*, *Romboutsia* disminuyen el riesgo de HOMA-IR y de prevalencia de DM2, respectivamente según el estudio de Z. Chen et al ⁷. Similar a lo que constata Maskarinek et al. ¹⁴ en su estudio, en relación al descenso de algunas de estas bacterias (*Clostridium*, *Lachnospira*, *Peptostreptococcaceae*), con la baja producción de SCFA's y la Diabetes Mellitus ¹⁴. Chen et al. ⁸ también observó un descenso en pacientes diabéticos de *Clostridium leptum* y *Clostridium coccoides*, el principal grupo de bacterias productoras de butirato.

Pese a que esta conclusión sí parece más afianzada que el resto, algunos artículos presentan resultados diferentes, como el estudio de L. Wang et al. ¹⁸, con un aumento de *Roseburia hominis*, *Porphyromonas bennonis* y *Paraprevotella unclassified* en pacientes diabéticos; es decir, un aumento de la clase *Clostridia* en estos pacientes ²².

También son poco concluyentes los resultados para *Prevotella*; una pequeña parte de los estudios indica que es una bacteria con propiedades antiinflamatorias y que, por tanto, se encuentra descendida en pacientes diabéticos ^{17, 23}, mientras que la otra parte afirma que está incrementada en estos enfermos ^{6,10,16,18,22}. El estudio de Kulkarni et al. ¹² presenta un aumento de *Prevotella copri*, y un descenso de *Prevotella stercorea*.

De la misma forma, es dudoso el desenlace frente al género *Haemophilus*; en algunos artículos desciende ^{19,22}, mientras que en otros se encuentra incrementado¹².

El incremento de *Lactobacillus* en estos pacientes es un hecho constatado; se correlaciona con los niveles de glucosa, HBA1C y HOMA-IR ^{8,16,19}.

➤ Metabolitos y factores proinflamatorios que afectan a la sensibilidad de la insulina

Algunos aminoácidos, como la Tirosina y la Alanina, se han visto asociados al desarrollo de resistencia a la insulina y de DM mediante la sobreexpresión de algunas proteínas microbianas como sprC, HAAO, y gbcA ¹³. La permeabilidad de la mucosa está relacionada con la resistencia a la insulina; se ha visto que sprC está vinculada con la motilidad celular, permitiendo la entrada de las bacterias a través de la mucosa. Así pues, la conexión de HAAO con el metabolismo del triptófano y la relación con la resistencia a la insulina y la inflamación es evidente. Y por último, GbcA relacionada con el metabolismo de la glicina, conduciendo al mismo resultado que la anterior y aumentando, por tanto, el riesgo de Diabetes Mellitus. Los productos de la fermentación de estos aminoácidos (amoníaco, aminas, derivados fenólicos) pueden afectar a la sensibilidad de la insulina ¹⁸.

Se ha postulado la relación entre ciertas vías metabólicas y la etiología de la enfermedad; la vía ABC (ATP- binding cassette, importante en la homeostasis gastrointestinal) se ha visto aumentada en DM, mientras que la asociada al transporte de aminoácidos está disminuida en estos pacientes ¹⁹. Existen otras vías sobreexpresadas también, como por ejemplo la de la síntesis y metabolismo de biotina, lo que sugiere un descenso de esta vitamina que puede estar relacionado con la microbiota y su función ²⁰.

Se han observado también genes implicados en la virulencia de los patógenos (Virulence Factors, VF); toxinas, proteínas de superficie, carbohidratos de superficie, enzimas hidrolíticas... De un total de 125 VF, el 70.4% están presentes en los pacientes diabéticos, con características como por ejemplo la adhesión, motilidad, invasión o quimiotaxis ¹⁹.

Además, se ha sugerido también la existencia de citocinas proinflamatorias y endotóxicas (LPS) producto de estas bacterias alteradas en los pacientes diabéticos que aumentan la inflamación e inducen resistencia a la insulina ¹². Estas suelen estar producidas por bacterias Gram- (*Bacteroidetes*), *Proteobacterias* (*Subdoligranulim*, *Escherichia*, *Shigella*)^{10,14,23}, o patógenas oportunistas (*Enterococcus*, *Klebsiella*, o *Clostridium clostridioforme o bolteeae*) ^{15,23}. En el grupo de pacientes DMT2 se encontró unos niveles superiores de DAO, TNFX y LPS ¹⁷, además de un aumento de PCR y monocitos ²⁰, lo que no hace más que probar el ambiente de endotoxemia e inflamación crónica de bajo grado que se da en la enfermedad. El descenso de ciertas bacterias consideradas anti-inflamatorias (*Faecalibacterium prausnitzii*) o el incremento de las pro-inflamatorias (*Lactobacillus*), induce a la activación de vías como la NF-kb y sus consecutivas citocinas generadoras de este ambiente proinflamatorio, como IL-6 o IL-8. Además, el aumento de *Butyricimonas* está asociado a la producción de IL-1B y TGFB1, y el descenso de *Bacteroides fragilis* también se ha relacionado con el aumento de la inflamación intestinal ¹².

En cuanto a la progresión de la enfermedad, se relaciona el aumento de *Actinobacteria* y *Firmicutes* con la alteración de los niveles de glucosa ^{6,18}.

Se ha visto que el incremento de *Escherichia* (*Proteobacteria*) y de *Veillonella* (*Firmicutes*) induce la progresión de la enfermedad, relacionándose directamente con la función de la célula beta pancreática, la resistencia a la insulina y la hemoglobina glicada, mientras que niveles elevados de *Blautia* y *Anaerostipes* (*Firmicutes* productoras de butirato) se asocian a una normofunción del páncreas ⁹. Además, en el estudio de Diener et al ⁹, se observa la relación entre la presión arterial y la grasa corporal con la *Veillonella*, después de ajustar estas variables; no obstante, también hay estudios que concluyen con un descenso de este género de bacterias ¹⁸.

Se ha correlacionado positivamente también la *Akkermansia muciniphila* con la secreción de insulina (HOMA%B), visible el descenso de esta bacteria en el grupo de DM no obesos, ²¹. También se ha observado un descenso de *Verrucomicrobia* en pacientes DMT2 obesos en el trabajo de Ahmad et al. ⁶ pese a que en el anterior estudio ²¹ el resultado no era estadísticamente significativo en este grupo.

En el estudio de Zhang et al ²¹, la diversidad en los pacientes diabéticos obesos es mucho menor que en la de no obesos. No obstante, la microbiota de este último grupo presenta características únicas que no están presentes en el resto de pacientes.

➤ Variables confusoras

La microbiota puede estar alterada por multitud de factores ambientales; dieta (medida en algunos estudios mediante el parámetro Healthy Eating Index), polución, ejercicio físico (índice IPAQ), medicación (sobre todo, metformina)... No tener en cuenta estos factores podría causar una mayor diversidad en las bacterias de los pacientes diabéticos, mostrando una falsa igualdad entre la *diversidad alfa* de ambos grupos y alterando los diferentes resultados y conclusiones. Por ejemplo, centrándonos en la metformina, el incremento de *Verrucomicrobiaceae* (*Akkermansia* ¹⁰, influida posiblemente también por la dieta), el descenso de *Escherichia* y *Veillonella* ⁹, o el “no incremento” de Estreptococo en los pacientes

DMT2, que indicaría su alto riesgo cardiovascular ¹¹. Sin embargo, la investigación de Chen et al. ⁸, prueba que el *Clostridium* (descendido en pacientes diabéticos) descendía todavía más después de tres meses de medicación pese a ser una bacteria productora de butirato y, por tanto, beneficiosa. De la misma manera, en el estudio de Maskarinec et al. ¹⁴ se observa una diversidad de microbiota menor que en los no tratados, por lo que el efecto de estas variables no está claro todavía.

9. DISCUSIÓN

➤ Diversidad y enterotipo

La Diabetes Mellitus tipo 2 es una enfermedad sumamente prevalente en la actualidad, y pese al prolongado y exhaustivo estudio de su etiología, prevención, diagnóstico y tratamiento, continúa en incesante aumento.

La cantidad de bacterias que componen la microbiota determina su propia capacidad de protección; se ha observado que los pacientes con diabetes presentan una disminución en la cantidad y calidad de la microbiota. La mayor parte de la microbiota intestinal se compone de *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, además de *Actinobacterias*, *Proteobacterias* y *Verrucomicrobia*. En un estudio de China, dividieron a los pacientes provenientes de dos etnias distintas. Así pues, se observó que los Kazaks, que presentaban mucha menos carga de enfermedad que los Uygurs, tenían una microbiota mucho más rica que la del otro grupo comparativo ²⁴. Ha sido comprobado que una dieta alta en grasas propicia el aumento en el ratio *Firmicutes/ Bacteroidetes*, resultado que se ha comprobado también en pacientes diabéticos y obesos ^{11,23}. Esto podría sugerir una relación entre el estado de sobrepeso, la intolerancia a la glucosa, y el cambio de diversidad en la microbiota. En un estudio en el cual se trata de relacionar la masa corporal y la microbiota en pacientes con Diabetes tipo 2 ²⁵, se determinó el índice de masa corporal (BMI) en población Taiwanesa, se clasificó según bioimpedancia (BCM) y se trató de observar si había distinciones en su microbiota intestinal. No obstante, se vio una relación directa entre el LTI (Lean Tissue Index, sobre todo en pacientes con BMI > 24 kg/m²), la abundancia de Firmicutes y un mayor ratio *Firmicutes/ Bacteroidetes*. No se observó relación entre FTI (Fat Tissue Index) y la microbiota intestinal en pacientes Diabéticos.

➤ Características y función de los distintos filos

Una de las funciones del género Bacteroides es la fermentación de azúcares en ácidos grasos de cadena corta (SCFAs), por lo que la alteración en la homeostasis de la glucosa producida en la enfermedad podría estar causada por el descenso de este género de bacterias, entre otras ²³. Aun así, el filo *Firmicutes* contiene también

gran cantidad de bacterias productoras de SCFA's ¹¹, lo que podría resultar algo contradictorio. Sin embargo, se han encontrado múltiples resultados opuestos frente a esta afirmación (disminución de la cantidad de *Firmicutes* en la DM2, ^{10,25,26,27,28}. Por lo tanto, se sugiere en la actualidad que el ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* no es un marcador para la disbiosis asociada a la diabetes u obesidad. Estas contradicciones pueden ser explicadas por las diferencias en la toma de datos analíticos y los métodos de secuenciación ²⁹, así como por diferencias en la ascendencia, región geográfica, alimentación o tratamiento antidiabético ¹⁰. Se ha observado también un ratio elevado de bacterias endotóxicas productoras de LPS (lipopolisacáridos) y una disminución de bacterias productoras de SCFA's (*Roseburia spp.*, *Eubacterium rectale* y *Faecalibacterium prausnitzii* y *Clostridium groups IV* y *XIVa*, ³⁰, factor que podría estar ligado a la desregulación del metabolismo de la glucosa.

Los ácidos grasos de cadena corta (SCFA's), sobre todo ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico, son producidos a partir de la fibra de la dieta y metabolizados por la microbiota intestinal. Entre sus funciones destacan el uso como fuente de carbono para generar metabolitos endógenos y la inhibición de la colonización de bacterias patógenas, así como el crecimiento de las beneficiosas para el tracto gastrointestinal. También están relacionados con la permeabilidad del tracto (regulando las uniones tight y/o inhibiendo el inflamósoma³¹) y el enriquecimiento de la función del sistema inmune, reduciendo citoquinas proinflamatorias e incrementando la población de células T reguladoras a través de las proteínas G receptoras (GPCRs).

El acetato se metaboliza sobre todo en el músculo, riñones, corazón y cerebro. El propionato se metaboliza en el hígado y es un sustrato neoglucogénico que inhibe la síntesis de colesterol y regula la lipogénesis en el tejido adiposo; ambos se relacionan con la homeostasis de la glucosa ²³. Y, por último, el butirato se metaboliza por las bacterias del tracto digestivo, donde ejerce su acción como sustrato y regula el crecimiento celular y diferenciación mediante diferentes mecanismos ³².

Los SCFAs, en especial el butirato, promueven la secreción de GLP1 y péptido YY, y disminuyen los niveles de glucosa en sangre ². Estas hormonas están encargadas de la estimulación de insulina dependiente de glucosa, vaciamiento gástrico e ingesta de alimentos ³.

El butirato reduce la traslocación de LPS a través del epitelio intestinal, y estimula el factor de transcripción PPAR- γ (peroxisoma proliferator-activated receptor gamma), que inhibe la vía NF- κ B proinflamatoria, además de inhibir el IFN γ . Todo ello conlleva una supresión de la inflamación ³³. Las bacterias productoras de Butirato, como *Eubacterium rectale*, *Blautia*, *Clostridiales sp. SS3/4*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Bacteroides intestinalis* y *Roseburia intestinalis*, se han visto disminuidas en estudios con pacientes diabéticos procedentes de China y Europa ². La depleción de *Faecalibacterium prausnitzii* (perteneciente a la familia *Ruminococcaceae*, clase *Clostridia* y filo *Firmicutes*), microorganismo con propiedades antiinflamatorias encargado de la producción de butirato, podría ser un gran indicador de patología intestinal ^{12,34}. También podría serlo la presencia o alteración del género *Roseburia spp*, productora de SCFA's (especialmente butirato), por su relación con la homeostasis de la glucosa ³⁵, aunque también hay resultados contradictorios al respecto ¹⁸.

Sin embargo, también puede haber un aumento de ciertas bacterias productoras de butirato debido al incremento de patógenos oportunistas del cluster *Clostridium clostridioforme* ²⁰.

En prediabéticos, se han observado ciertos cambios que podrían indicar progresión de la intolerancia a la glucosa y conversión a la DM, como podría ser un descenso de la *Actinobacteria bifidobacterium* ¹⁸, de *Verrucomicrobia*, o un aumento de *Bacteroides*, *Clostridium* y *Betaproteobacteria* ²².

➤ Metabolitos y factores proinflamatorios

La disbiosis producida por los diferentes factores anteriormente expuestos (dieta, obesidad, estilo de vida) puede alterar la permeabilidad de la membrana

intestinal. Las bacterias encargadas de la protección de la mucosa, como *F.prausnitzii* y *Akkermansia muciniphila*, están reducidas. De hecho, La *Akkermansia* se ha visto relacionada con la producción de insulina (HOMA%B) en pacientes con Diabetes ²¹. No obstante, los resultados acerca de esta bacteria son incongruentes; se ha visto tanto disminuida ⁶ como incrementada en sujetos con obesidad ³⁶. El descenso de *Verrucomicrobia* podría explicar la alteración de la sensibilidad a la insulina y del mantenimiento del estatus inflamatorio del tracto digestivo, además del sobrecrecimiento inverso de otras bacterias como las Proteobacterias ⁶. Su incremento en estos pacientes podría ser también producto del tratamiento con Metformina ^{10,23}. No obstante, en el estudio de X. Zhang et al ²², explica que en sus criterios de exclusión se encontraba el uso de, entre otros, fármacos antidiabéticos, por lo que la conclusión (en este caso, el descenso de *Akkermansia*) no podía estar manipulada por esta covariable.

Además, la hiperglucemia mantenida de los pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2 también afecta a la integridad de este sistema estructural; el resultado es el paso de metabolitos, patógenos y componentes inflamatorios con mayor facilidad al torrente sanguíneo ², con la consecuente base inflamatoria crónica que padecen los pacientes de esta enfermedad.

Se ha observado ciertos genes modificados debido a la toma de antibióticos (Antibiotic Resistance genes, AR), o genes implicados en la virulencia de los patógenos (Virulence Factors, VF), que podrían alterar la permeabilidad intestinal e influir en la sensibilidad a la insulina y el posterior desarrollo de DMT2¹⁹.

Como parte del aumento del estado proinflamatorio en estos pacientes, se ha visto también una desregulación en el sistema inmune adaptativo; el paso de estas sustancias y moléculas debido al aumento de permeabilidad podría desencadenar una cascada inflamatoria iniciada por la detección de proteínas anómalas (PAMPs de microorganismos, como los LPS) por parte de Toll Like Receptors (TLR).

La activación de TLR4 ¹² conduciría a la secreción de ciertas citocinas (IL-1, IL-6, TNF-X) e induciría la formación de macrófagos inflamatorios (fenotipo M1), que alcanzarían el tejido muscular y adiposo, generando la inflamación de base sistémica advertida en estos pacientes y resistencia a la insulina ². No obstante, la interleukina IL-36, pese a ser familia de la IL-1, ha demostrado contribuir a la regulación de la mucosa intestinal, los niveles de glucosa en sangre y la regulación del estado pro-inflamatorio ³⁷.

Acrescentando este grado de inflamación descubierto en la Diabetes Mellitus, se encuentra el cambio en la microbiota y el crecimiento de bacterias endotóxicas productoras de lipopolisacáridos (LPS), como por ejemplo el filo *Proteobacteria* ^{6,3839}, dentro del cual la *E. coli* es la más destacada ²⁵, que además es capaz de secretar enzimas que degradan la mucosa y destruyen la barrera intestinal ². Además, *Eggerthella* y *Bifidobacterium* (*Actinobacterias*), abundantes en el Enterotipo *Bacteroides* ^{6,17}, están relacionados positivamente con el aumento de LPS y TNF α , factores proinflamatorios y endotóxicos que afectan directamente a la

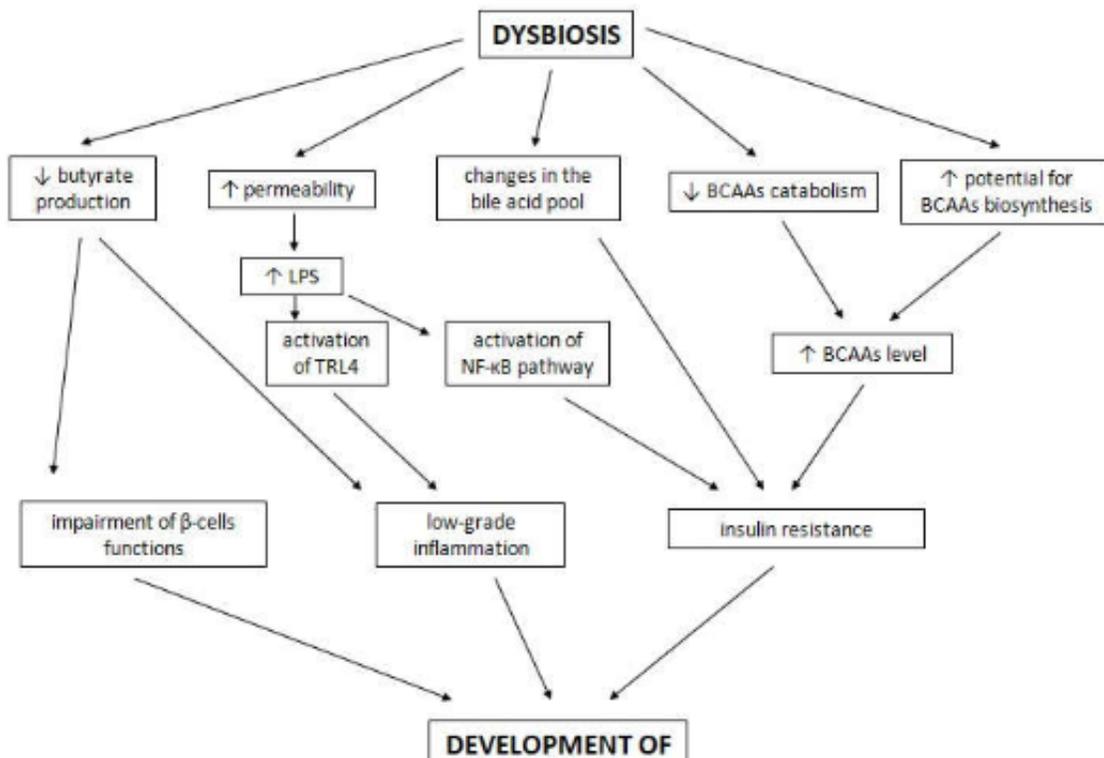


Figura 2. Proceso de desarrollo de DM⁴⁸

sensibilidad de la insulina. Con estos resultados, podríamos deducir que el enterotipo *Bacteroides* aumenta el riesgo de desarrollo de Diabetes mellitus tipo 2. No obstante, los resultados que conciernen al género *Bifidobacterium* son poco esclarecedores; algunos estudios indican que hay un incremento de esta bacteria en pacientes diabéticos, mientras que otros afirman que existe un descenso y que, al estar correlacionada negativamente con los niveles plasmáticos de glucosa en ayunas y los niveles de glucosa tras 2 horas de la ingesta, esto puede propiciar el desarrollo a largo plazo de la enfermedad en pacientes sanos ^{16, 18}.

Por tanto, en algunos estudios las *Actinobacterias* están incrementadas ^{10,12,22}, mientras que en otros están descendidas. Este resultado podría estar sesgado por el uso de antidiabéticos como la metformina ^{14, 18}, aunque difieren en el efecto final de esta (unos afirman que desciende su número mientras que los otros concluyen que lo incrementa). Dentro de este filo, la *Collinsella* está relacionada con el HOMA-IR, además de participar en la transformación de ácidos biliares (vía hidroxisteroide deshidrogenasa, actividad que se encuentra alterada en la DMT2).

En estudios de pacientes DM obesos, se ha observado una disminución de la abundancia de Proteobacterias (productoras de LPS), con un incremento de otras GRAM- como *Allisonella* y *Diallister* ⁶. El aumento de *Firmicutes* (Gram positivos) frente al descenso de *Bacteroidetes* (Gram negativos) en este grupo de pacientes podría mejorar el nivel de endotoxemia generado por los *Bacteroidetes*, mejorando la expresión de iNOS y, por consiguiente, la sensibilidad a la insulina ¹². En comparación, la microbiota en pacientes obesos diabéticos es mucho menos diversa y más pobre que en pacientes no obesos ²¹.

La leptina, como mediador proinflamatorio producido por los adipocitos, regula la activación de vías proinflamatorias (proteína SOCS, vía IKKB para la activación de NF-kB (factor nuclear kb), o vía JNK, lo que induce también resistencia a la insulina⁴⁰.

El sistema endocannabinoide (eCB) es otra de las posibles asociaciones debido a la relación con la inflamación y el control de la permeabilidad del tracto

gastrointestinal mediante la acción del receptor CB1³, además de la modulación del metabolismo de la glucosa gracias a la interacción entre los receptores CB2, que mejoran la tolerancia a esta, y CB1, que parece ser antagonista de CB2. Además se ha visto que el sistema eCB está sobreestimulado en pacientes obesos, en pacientes con disbiosis y en el aumento de endotoxemia³⁶.

Algunos metabolitos que influyen en la homeostasis metabólica intestinal y sistémica, además de los SCFAs, son el TMAO, los BCAAs, los ácidos biliares, el triptófano y derivados indol³¹.

Se ha observado que un nivel elevado en sangre del antioxidante Ácido Indolpropiónico (IPA), producto del aminoácido triptófano y metabolizado en la microbiota sobre todo gracias a la orden *Clostridiales*, regula la permeabilidad de la barrera intestinal y disminuye el riesgo de desarrollar Diabetes tipo 2^{41,42}. La causa de su disminución en pacientes diabéticos podría estar relacionada con el aumento de géneros bacterianos como *Blautia*, o en sí el filo *Firmicutes*; al contrario, el género *Faecalibacterium prasunitzii* está relacionado positivamente con los niveles de esta molécula.

También se ha visto una elevación de los niveles de Imidazol Propionato (ImP, el metabolito de la histidina) y de succinato (un intermediario en la producción de este) en estos pacientes. Puede estar relacionado con un enterotipo 2 *Bacteroides*, que suele estar identificado con una disminución en la riqueza de la microbiota, metabolismo alterado y ambiente proinflamatorio. En este enterotipo predomina la familia *Prevotellaceae*, productora de succinato^{43,44}, resultado que no concuerda con las conclusiones de nuestro estudio¹⁷. Otras bacterias productoras de succinato son las de la familia *Veillonellaceae*; ambas elevadas sobre todo en sujetos obesos y con enfermedades inflamatorias del intestino. El ImP activa la vía de señalización de mTORC1, lo que inhibe la formación del receptor de insulina² y conduciría a la resistencia hacia esta molécula.

Bacterias como la *Prevotella copri*, encargadas de la síntesis de amino-ácidos de cadena ramificada (BCAAs) y del consiguiente aumento de estos en sangre periférica, se han visto incrementadas con un resultado de resistencia a la insulina

e intolerancia a la glucosa ^{2,18}. Sin embargo, esto podría estar relacionado con la dieta, puesto que hay estudios con resultados contradictorios sobre este aspecto ²³.

La fosfatidilcolina, L-carnitina y colina pueden metabolizarse también en trimetilamina (TMA) gracias a la microbiota, y pasar a TMA-N-oxide o TMAO en el hígado posteriormente. Este metabolito también se ha visto implicado en la disbiosis y aumentado en enfermedades cardiovasculares, en la progresión de hígado graso no alcohólico (NAFLD) así como en la Diabetes tipo 2 ⁴⁵. Se ha relacionado directamente el aumento de los niveles de TMAO con la diabetes tipo 2 debido a su función en la tolerancia a la glucosa, inflamación y bloqueo la vía de señalización de la insulina en el tejido adiposo ⁴⁶.

Los ácidos biliares (BA) primarios son sintetizados a partir del colesterol mediante oxidación enzimática en el hígado, para posteriormente convertirse en secundarios gracias a la actividad de bacterias anaerobias del intestino. El gen para la coenzima A ligasa (baiB, llave para la transformación de estos ácidos biliares primarios en secundarios), que se ha correlacionado positivamente con la *Akkermansia muciniphila*, se ha visto disminuido en pacientes diabéticos no obesos. Además, se ha observado también con este descenso, un aumento de BCDA (3b-chenodeoxycholic acid), otro producto alternativo para la transformación de los ácidos. Por tanto, con el descenso de la bacteria en pacientes diabéticos, se encuentra el descenso de secreción de insulina, descenso de baiB e incremento de BCDA. Se requiere más investigación para estudiar la relación entre la *Akkermansia* y los ácidos biliares ²¹.

➤ Variables confusoras

Previamente se había observado un cambio en la microbiota en pacientes diabéticos pero se relacionó con los fármacos antidiabéticos que estos pacientes tomaban. Sin embargo, recientemente se ha visto que sí que existe una disbiosis en estos pacientes independientemente de la toma de fármacos ⁴⁷, aunque es cierto que los resultados pueden verse influidos por estos (sobre todo por la metformina⁹).

El desenlace acerca de la posible confusión generada por el tratamiento de la diabetes son, cuanto menos, poco concluyentes; algunos estudios indican que la metformina devuelve a la normalidad los niveles de bacterias alteradas en la enfermedad ⁹ o incrementan las que son beneficiosas (*Verrucomicrobiaceae* ¹⁰), restaurando la microbiota e incrementando su diversidad; otros explican la reducción de bacterias beneficiosas como *Clostridium coccooides* y *C. leptum* ⁸, o directamente el agravamiento de la disbiosis ²³. Podría deducirse que, pese a que las bacterias productoras de butirato son beneficiosas para el bienestar del tracto digestivo, un exceso puede ser incluso un riesgo para el desarrollo de la enfermedad por su papel en el aporte de energía adicional y el aumento de la tasa de apoptosis.

La ganancia en variedad de la microbiota producida por la medicación antidiabética podría conducir a una interpretación alterada de la diversidad alfa y beta. Aun así, las conclusiones acerca de la confusión producida por esta variable siguen sin estar claras. De la misma manera, un sujeto incluido en el estudio como sano o control que presente alguna patología de base, podría de la misma forma alterar la cantidad o calidad de las bacterias, influyendo también en la diversidad bacteriana de la microbiota ¹¹.

10. CONCLUSIONES

Los pacientes con Diabetes tipo 2 suelen presentar sobrepeso u obesidad debido a que la patogenia de la enfermedad se debe a la resistencia a la insulina inducida por el aumento de tejido adiposo, síndrome metabólico, etc. En primer lugar, el ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* está aumentado en pacientes obesos y diabéticos (BMI>24 kg/m²), probablemente porque los *Firmicutes* están relacionados con el transporte de nutrientes, y emplean la fuente de energía de una forma más efectiva que los *Bacteroidetes*²⁵. No obstante, los resultados acerca de este ratio no son concluyentes en la actualidad.

En segundo lugar, estos pacientes requieren del manejo de su patología mediante fármacos antidiabéticos de la primera línea como la metformina. Este fármaco ha demostrado ser un factor de confusión puesto que es capaz de disminuir o aumentar poblaciones de bacterias como por ejemplo el *Bifidobacterium*, la *Akkermansia muciniphila* o *Lactobacillus*, devolviéndolos a sus niveles normales y beneficiosos; no obstante también existen conclusiones contradictorias. La gran mayoría de nuestros artículos presentaban toma activa de metformina, por lo que los resultados se pueden haber visto influidos por esta.

Finalmente, existen una gran variedad de factores que influyen en la predisposición a padecer Diabetes Mellitus tipo 2 (dieta, estilo de vida, área geográfica, genética...). Es por esto, que no se puede atribuir un desenlace como es la Diabetes Mellitus a la acción de una determinada población de bacterias².

Es, por tanto, de creciente interés el estudio de la relación entre obesidad y Diabetes Mellitus frente a la microbiota, así como la influencia de la metformina en la misma. En general, los resultados acerca de la relación entre la microbiota intestinal y la Diabetes Mellitus son sumamente contradictorios, por lo que es de gran necesidad el aporte de información mediante estudios de mayor calidad que permitan establecer una clara relación entre la exposición y la patología detallada.

Como posibles limitaciones de este trabajo, la baja calidad de los estudios sería la más destacable, puesto que son casos y controles o transversales y no permiten establecer un orden de causalidad. El no ajuste por otras variables de interés de algunos artículos sería otra limitación, puesto que las variables de confusión son numerosas en este ámbito y es preciso controlarlas para poder extraer un resultado mínimamente fiable. Por otro lado, la puntuación del riesgo de sesgo se ha podido ver algo incrementada por nuestra parte debido al desconocimiento y no control de la herramienta empleada. Por último, la presencia de un error en la transcripción de datos de una tabla a una leyenda en un artículo ¹³ podía confundir las conclusiones, por lo que no lo hemos incluido en los resultados.

11. AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a mi pareja, familia y compañeros, que me han ayudado, orientado y animado en el proceso de este trabajo.

También agradezco mucho a Paula Carrasco y a mi tutor Juan Vicente Sánchez su ayuda; sin ellos, este trabajo no se podría haber llevado a cabo.

Pero sobre todo, la mayor motivación que me ha llevado a realizar este trabajo ha sido la enfermedad de la Diabetes; una enfermedad profundamente compleja y bonita a la vez, que siempre me ha creado curiosidad y ganas de aprender para poder ayudar a los que la padecen, sobre todo a mi abuela.

12. BIBLIOGRAFÍA- REFERENCIAS

1. Home - SED.
2. Yang G, Wei J, Liu P, Zhang Q, Tian Y, Hou G, et al. Role of the gut microbiota in type 2 diabetes and related diseases. Vol. 117, *Metabolism: Clinical and Experimental*. W.B. Saunders; 2021.
3. Han JL, Lin HL. Intestinal microbiota and type 2 diabetes: From mechanism insights to therapeutic perspective. *World Journal of Gastroenterology*. 2014 Dec 21;20(47):17737–45.
4. Clínico San Carlos Madrid H, Suárez Moya A. Microbiome and next generation sequencing Microbioma y secuenciación masiva. Vol. 30, *Secuenciación masiva Rev Esp Quimioter*. 2017.
5. Adak A, Khan MR. An insight into gut microbiota and its functionalities. Vol. 76, *Cellular and Molecular Life Sciences*. Birkhauser Verlag AG; 2019. p. 473–93.
6. Ahmad A, Yang W, Chen G, Shafiq M, Javed S, Zaidi SSA, et al. Analysis of gut microbiota of obese individuals with type 2 diabetes and healthy individuals. *PLoS ONE*. 2019 Dec 1;14(12).
7. Chen Z, Radjabzadeh D, Chen L, Kurilshikov A, Kavousi M, Ahmadizar F, et al. Association of Insulin Resistance and Type 2 Diabetes with Gut Microbial Diversity: A Microbiome-Wide Analysis from Population Studies. *JAMA Network Open*. 2021 Jul 29;4(7).
8. Chen PC, Chien YW, Yang SC. The alteration of gut microbiota in newly diagnosed type 2 diabetic patients. *Nutrition*. 2019 Jul 1;63–64:51–6.
9. Diener C, Reyes-Escogido M de L, Jimenez-Ceja LM, Matus M, Gomez-Navarro CM, Chu ND, et al. Progressive Shifts in the Gut Microbiome Reflect Prediabetes and Diabetes Development in a Treatment-Naive Mexican Cohort. *Frontiers in Endocrinology*. 2021 Jan 8;11.
10. Doumatey AP, Adeyemo A, Zhou J, Lei L, Adebamowo SN, Adebamowo C, et al. Gut Microbiome Profiles Are Associated With Type 2 Diabetes in Urban Africans. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2020 Feb 25;10.
11. Kitten AK, Ryan L, Lee GC, Flores BE, Reveles KR. Gut microbiome differences among Mexican Americans with and without type 2 diabetes mellitus. *PLoS ONE*. 2021 May 1;16(5 May).
12. Kulkarni P, Devkumar P, Chattopadhyay I. Could dysbiosis of inflammatory and anti-inflammatory gut bacteria have an implications in the development of type 2 diabetes? A pilot investigation. *BMC Research Notes*. 2021 Dec 1;14(1).
13. Li Q, Chang Y, Zhang K, Chen H, Tao S, Zhang Z. Implication of the gut microbiome composition of type 2 diabetic patients from northern China. *Scientific Reports*. 2020 Dec 1;10(1).
14. Maskarinec G, Raquinio P, Kristal BS, Setiawan VW, Wilkens LR, Franke AA, et al. The gut microbiome and type 2 diabetes status in the Multiethnic Cohort. *PLoS ONE*. 2021 Jun 1;16(6 June).

15. Navab-Moghadam F, Sedighi M, Khamseh ME, Alaei-Shahmiri F, Talebi M, Razavi S, et al. The association of type II diabetes with gut microbiota composition. *Microbial Pathogenesis*. 2017 Sep 1;110:630–6.
16. Sedighi M, Razavi S, Navab-Moghadam F, Khamseh ME, Alaei-Shahmiri F, Mehrtash A, et al. Comparison of gut microbiota in adult patients with type 2 diabetes and healthy individuals. *Microbial Pathogenesis*. 2017 Oct 1;111:362–9.
17. Wang J, Li W, Wang C, Wang L, He T, Hu H, et al. Enterotype *Bacteroides* Is Associated with a High Risk in Patients with Diabetes: A Pilot Study. *Journal of Diabetes Research*. 2020;2020.
18. Wang L, Yu X, Xu X, Ming J, Wang Z, Gao B, et al. The Fecal Microbiota Is Already Altered in Normoglycemic Individuals Who Go on to Have Type 2 Diabetes. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2021 Feb 18;11.
19. Wang X, Xu X, Xia Y. Further analysis reveals new gut microbiome markers of type 2 diabetes mellitus. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*. 2017 Mar 1;110(3):445–53.
20. Wu H, Tremaroli V, Schmidt C, Lundqvist A, Olsson LM, Krämer M, et al. The Gut Microbiota in Prediabetes and Diabetes: A Population-Based Cross-Sectional Study. *Cell Metabolism*. 2020 Sep 1;32(3):379-390.e3.
21. Zhang J, Ni Y, Qian L, Fang Q, Zheng T, Zhang M, et al. Decreased Abundance of *Akkermansia muciniphila* Leads to the Impairment of Insulin Secretion and Glucose Homeostasis in Lean Type 2 Diabetes. *Advanced Science*. 2021 Aug 1;8(16).
22. Zhang X, Shen D, Fang Z, Jie Z, Qiu X, Zhang C, et al. Human Gut Microbiota Changes Reveal the Progression of Glucose Intolerance. *PLoS ONE*. 2013 Aug 27;8(8).
23. Zhao X, Zhang Y, Guo R, Yu W, Zhang F, Wu F, et al. The Alteration in Composition and Function of Gut Microbiome in Patients with Type 2 Diabetes. *Journal of Diabetes Research*. 2020;2020.
24. Wang Y, Luo X, Mao X, Tao Y, Ran X, Zhao H, et al. Gut microbiome analysis of type 2 diabetic patients from the Chinese minority ethnic groups the Uygurs and Kazaks. *PLoS ONE*. 2017 Mar 1;12(3).
25. Hung WC, Hung WW, Tsai HJ, Chang CC, Chiu YW, Hwang SJ, et al. The association of targeted gut microbiota with body composition in type 2 diabetes mellitus. *International Journal of Medical Sciences*. 2021;18(2):511–9.
26. Santiago-Rodriguez TM, Hollister EB. Human virome and disease: High-throughput sequencing for virus discovery, identification of phage-bacteria dysbiosis and development of therapeutic approaches with emphasis on the human gut. Vol. 11, *Viruses*. MDPI AG; 2019.
27. Tsai HJ, Tsai WC, Hung WC, Hung WW, Chang CC, Dai CY, et al. Gut microbiota and subclinical cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Nutrients*. 2021 Aug 1;13(8).
28. Wang TY, Zhang XQ, Chen AL, Zhang J, Lv BH, Ma MH, et al. A comparative study of microbial community and functions of type 2 diabetes mellitus patients with obesity and healthy people. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2020 Aug 1;104(16):7143–53.

29. Magne F, Gotteland M, Gauthier L, Zazueta A, Pessoa S, Navarrete P, et al. The firmicutes/bacteroidetes ratio: A relevant marker of gut dysbiosis in obese patients? Vol. 12, *Nutrients*. MDPI AG; 2020.
30. Umirah F, Neoh CF, Ramasamy K, Lim SM. Differential gut microbiota composition between type 2 diabetes mellitus patients and healthy controls: A systematic review. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2021 Mar 1;173.
31. Hyun CK. Molecular and pathophysiological links between metabolic disorders and inflammatory bowel diseases. Vol. 22, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2021.
32. Tsai YL, Lin TL, Chang CJ, Wu TR, Lai WF, Lu CC, et al. Probiotics, prebiotics and amelioration of diseases. Vol. 26, *Journal of Biomedical Science*. BioMed Central Ltd.; 2019.
33. Kociszewska D, Chan J, Thorne PR, Vljakovic SM. The link between gut Dysbiosis caused by a high-fat diet and hearing loss. Vol. 22, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2021.
34. Guo Z, Zhang J, Wang Z, Ang KY, Huang S, Hou Q, et al. Intestinal Microbiota Distinguish Gout Patients from Healthy Humans. *Scientific Reports*. 2016 Feb 8;6.
35. Tamanai-Shacoori Z, Smida I, Bousarghin L, Loreal O, Meuric V, Fong SB, et al. Roseburia spp.: A marker of health? Vol. 12, *Future Microbiology*. Future Medicine Ltd.; 2017. p. 157–70.
36. Cani PD. Crosstalk between the gut microbiota and the endocannabinoid system: Impact on the gut barrier function and the adipose tissue. *Clinical Microbiology and Infection*. 2012;18(SUPPL. 4):50–3.
37. Giannoudaki E, Hernandez-Santana YE, Mulfaul K, Doyle SL, Hams E, Fallon PG, et al. Interleukin-36 cytokines alter the intestinal microbiome and can protect against obesity and metabolic dysfunction. *Nature Communications*. 2019 Dec 1;10(1).
38. Garcia-Rios A, Torres-Peña JD, Perez-Jimenez F, Perez-Martinez P. Gut Microbiota: A New Marker of Cardiovascular Disease. *Current Pharmaceutical Design*. 2017 May 31;23(22).
39. Caricilli AM, Saad MJA. The role of gut microbiota on insulin resistance. Vol. 5, *Nutrients*. MDPI AG; 2013. p. 829–51.
40. Pérez-Pérez A, Sánchez-Jiménez F, Vilariño-García T, Sánchez-Margalet V. Role of leptin in inflammation and vice versa. Vol. 21, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2020. p. 1–24.
41. Menni C, Hernandez MM, Vital M, Mohny RP, Spector TD, Valdes AM. Circulating levels of the anti-oxidant indolepropionic acid are associated with higher gut microbiome diversity. *Gut Microbes*. 2019 Nov 2;10(6):688–95.
42. de Mello VD, Paananen J, Lindström J, Lankinen MA, Shi L, Kuusisto J, et al. Indolepropionic acid and novel lipid metabolites are associated with a lower risk of type 2 diabetes in the Finnish Diabetes Prevention Study. *Scientific Reports*. 2017 Apr 11;7.
43. Molinaro A, Bel Lassen P, Henricsson M, Wu H, Adriouch S, Belda E, et al. Imidazole propionate is increased in diabetes and associated with dietary patterns and altered microbial ecology. *Nature Communications*. 2020 Dec 1;11(1).

44. Serena C, Ceperuelo-Mallafre V, Keiran N, Queipo-Ortuño MI, Bernal R, Gomez-Huelgas R, et al. Elevated circulating levels of succinate in human obesity are linked to specific gut microbiota. *ISME Journal*. 2018 Jun 1;12(7):1642–57.
45. Schugar RC, Shih DM, Warriar M, Helsley RN, Burrows A, Ferguson D, et al. The TMAO-Producing Enzyme Flavin-Containing Monooxygenase 3 Regulates Obesity and the Beiging of White Adipose Tissue. *Cell Reports*. 2017 Jun 20;19(12):2451–61.
46. Jia J, Dou P, Gao M, Kong X, Li C, Liu Z, et al. Assessment of causal direction between gut microbiota- dependent metabolites and cardiometabolic health: A bidirectional mendelian randomization analysis. *Diabetes*. 2019 Sep 1;68(9):1747–55.
47. Vals-Delgado C, Alcala-Diaz JF, Molina-Abril H, Roncero-Ramos I, Caspers MPM, Schuren FHJ, et al. An altered microbiota pattern precedes Type 2 diabetes mellitus development: From the CORDIOPREV study. *Journal of Advanced Research*. 2022 Jan 1;35:99–108.
48. Bielka W, Przek A, Pawlik A. The role of the gut microbiota in the pathogenesis of diabetes. Vol. 23, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2022.

13. MATERIAL SUPLEMENTARIO- ANEXOS

➤ ANEXO 1: Evaluación del riesgo de sesgos (NOS)

A. Selección

1. ¿Es la definición del caso adecuada?
2. Representatividad de los casos
3. Selección de los controles
4. Definición de los controles

B. Comparabilidad

1. Comparabilidad de casos y controles en base al diseño o análisis: desenlace primario o secundario (outcomes secundarios)

C. Exposición

1. Determinación de la exposición
2. Mismo método de verificación de casos y controles
3. Tasa de no respuesta (mantenimiento de la muestra)

(Ahmad et al., 2019) → 5

			JUSTIFICACIÓN
S E L E C C I O N	1. Definición de los casos	a. Sí, con validación independiente (*) b. Sí, por ejemplo vinculación de registros o autoinformes c. No descrito	
	2. Representatividad de los casos	a. Sí, serie de casos consecutivos o obviamente representativos (*) b. Posibilidad de sesgo de selección o no declarado	<i>“..from the diabetic clinic of the Social Security Hospital, Islamabad.”</i>
	3. Selección de los controles	a. Controles comunitarios (*) b. Controles hospitalarios c. No descrito	
	4. Definición de los controles	a. No hay historia de enfermedad (*) b. No hay mención de la historia de la enfermedad, no hay descripción de la fuente	
C O M P A R A B I L I D A D	1. Los sujetos en grupos distintos son comparables (control de covariables)	a. Se controla para la covariable más importante (*) b. Se controla para otras covariables (*)	<i>“.. characterize the gut microbiome of obese-T2DM and healthy individuals in the Pakistani population.”</i>
E X P O S I C I O N	1. Determinación de la exposición	a. Registro seguro (*) b. Entrevista estructurada donde se ciega el estado caso control (*) c. Entrevista no cegada d. Autoinforme escrito o registro médico solamente e. Ninguna descripción	<i>“The filtered high-quality reads were stitched by using FLASH...QIIME, UCHIME...”</i>
	2. Mismo método de verificación de casos y controles	a. Sí (*) b. No	<i>“16S rRNA sequencing targeting V3-V4 hypervariable regions”</i>
	3. Tasa de no respuesta	a. La misma para ambos grupos (*) b. No se describe encuestados c. Tasa diferente y sin designación	

Tabla 4. Evaluación individual del riesgo de sesgo de cada artículo incluido en el estudio

Tabla 4 Evaluación individual del riesgo de sesgo de cada artículo incluido en el estudio

			JUSTIFICACIÓN
S E L E C C I Ó N	1. Representatividad de la muestra	a. Muy representativa (*) b. Ligeramente representativa (*) c. Grupos diana d. No descrito	<i>“2166 participants in this study: 1418 from the Rotterdam Study, and 748 from the LifeLines-DEEP study”, from Netherlands”</i>
	2. Tamaño de la muestra	a. Justificada y satisfactoria (*) b. No justificada	<i>n=2166</i>
	3. No respondedores	a. N° satisfactorio de respondedores (*) b. N° de respondedores no satisfactorio c. No descrito	<i>“4671 participants, 2607 had data on gut microbiome composition. From these 2607 participants, we excluded participants without information on type 2 diabetes, resulting in 2166 participants for analyses on gut microbiome and type 2 diabetes status”</i>
	4. Evaluación de la exposición (al factor de riesgo)	a. Herramienta de medida validada (**) b. Herramienta no validada pero descrita (*) c. No descrito	<i>“V3 and V4 hypervariable regions of the bacterial 16S ribosomal RNA gene were amplified and sequenced on the Illumina MiSeq platform (Illumina Inc)”</i>
C O M P A R A B I L I D A D	1. Los sujetos en grupos distintos son comparables (control de covariables)	a. Se controla para la covariable más importante (*) b. Se controla para otras covariables (*)	<i>“...we adjusted for age, sex, time in mail (RS only), and DNA batch effect (RS only) in model 1. In model 2, we additionally adjusted for alcohol intake, energy intake, smoking, educational level (RS only), and physical activity. In model 3, we additionally adjusted for body mass index (BMI; calculated as weight in kilograms divided by height in meters squared). Last, in model 4, we additionally adjusted for use of lipid-lowering drugs and proton pump inhibitors”</i>
R E S U L T A D O S	1. Evaluación del resultado	a. Evaluación mediante ciego independiente (**) b. Registro de asociación (**) c. Autoevaluación (*) d. No descrito	<i>“Cases of type 2 diabetes were identified according to World Health Organization criteria”</i>
	2. Test estadístico	a. Descrito y apropiado (*) b. No descrito, inapropiado o incompleto	

			JUSTIFICACIÓN
SELECCIÓN	1. Definición de los casos	a. Sí, con validación independiente (*) b. Sí, por ejemplo vinculación de registros o autoinformes c. No descrito	<i>“newly diagnosed type 2 diabetes”</i>
	2. Representatividad de los casos	a. Sí, serie de casos consecutivos o obviamente representativos (*) b. Posibilidad de sesgo de selección o no declarado	<i>“Patients from Shin-Kong Wu Ho-Su Memorial Hospital with newly diagnosed diabetes”</i>
	3. Selección de los controles	a. Controles comunitarios (*) b. Controles hospitalarios c. No descrito	
	4. Definición de los controles	a. No hay historia de enfermedad (*) b. No hay mención de la historia de la enfermedad, no hay descripción de la fuente	<i>“Healthy control subjects without any known diseases or any regular medication recruited through written advertisements”</i>
C O M P A R A B I L I D A D	1. Los sujetos en grupos distintos son comparables (control de covariables)	a. Se controla para la covariable más importante (*) b. Se controla para otras covariables (*)	<i>“Multivariate linear regression analysis was performed with microbiota as the dependent variable with adjustments for sex, age and BMI in model 1, with further adjustments for fiber intake in model 2”</i>
EXPOSICIÓN	1. Determinación de la exposición	a. Registro seguro (*) b. Entrevista estructurada donde se ciega el estado caso control (*) c. Entrevista no cegada d. Autoinforme escrito o registro médico solamente e. Ninguna descripción	<i>“QIAamp® Fast DNA Stool Mini kit”</i>
	2. Mismo método de verificación de casos y controles	a. Sí (*) b. No	<i>“16S rRNA analysis using quantitative polymerase chain reaction”</i>
	3. Tasa de no respuesta	a. La misma para ambos grupos (*) b. No se describe encuestados c. Tasa diferente y sin designación	

			JUSTIFICACIÓN
S E L E C C I Ó N	1. Representatividad de la muestra	a. Muy representativa (*) b. Ligeramente representativa (*) c. Grupos diana d. No descrito	<i>“University Cohort Project CARE-In-DEEP Study (Cardiometabolic Risk Evaluation and Interdisciplinary Diabetes Education and Early Prevention) of the University of Guanajuato”</i>
	2. Tamaño de la muestra	a. Justificada y satisfactoria (*) b. No justificada	<i>470 participants</i>
	3. No respondedores	a. Nº satisfactorio de respondedores (*) b. Nº de respondedores no satisfactorio c. No descrito	<i>“470 participants...at the end, we had complete data and microbiome composition only for 427”</i>
	4. Evaluación de la exposición (al factor de riesgo)	a. Herramienta de medida validada (**) b. Herramienta no validada pero descrita (*) c. No descrito	<i>“PCR method to sequence the V4 hypervariable region of the bacterial 16S rRNA gene.”</i>
C O M P A R A B I L I D A D	1. Los sujetos en grupos distintos son comparables (control de covariables)	a. Se controla para la covariable más importante (*) b. Se controla para otras covariables (*)	<i>“226 clinical variables spanning the areas of diabetes, obesity, general health, lifestyle, and diet...”</i>
R E S U L T A D O S	1. Evaluación del resultado	a. Evaluación mediante ciego independiente (**) b. Registro de asociación (**) c. Autoevaluación (*) d. No descrito	
	2. Test estadístico	a. Descrito y apropiado (*) b. No descrito, inapropiado o incompleto	<i>“chi-squared likelihood-ratio test”</i>

			JUSTIFICACIÓN
SELECCIÓN	1. Definición de los casos	a. Sí, con validación independiente (*) b. Sí, por ejemplo vinculación de registros o autoinformes c. No descrito	<i>“The definition of T2D was based on the American Diabetes Association (ADA) criteria”</i>
	2. Representatividad de los casos	a. Sí, serie de casos consecutivos o obviamente representativos (*) b. Posibilidad de sesgo de selección o no declarado	<i>“291 participants from the longstanding genetic epidemiology study of T2D in Africa—the Africa America Diabetes Mellitus (AADM) study”</i>
	3. Selección de los controles	a. Controles comunitarios (*) b. Controles hospitalarios c. No descrito	<i>“Participants for the microbiome studies were enrolled at a single site—Ibadan, Nigeria”</i>
	4. Definición de los controles	a. No hay historia de enfermedad (*) b. No hay mención de la historia de la enfermedad, no hay descripción de la fuente	<i>“Controls were required to have FPG < 126 mg/dl or 2-h post load of < 140 mg/dl and no symptoms suggestive...”</i>
C O M P A R A B I L I D A D	1. Los sujetos en grupos distintos son comparables (control de covariables)	a. Se controla para la covariable más importante (*) b. Se controla para otras covariables (*)	<i>“... adjusting for age, sex, and BMI as covariates”</i>
EXPOSICIÓN	1. Determinación de la exposición	a. Registro seguro (*) b. Entrevista estructurada donde se ciega el estado caso control (*) c. Entrevista no cegada d. Autoinforme escrito o registro médico solamente e. Ninguna descripción	<i>MoBioPowerMagR© Microbiome kit</i>
	2. Mismo método de verificación de casos y controles	a. Sí (*) b. No	<i>“... bacterial 16S V4 rDNA region, by amplifying the DNA samples, PCR”</i>
	3. Tasa de no respuesta	a. La misma para ambos grupos (*) b. No se describe encuestados c. Tasa diferente y sin designación	

(Kitten et al., 2021) → 8

			JUSTIFICACIÓN
S E L E C C I O N	1. Representatividad de la muestra	a. Muy representativa (*) b. Ligeramente representativa (*) c. Grupos diana d. No descrito	<i>"...from San Antonio, TX and surrounding areas"</i> <i>"...may not be representative of all T2DM and non-diabetic patient populations"</i>
	2. Tamaño de la muestra	a. Justificada y satisfactoria (*) b. No justificada	<i>"37 subjects, 14 with T2DM and 23 without diabetes", "despite this small sample size, we were able to identify several novel differences between groups"</i>
	3. No respondedores	a. Nº satisfactorio de respondedores (*) b. Nº de respondedores no satisfactorio c. No descrito	
	4. Evaluación de la exposición (al factor de riesgo)	a. Herramienta de medida validada (**) b. Herramienta no validada pero descrita (*) c. No descrito	<i>"Stool 16s rRNA sequences"</i> <i>"MoBIO PowerMag Soil DNA Isolation Bead Plate and KingFisher™robot."</i>
C O M P A R A B I L I D A D	1. Los sujetos en grupos distintos son comparables (control de covariables)	a. Se controla para la covariable más importante (*) b. Se controla para otras covariables (*)	<i>"Edad, sexo, BMI, tratamiento antidiabético, nivel educacional, trabajo, hipertensión, dislipemia, antecedentes..."</i>
R E S U L T A D O S	1. Evaluación del resultado	a. Evaluación mediante ciego independiente (**) b. Registro de asociación (**) c. Autoevaluación (*) d. No descrito	
	2. Test estadístico	a. Descrito y apropiado (*) b. No descrito, inapropiado o incompleto	<i>"Wilcoxon rank, chi-square test, SHANNON INDEX, PERMANOVA"</i>

			JUSTIFICACIÓN
SELECCIÓN	1. Definición de los casos	a. Sí, con validación independiente (*) b. Sí, por ejemplo vinculación de registros o autoinformes c. No descrito	
	2. Representatividad de los casos	a. Sí, serie de casos consecutivos o obviamente representativos (*) b. Posibilidad de sesgo de selección o no declarado	<i>“Institute of Ayurveda and Integrative Medicine (I-AIM), Bangalore, India”</i>
	3. Selección de los controles	a. Controles comunitarios (*) b. Controles hospitalarios c. No descrito	<i>“matched for age, gender, and living environment”</i>
	4. Definición de los controles	a. No hay historia de enfermedad (*) b. No hay mención de la historia de la enfermedad, no hay descripción de la fuente	<i>“5 healthy individual without diabetes and with no apparent history of IBS or any GI related problems”</i>
C O M P A R A B I L I D A D	1. Los sujetos en grupos distintos son comparables (control de covariables)	a. Se controla para la covariable más importante (*) b. Se controla para otras covariables (*)	
EXPOSICIÓN	1. Determinación de la exposición	a. Registro seguro (*) b. Entrevista estructurada donde se ciega el estado caso control (*) c. Entrevista no cegada d. Autoinforme escrito o registro médico solamente e. Ninguna descripción	<i>“The Illumina paired end reads (150*2) were demultiplexed using the bcl2fastq tool. The paired end reads were quality checked using FastQC (QIIME, UC</i>
	2. Mismo método de verificación de casos y controles	a. Sí (*) b. No	<i>“...using a 16S rRNA gene of V3 region sequencing at Illumina MiSeq platform</i>
	3. Tasa de no respuesta	a. La misma para ambos grupos (*) b. No se describe encuestados c. Tasa diferente y sin designación	

			JUSTIFICACIÓN
SELECCIÓN	1. Definición de los casos	a. Sí, con validación independiente (*) b. Sí, por ejemplo vinculación de registros o autoinformes c. No descrito	<i>“All T2D subjects were newly diagnosed and did not previously receive any treatment or medication”</i>
	2. Representatividad de los casos	a. Sí, serie de casos consecutivos u obviamente representativos (*) b. Posibilidad de sesgo de selección o no declarado	
	3. Selección de los controles	a. Controles comunitarios (*) b. Controles hospitalarios c. No descrito	
	4. Definición de los controles	a. No hay historia de enfermedad (*) b. No hay mención de la historia de la enfermedad, no hay descripción de la fuente	<i>“All healthy subjects were recruited to this study after physical examination and health assessment.”</i>
C O M P A R A B I L I D A D	1. Los sujetos en grupos distintos son comparables (control de covariables)	a. Se controla para la covariable más importante (*) b. Se controla para otras covariables (*)	
EXPOSICIÓN	1. Determinación de la exposición	a. Registro seguro (*) b. Entrevista estructurada donde se ciega el estado caso control (*) c. Entrevista no cegada d. Autoinforme escrito o registro médico solamente e. Ninguna descripción	<i>“We next performed PICRUSt2 analysis”</i>
	2. Mismo método de verificación de casos y controles	a. Sí (*) b. No	<i>“...primarily 16S rRNA and whole-genome shotgun sequencing”</i>
	3. Tasa de no respuesta	a. La misma para ambos grupos (*) b. No se describe encuestados c. Tasa diferente y sin designación	<i>“...two subjects were excluded due to technical problems in sequencing.”</i>

			JUSTIFICACIÓN
S E L E C C I Ó N	1. Representatividad de la muestra	a. Muy representativa (*) b. Ligeramente representativa (*) c. Grupos diana d. No descrito	<i>"...cohort members from five ethnic groups"</i>
	2. Tamaño de la muestra	a. Justificada y satisfactoria (*) b. No justificada	<i>"Among 1702 participants"</i>
	3. No respondedores	a. N° satisfactorio de respondedores (*) b. N° de respondedores no satisfactorio c. No descrito	<i>"Although the sample cannot be considered a fully representative sample of the cohort..."</i>
	4. Evaluación de la exposición (al factor de riesgo)	a. Herramienta de medida validada (**) b. Herramienta no validada pero descrita (*) c. No descrito	<i>"gut microbiome through 16S rRNA gene sequencing"</i>
C O M P A R A B I L I D A D	1. Los sujetos en grupos distintos son comparables (control de covariables)	a. Se controla para la covariable más importante (*) b. Se controla para otras covariables (*)	<i>"...adjusted for age, sex, ethnicity, smoking status, alcohol use, physical activity, HEI, DXA total body fat, antibiotic use..."</i>
R E S U L T A D O S	1. Evaluación del resultado	a. Evaluación mediante ciego independiente (**) b. Registro de asociación (**) c. Autoevaluación (*) d. No descrito	<i>"Following the American Diabetes Association (ADA)..."</i>
	2. Test estadístico	a. Descrito y apropiado (*) b. No descrito, inapropiado o incompleto	<i>"Bonferroni, Spearman correlation..."</i>

			JUSTIFICACIÓN
SELECCIÓN	1. Definición de los casos	a. Sí, con validación independiente (*) b. Sí, por ejemplo vinculación de registros o autoinformes c. No descrito	
	2. Representatividad de los casos	a. Sí, serie de casos consecutivos o obviamente representativos (*) b. Posibilidad de sesgo de selección o no declarado	<i>“Institute of Endocrinology and Metabolism Research and Training Center, Iran University of medical Sciences in Tehran, Iran.”</i>
	3. Selección de los controles	a. Controles comunitarios (*) b. Controles hospitalarios c. No descrito	<i>“non-diabetic individuals, matched for age, gender and living environment.”</i>
	4. Definición de los controles	a. No hay historia de enfermedad (*) b. No hay mención de la historia de la enfermedad, no hay descripción de la fuente	
C O M P A R A B I L I D A D	1. Los sujetos en grupos distintos son comparables (control de covariables)	a. Se controla para la covariable más importante (*) b. Se controla para otras covariables (*)	<i>“ BMI, IPA-Q, alimentación...”</i>
EXPOSICIÓN	1. Determinación de la exposición	a. Registro seguro (*) b. Entrevista estructurada donde se ciega el estado caso control (*) c. Entrevista no cegada d. Autoinforme escrito o registro médico solamente e. Ninguna descripción	<i>“QIAamp® DNA Stool mini kit”</i>
	2. Mismo método de verificación de casos y controles	a. Sí (*) b. No	<i>“bacterial 16S rRNA genes, qPCR analysis”</i>
	3. Tasa de no respuesta	a. La misma para ambos grupos (*) b. No se describe encuestados c. Tasa diferente y sin designación	

			JUSTIFICACIÓN
SELECCIÓN	1. Definición de los casos	a. Sí, con validación independiente (*) b. Sí, por ejemplo vinculación de registros o autoinformes c. No descrito	<i>“Diagnosis for less than five years”</i>
	2. Representatividad de los casos	a. Sí, serie de casos consecutivos o obviamente representativos (*) b. Posibilidad de sesgo de selección o no declarado	<i>“Institute of Endocrinology and Metabolism Research and Training Center, Iran University of medical Sciences in Tehran, Iran.”</i>
	3. Selección de los controles	a. Controles comunitarios (*) b. Controles hospitalarios c. No descrito	<i>“non-diabetic individuals, matched for age, gender and living environment.”</i>
	4. Definición de los controles	a. No hay historia de enfermedad (*) b. No hay mención de la historia de la enfermedad, no hay descripción de la fuente	
C O M P A R A B I L I D A D	1. Los sujetos en grupos distintos son comparables (control de covariables)	a. Se controla para la covariable más importante (*) b. Se controla para otras covariables (*)	<i>“...were included in similar age grouping, gender, race, living environment and non-interventions of medications and foods”</i>
EXPOSICIÓN	1. Determinación de la exposición	a. Registro seguro (*) b. Entrevista estructurada donde se ciega el estado caso control (*) c. Entrevista no cegada d. Autoinforme escrito o registro médico solamente e. Ninguna descripción	<i>“QIAamp® DNA Stool mini kit”</i>
	2. Mismo método de verificación de casos y controles	a. Sí (*) b. No	<i>“16S rRNA sequencing, PCR”</i>
	3. Tasa de no respuesta	a. La misma para ambos grupos (*) b. No se describe encuestados c. Tasa diferente y sin designación	

			JUSTIFICACIÓN
SELECCIÓN	1. Definición de los casos	a. Sí, con validación independiente (*) b. Sí, por ejemplo vinculación de registros o autoinformes c. No descrito	<i>“T2D patients were diagnosed using the World Health Organization diagnostic criteria for diabetes”</i>
	2. Representatividad de los casos	a. Sí, serie de casos consecutivos o obviamente representativos (*) b. Posibilidad de sesgo de selección o no declarado	<i>“Hospitalization in the Qilu Hospital of Shandong University”</i>
	3. Selección de los controles	a. Controles comunitarios (*) b. Controles hospitalarios c. No descrito	<i>“Nondiabetic controls were people who worked in the Qilu Hospital of Shandong University”</i>
	4. Definición de los controles	a. No hay historia de enfermedad (*) b. No hay mención de la historia de la enfermedad, no hay descripción de la fuente	<i>“The plasma glucose concentration of all 50 nondiabetic controls was evaluated by a fasting oral glucose tolerance test (OGTT)”</i>
C O M P A R A B I L I D A D	1. Los sujetos en grupos distintos son comparables (control de covariables)	a. Se controla para la covariable más importante (*) b. Se controla para otras covariables (*)	<i>“...adjusted for age, gender, and BMI. Model 3 is adjusted for model 2 plus TG and HDL-C. Model 4 is adjusted for model 3 plus HOMA-β. Model 5 is adjusted for model 3 plus HOMA-IR”</i>
EXPOSICIÓN	1. Determinación de la exposición	a. Registro seguro (*) b. Entrevista estructurada donde se ciega el estado caso control (*) c. Entrevista no cegada d. Autoinforme escrito o registro médico solamente e. Ninguna descripción	<i>“QIAamp DNA Stool Mini Kit...NanoDrop 2000 spectrophotometer”</i>
	2. Mismo método de verificación de casos y controles	a. Sí (*) b. No	<i>“16S rDNA sequencing”</i>
	3. Tasa de no respuesta	a. La misma para ambos grupos (*) b. No se describe encuestados c. Tasa diferente y sin designación	<i>“These patients were excluded and the final T2D patient number was 134.... Among the nondiabetic controls, six drank yogurt within three days before fecal collection and seven did not finish OGTT. The final number was 37”</i>

			JUSTIFICACIÓN
S E L E C C I Ó N	1. Representatividad de la muestra	a. Muy representativa (*) b. Ligeramente representativa (*) c. Grupos diana d. No descrito	<i>“Northwestern China; China National Diabetes and Metabolic Disorders Survey (CNDMDS)”</i>
	2. Tamaño de la muestra	a. Justificada y satisfactoria (*) b. No justificada	<i>n= 341</i>
	3. No respondedores	a. Nº satisfactorio de respondedores (*) b. Nº de respondedores no satisfactorio c. No descrito	<i>“1915 participants...Finally, 30 patients with T2D (NGR-T2D) and 33 with prediabetes (NGR-PreD) qualified for metagenomic sequencing.”</i>
	4. Evaluación de la exposición (al factor de riesgo)	a. Herramienta de medida validada (**) b. Herramienta no validada pero descrita (*) c. No descrito	<i>“Shotgun Sequencing, Illumina HiSeq Platform”</i>
C O M P A R A B I L I D A D	1. Los sujetos en grupos distintos son comparables (control de covariables)	a. Se controla para la covariable más importante (*) b. Se controla para otras covariables (*)	<i>“Age, gender, BMI, smoking history, hypertension, family history...”</i>
R E S U L T A D O S	1. Evaluación del resultado	a. Evaluación mediante ciego independiente (**) b. Registro de asociación (**) c. Autoevaluación (*) d. No descrito	<i>“T2D was defined according to WHO criteria”</i>
	2. Test estadístico	a. Descrito y apropiado (*) b. No descrito, inapropiado o incompleto	<i>“Wilcoxon rank-sum test, Spearman’s srank-order correlation...”</i>

(X. Wang et al., 2017) → 4

			JUSTIFICACIÓN
S E L E C C I Ó N	1. Definición de los casos	a. Sí, con validación independiente (*) b. Sí, por ejemplo vinculación de registros o autoinformes c. No descrito	<i>“Random forest models were trained to identify T2DM status in the training set”</i>
	2. Representatividad de los casos	a. Sí, serie de casos consecutivos o obviamente representativos (*) b. Posibilidad de sesgo de selección o no declarado	<i>“... from previous metagenome-wide association studies (MGWAS) of T2DM”; 300 Chinese samples as a training set to perform a MGWAS, and a further 44 Chinese samples and two European cohorts</i>
	3. Selección de los controles	a. Controles comunitarios (*) b. Controles hospitalarios c. No descrito	
	4. Definición de los controles	a. No hay historia de enfermedad (*) b. No hay mención de la historia de la enfermedad, no hay descripción de la fuente	
C O M P A R A B I L I D A D	1. Los sujetos en grupos distintos son comparables (control de covariables)	a. Se controla para la covariable más importante (*) b. Se controla para otras covariables (*)	
E X P O S I C I Ó N	1. Determinación de la exposición	a. Registro seguro (*) b. Entrevista estructurada donde se ciega el estado caso control (*) c. Entrevista no cegada d. Autoinforme escrito o registro médico solamente e. Ninguna descripción	<i>“... identify new differentially enriched taxa and functional markers from the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)..” “We also constructed a new metagenomic linkage group (MLG) random forest model to differentiate controls from cases in T2DM” “BLASTP”</i>
	2. Mismo método de verificación de CyC	a. Sí (*) b. No	<i>“Sequencing data”</i>
	3. Tasa de no respuesta	a. La misma para ambos grupos (*) b. No se describe encuestados c. Tasa diferente y sin designación	<i>“Two of them were excluded as these two MLGs may be affected by the metformin”</i>

			JUSTIFICACIÓN
S E L E C C I Ó N	1. Representatividad de la muestra	a. Muy representativa (*) b. Ligeramente representativa (*) c. Grupos diana d. No descrito	<i>“...to profile the gut microbiota in 1,011 individuals with a range of blood glucose responses (discovery cohort) and validated our results in a second cohort (validation cohort; n = 484).”from the Gothenburg area, Sweden”</i>
	2. Tamaño de la muestra	a. Justificada y satisfactoria (*) b. No justificada	<i>n1 (discovery cohort) = 1011 n2 (validation cohort) = 484</i>
	3. No respondedores	a. Nº satisfactorio de respondedores (*) b. Nº de respondedores no satisfactorio c. No descrito	
	4. Evaluación de la exposición (al factor de riesgo)	a. Herramienta de medida validada (**) b. Herramienta no validada pero descrita (*) c. No descrito	<i>“Whole-genome shotgun sequencing (China NGDC), sequenced on an Illumina HiSeq 4000 instrument”</i>
C O M P A R A B I L I D A D	1. Los sujetos en grupos distintos son comparables (control de covariables)	a. Se controla para la covariable más importante (*) b. Se controla para otras covariables (*)	<i>“...adjusted for BMI, age, sex, and medication”</i>
R E S U L T A D O S	1. Evaluación del resultado	a. Evaluación mediante ciego independiente (**) b. Registro de asociación (**) c. Autoevaluación (*) d. No descrito	<i>“...divided into subgroups using the 1999 World Health Organization (Geneva) criteria”</i>
	2. Test estadístico	a. Descrito y apropiado (*) b. No descrito, inapropiado o incompleto	<i>“Wilcoxon, Kappa”</i>

			JUSTIFICACIÓN
S E L E C C I Ó N	1. Representatividad de la muestra	a. Muy representativa (*) b. Ligeramente representativa (*) c. Grupos diana d. No descrito	<i>“Four groups from the Shanghai Nicheng cohort study”</i>
	2. Tamaño de la muestra	a. Justificada y satisfactoria (*) b. No justificada	<i>n=182</i>
	3. No respondedores	a. Nº satisfactorio de respondedores (*) b. Nº de respondedores no satisfactorio c. No descrito	
	4. Evaluación de la exposición (al factor de riesgo)	a. Herramienta de medida validada (**) b. Herramienta no validada pero descrita (*) c. No descrito	<i>“...shotgun metagenomic sequencing on an Illumina HiSeq 4000 platform with 150 bp paired-end reads at BGI”</i>
C O M P A R A B I L I D A D	1. Los sujetos en grupos distintos son comparables (control de covariables)	a. Se controla para la covariable más importante (*) b. Se controla para otras covariables (*)	<i>“...adjusting for age”</i>
R E S U L T A D O S	1. Evaluación del resultado	a. Evaluación mediante ciego independiente (**) b. Registro de asociación (**) c. Autoevaluación (*) d. No descrito	<i>“The diagnosis of various glucose tolerance status was based on the 2003 American Diabetic Association diagnostic criteria”</i>
	2. Test estadístico	a. Descrito y apropiado (*) b. No descrito, inapropiado o incompleto	<i>“...Shapiro–Wilk test, single comparison between two groups was analyzed by Student’s t-test. Chi-squared test and one-way analysis of variance were used for comparisons of categorical and continuous data among groups, respectively, and multiple testing was corrected using Bonferroni post hoc test or Fisher’s LSD post hoc test”</i>

(X. Zhang et al., 2013) → 10

			JUSTIFICACIÓN
S E L E C C I Ó N	1. Representatividad de la muestra	a. Muy representativa (*) b. Ligeramente representativa (*) c. Grupos diana d. No descrito	<i>"121 adult subjects were enrolled in the study in Beijing, China"</i>
	2. Tamaño de la muestra	a. Justificada y satisfactoria (*) b. No justificada	<i>"Although the relatively low number of subjects was a limitation of the study, these findings enhance our understanding of the influence of changes in human gut microbiota on the pathogenesis of diabetes."</i>
	3. No respondedores	a. Nº satisfactorio de respondedores (*) b. Nº de respondedores no satisfactorio c. No descrito	
	4. Evaluación de la exposición (al factor de riesgo)	a. Herramienta de medida validada (**) b. Herramienta no validada pero descrita (*) c. No descrito	<i>"16SrDNA-based high-throughput sequencing"</i>
C O M P A R A B I L I D A D	1. Los sujetos en grupos distintos son comparables (control de covariables)	a. Se controla para la covariable más importante (*) b. Se controla para otras covariables (*)	<i>"The model was adjusted for BMI, age and sex as these might be confounding factors"</i>
R E S U L T A D O S	1. Evaluación del resultado	a. Evaluación mediante ciego independiente (**) b. Registro de asociación (**) c. Autoevaluación (*) d. No descrito	<i>"3 groups according to WHO criteria for the diagnosis of diabetes"</i>
	2. Test estadístico	a. Descrito y apropiado (*) b. No descrito, inapropiado o incompleto	<i>"ANOVA, Kruskal-Wallis, Pearson correlations..."</i>

			JUSTIFICACIÓN
S E L E C C I Ó N	1. Representatividad de la muestra	a. Muy representativa (*) b. Ligeramente representativa (*) c. Grupos diana d. No descrito	<i>“First Affiliated Hospital of Zhengzhou University”</i>
	2. Tamaño de la muestra	a. Justificada y satisfactoria (*) b. No justificada	<i>n= 316</i>
	3. No respondedores	a. Nº satisfactorio de respondedores (*) b. Nº de respondedores no satisfactorio c. No descrito	
	4. Evaluación de la exposición (al factor de riesgo)	a. Herramienta de medida validada (**) b. Herramienta no validada pero descrita (*) c. No descrito	<i>“... 16S rRNA Amplification, and Gene Sequencing (V3-V4 region)”</i>
C O M P A R A B I L I D A D	1. Los sujetos en grupos distintos son comparables (control de covariables)	a. Se controla para la covariable más importante (*) b. Se controla para otras covariables (*)	
R E S U L T A D O S	1. Evaluación del resultado	a. Evaluación mediante ciego independiente (**) b. Registro de asociación (**) c. Autoevaluación (*) d. No descrito	<i>“The diagnostic criteria of diabetes mellitus were as follows: (1) twice fasting plasma glucose (FPG)≥7.0 mmol/L (2) twice oral glucose tolerance test (OGTT)≥11,1 mmol/L, and (3) diabetic symptoms (polyuria, thirst, drinking more water, and unexplained weight loss) accompanied with twice random blood glucose ≥ 11.1 mmol/L”</i>
	2. Test estadístico	a. Descrito y apropiado (*) b. No descrito, inapropiado o incompleto	<i>“Mann-Whitney, Kruskal-Wallis...”</i>

Tabla 4. Evaluación individual del riesgo de sesgo de cada artículo incluido en el estudio