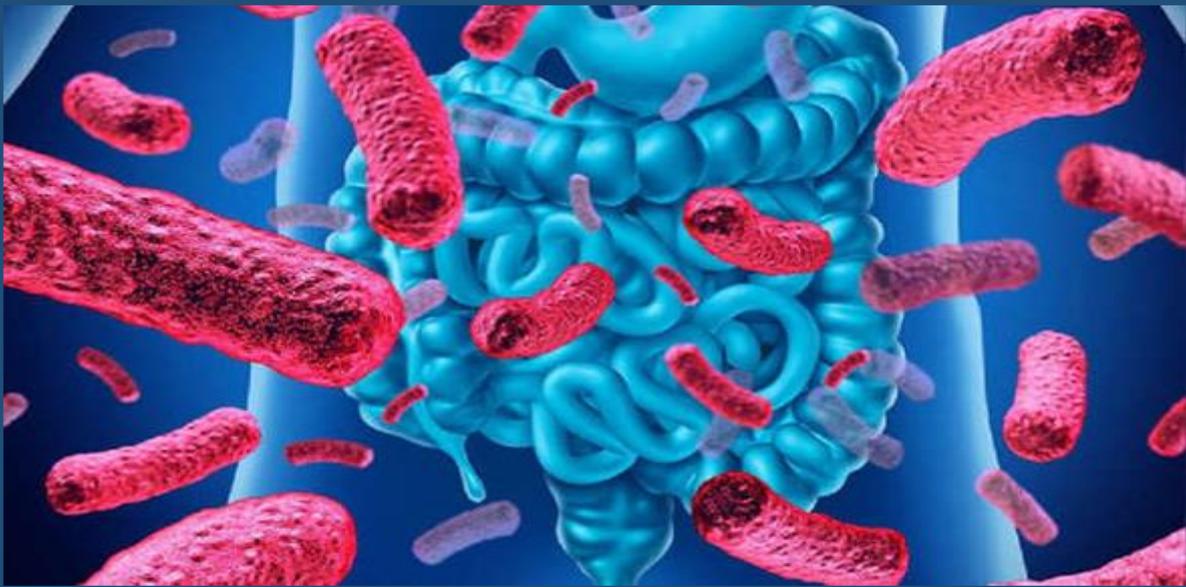


TESIS DOCTORAL

LA MICROBIOTA INTESTINAL COMO FACTOR PREDICTIVO ASOCIADO AL DESARROLLO Y REMISIÓN DE LA DIABETES MELLITUS TIPO 2 EN PACIENTES CON ENFERMEDAD CORONARIA: ESTUDIO CORDIOPREV



Cristina Vals Delgado

Dirigido por:

Prof. Dr. José López Miranda

Dr. Antonio Camargo García

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Programa de Doctorado: Biomedicina Año: 2022



TITULO: LA MICROBIOTA INTESTINAL COMO FACTOR PREDICTIVO
ASOCIADO AL DESARROLLO Y REMISION DE LA DIABETES
MELLITUS TIPO 2 EN PACIENTES CON ENFERMEDAD
CORONARIA: ESTUDIO CORDIOPREV

AUTOR: *Cristina Vals Delgado*

© Edita: UCOPress. 2022
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

[https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/
ucopress@uco.es](https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/ucopress@uco.es)



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA

**LA MICROBIOTA INTESTINAL COMO FACTOR PREDICTIVO
ASOCIADO AL DESARROLLO Y REMISIÓN DE LA DIABETES
MELLITUS TIPO 2 EN PACIENTES CON ENFERMEDAD
CORONARIA: ESTUDIO CORDIOPREV**

**THE GUT MICROBIOTA AS A PREDICTIVE FACTOR
ASSOCIATED WITH THE DEVELOPMENT AND REMISSION OF
TYPE 2 DIABETES MELLITUS IN PATIENTS WITH CORONARY
HEART DISEASE: FROM CORDIOPREV STUDY**

Trabajo presentado por

CRISTINA VALS DELGADO

Tesis

Programa de Doctorado: Biomedicina

Dirigido por

Prof. Dr. José López Miranda

Dr. Antonio Camargo García

Fecha de depósito de la tesis en el Idep:

09/02/2022

CÓRDOBA, 2021



TÍTULO DE LA TESIS: LA MICROBIOTA INTESTINAL COMO FACTOR PREDICTIVO ASOCIADO AL DESARROLLO Y REMISIÓN DE LA DIABETES TIPO 2 EN PACIENTES CON ENFERMEDAD CORONARIA: ESTUDIO CORDIOPREV

DOCTORANDO/A: CRISTINA VALS DELGADO

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

El trabajo de tesis realizado por Cristina Vals Delgado, bajo nuestra dirección en la Unidad de Lípidos y Arteriosclerosis del Hospital Universitario Reina Sofía/Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), se basó en evaluar el potencial de la composición de la microbiota intestinal como factor predictivo asociado al desarrollo y la remisión de la diabetes mellitus tipo 2 con el consumo de dos modelos dietas saludables, así como perfiles de riesgo específicos para cada una de las dietas en pacientes con enfermedad cardiovascular. Los resultados obtenidos responden a los objetivos planteado. En cuanto a su difusión, la doctoranda ha participado como autora en trabajos presentados en congresos científicos de ámbito nacional e internacional, presentando un total de 10 comunicaciones orales y de tipo póster entre congresos y jornadas científicas como primera autora. Obtuvo premio Mención Especial en el congreso nacional de la Sociedad Española de Arteriosclerosis en 2017, 2018 y 2019. Así mismo, dichos resultados han conseguido la suficiente calidad y relevancia científica como para derivar en 3 publicaciones originales en revistas internacionales de primer decil y cuartil.

- 1. Vals-Delgado C[#]**, Alcalá-Díaz JF[#], Roncero-Ramos I, Leon-Acuña A, Molina-Abril H, Gutiérrez-Mariscal FM, Romero-Cabrera JL, de la Cruz-Ares S, van Ommen B, Castaño JP, Ordovas JM, Pérez-Martínez P, Delgado-Lista J, Camargo A^{*}, López-Miranda J^{*}. A microbiota-based predictive model for type 2 diabetes remission induced by dietary intervention: From the CORDIOPREV study. *Clin Transl Med.* 2021 Apr;11(4): e326. doi:10.1002/ctm2.326. ^{#,*} These authors contributed equally to this work. Factor de impacto: **11,492 (D1)**
- 2. Vals-Delgado C^{*}**, Alcalá-Díaz JF^{*}, Molina-Abril H, Roncero-Ramos I, Caspers MPM, Schuren FHJ, Van den Broek TJ, Luque R, Pérez-Martínez P, Katsiki N, Delgado-Lista J, Ordovas JM, van Ommen B, Camargo A[#], López-Miranda J[#]. An altered microbiota pattern precedes Type 2 diabetes mellitus development: From the CORDIOPREV study. *J Adv Res.* 2022 Jan;35:99-108. doi:10.1016/j.jare.2021.05.001. ^{*,#} These authors contributed equally to this work. Factor de impacto: **10,479 (Q1)**
- 3. Camargo A^{*} Vals-Delgado C^{*}**, Alcalá-Díaz JF, Villasanta-González A, Gómez-Delgado F, Haro C, Leon-Acuña A, Cardelo MP, Torres-Peña JD, Guler I, Malagón MM, Ordovas JM, Pérez-Martínez P, Delgado-Lista J[#], López-Miranda J[#]. A Diet-Dependent Microbiota Profile Associated with Incident Type 2 Diabetes: From the CORDIOPREV Study. *Mol Nutr Food Res.* 2020 Oct;16:e2000730. doi:10.1002/mnfr.202000730. ^{*,#} These authors contributed equally to this work. Factor de impacto: **5,914 (Q1)**

A nuestro juicio, el trabajo realizado por la doctoranda Cristina Vals Delgado reúne los méritos suficientes para ser defendido ante el tribunal correspondiente y poder optar al grado de Doctor por la Universidad de Córdoba. Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 6 de febrero de 2022

Firma del/de los director/es

LOPEZ

MIRANDA JOSE

- 30477760T

Firmado digitalmente
por LOPEZ MIRANDA

JOSE - 30477760T

Fecha: 2022.02.06
23:14:27 +01'00'

Fdo.: Prof. Dr. José López Miranda

Antonio
Camargo
García

Firmado
digitalmente por
Antonio Camargo
García

Fecha: 2022.02.06
19:37:21 +01'00'

Fdo.: Dr. Antonio Camargo García

INFORME SOBRE LA CALIDAD DE LAS PUBLICACIONES DE LA TESIS

Original article

1. **Vals-Delgado C***, Alcalá-Díaz JF^{*}, Molina-Abril H, Roncero-Ramos I, Caspers MPM, Schuren FHJ, Van den Broek TJ, Luque R, Perez-Martinez P, Katsiki N, Delgado-Lista J, Ordovas JM, van Ommen B, Camargo A[#], Lopez-Miranda J[#]. An altered microbiota pattern precedes Type 2 diabetes mellitus development: From the CORDIOPREV study. *J Adv Res.* 2022 Jan;35:99-108. doi:10.1016/j.jare.2021.05.001. ^{*,#} These authors contributed equally to this work.

Factor de impacto de la revista (JCR): **10,479**

Categoría: MULTIDISCIPLINARY SCIENCES

Puesto: 9/73; **Q1**

2. Camargo A^{*} **Vals-Delgado C***, Alcalá-Díaz JF, Villasanta-Gonzalez A, Gomez-Delgado F, Haro C, Leon-Acuña A, Cardelo MP, Torres-Peña JD, Guler I, Malagon MM, Ordovas JM, Perez-Martinez P, Delgado-Lista J[#], Lopez-Miranda J[#]. A Diet-Dependent Microbiota Profile Associated with Incident Type 2 Diabetes: From the CORDIOPREV Study. *Mol Nutr Food Res.* 2020 Oct;16:e2000730. doi:10.1002/mnfr.202000730. ^{*,#} These authors contributed equally to this work.

Factor de impacto de la revista (JCR): **5,914**

Categoría: FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY

Puesto: 16/144; **Q1**

Letter to the editor

3. **Vals-Delgado C[#]**, Alcalá-Díaz JF[#], Roncero-Ramos I, Leon-Acuña A, Molina-Abril H, Gutierrez-Mariscal FM, Romero-Cabrera JL, de la Cruz-Ares S, van Ommen B, Castaño JP, Ordovas JM, Perez-Martinez P, Delgado-Lista J, Camargo A^{*}, Lopez-Miranda J^{*}. A microbiota-based predictive model for type 2 diabetes remission induced by dietary intervention: From the CORDIOPREV study. *Clin Transl Med.* 2021 Apr;11(4): e326. doi:10.1002/ctm2.326. ^{*,#} These authors contributed equally to this work.

Factor de impacto de la revista (JCR): **11,492**

Categoría: MEDICINE, RESEARCH & EXPERIMENTAL

Puesto: 10/140; **D1**

AGRADECIMIENTOS

Mi más profundo agradecimiento a todas las personas que han hecho posible de alguna forma que esta tesis haya podido realizarse, que han confiado en mí y me han brindado su cariño y ayuda, encontrado en ellos el apoyo necesario para alcanzar esta meta. GRACIAS DE CORAZÓN.

En primer lugar, quisiera agradecer a mis directores de tesis por ser excelentes mentores y concederme el honor de realizar la tesis bajo su dirección conjunta. Al ilustre Pr. Dr. José López Miranda por acogerme en un grupo de investigación tan prestigioso y por permitirme aprender de él, toda una eminencia y un referente el campo de la medicina e investigación biomédica. Es todo un privilegio haber recibido todos sus consejos profesionales y sus orientaciones que me han guiado en este camino. Mi mayor gratitud además por alentarme en todo momento y cultivar en mí la semilla del esfuerzo y la paciencia. Al Dr. Antonio Camargo por ser otro excelente director e investigador que me ha enseñado tanto y ha estado ayudándome siempre que he necesitado. Gracias por ser tan generoso conmigo, por tu dedicación e involucración, por haberte “estrujado el coco” conmigo y por confiar siempre en mí, nunca serán suficiente las gracias hacia ti.

Muchísimas gracias al Dr. Oriol Rangel Zúñiga, sobresaliente investigador que me ha ayudado con la mejor de las predisposiciones, mi mayor reconocimiento por ser ejemplo de trabajo en equipo. Gracias infinitas por las explicaciones, por todo el cariño, el cual es mutuo, y por aportar siempre positividad y toques de humor haciendo menos pesado los días más largos. A la Dr. Irene Roncero Ramos, gran compañera, quisiera darle las gracias por compartir conmigo su experiencia y profesionalidad, así como recibir su asesoramiento. A la Dra. Elena Yubero y al Dr. Francisco M. Gutiérrez Mariscal por apoyarme durante estos años. A la Dr. Silvia de la Cruz Ares por ser tan detallista con los demás, por su humildad y por ser excelente compañera, así como una investigadora ejemplar. A la Dr. Rosa Jiménez-Lucena, una magnífica predecesora y un ejemplo a seguir, que además es una persona con un corazón enorme, pues le nace siempre ofrecer ayuda a los demás.

Gracias a todos los compañeros de Medicina Interna, en especial, al Dr. Pablo Pérez Martínez y Dr. Javier Delgado Lista por sus conocimientos contribuyendo desde la perspectiva clínica y, al Dr. Juan F. Alcalá Díaz por su sabiduría y su trabajo como clínico.

Gracias a los veteranos del laboratorio Andrés y “Charo”. Especialmente, quisiera expresar mi gratitud hacia a Andrés por ayudarme y compartir tantos momentos de trabajo, por su amistad y por ser una de las personas más resolutivas que conozco. También, a las nutricionistas del grupo por su dedicación a los pacientes, particularmente a la Dr. Gracia, por ser tan servicial y tan buena profesional.

Muchísimas gracias a todos mis compañeros predoctorales, estudiantes o ayudantes técnicos que me han acompañado en algún periodo de esta etapa, Bárbara, Laura, Andreea, Carolina, Alejandro, Maleni, Lisa, “Isa”, “Maite”, María Jesús, Silvia, Alicia, M^a Eugenia, Natalia y Helena. Existe otra familia distinta a la del hogar, y esa familia sois vosotros, con quienes he compartido gran parte de mi vida diaria, pues hemos pasado más horas juntos dentro y fuera del IMIBIC que en nuestra propia casa. Esto ha hecho que hayamos creado entre nosotros vínculos muy fuertes de amistad y compañerismo, sin duda lo mejor de esta etapa. Con mención especial a Alejandro, mi compañero agapornis, gracias por preocuparte siempre por mí y por formar el mejor de los tandems. También a “Maleni”, que sé que va a seguir formando parte de mi vida para siempre, gracias por tus mimos, por escucharme, por ser compañera incansable de bailes fuera del trabajo y por ser tan buena conmigo, te quiero amiga. Me siento muy afortunada por haberos conocido, escribiendo esto me afloran muchos sentimientos bonitos y recuerdos de momentos inolvidables que me emocionan. También a mi niñas, Alicia, M^a Eugenia, Natalia y Helena, las mejores. Habéis creado un clima de trabajo muy bonito, os hacéis querer con vuestra forma de ser. Me hubiera gustado que llegarais antes al grupo para haber compartido más años y momentos sin pandemia con vosotras. Aun así, hemos forjado una bonita amistad y os tengo un cariño especial, gracias desde el fondo de mi ser por todo vuestro apoyo, amor, empatía y complicidad.

En definitiva, mi más sinceras gracias a todo el grupo GC09. Nutrigenómica y Síndrome Metabólico. En vosotros he encontrado esa mano que te sostiene fuerte para que no toques el suelo cuando caigas, te ayuda a levantarte y a coger impulso en los momentos más difíciles. Gracias por haberos cruzado en mi camino y llenarme el corazón de alegría y risas mis queridos compañeros.

Agradecer también al Ministerio de Economía y Competitividad, concederme la beca (BES-2016-077476), por financiar el trabajo y servirme en todo momento de soporte económico. También quiero dar mi agradecimiento al resto de instituciones que han

permitido con su financiación, infraestructuras u ofertas de enseñanza la realización de esta tesis, IMIBIC, al Hospital Universitario Reina Sofía, al Servicio Andaluz de Salud y al CIBER, Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición y Universidad de Córdoba.

Quisiera agradecer con el mayor de los énfasis a mis amigos de toda la vida, los que conocí en el colegio e instituto, los cuales han seguido estando ahí para mí y me han apoyado durante este largo camino: “Bea”, Anabel, “Inma”, “Fran”, “Ale” y “Ely”. Gracias por aguantar mis diferentes rachas y estados de ánimos durante esta etapa, por comprender mi motivación y reforzarla, porque la ausencia presencial a causa de la distancia no haya hecho cambiar nada cada vez que nos reencontramos y por vuestras palabras de amor que tanto ánimo y fuerzan me dan.

Pero, sobre todo, gracias con toda mi alma y mi corazón A MIS PADRES. Las palabras no pueden describir lo agradecida que estoy por vuestro apoyo y empatía incondicional, así como por haberme ayudado y aconsejado siempre. Todo lo que soy como persona y todo lo que consiga en esta vida es gracias a vosotros. Gracias por la educación y los valores recibidos, por vuestro sacrificio para proporcionarme unos estudios universitarios y el sustento para ello, por inculcarme valentía, laboriosidad y perseverancia para lograr mis metas y por querer siempre lo mejor para mí. Sois mi pilar fundamental, os quiero. Por último, quiero dar millones de gracias infinitas a mi suerte en la vida, “Vicen”, por aportarme la paz y serenidad que he necesitado, por valorarme y demostrármelo, por ser mi amparo y una fuente de motivación constante, por creer en mí, por sus ánimos, por su comprensión, por cuidar de mí y por su amor, te quiero.

“Si no conozco una cosa, la investigaré”

— **Louis Pasteur.**

“Lo importante en la ciencia no es tanto obtener nuevos datos, sino descubrir nuevas formas de pensar sobre ellos”

— **William Lawrence Bragg.**

“La ciencia siempre vale la pena porque sus descubrimientos, tarde o temprano siempre se aplican”

— **Severo Ochoa.**

“Todo el mundo sabe que en la investigación no hay respuestas finales, sólo ideas que permiten formular nuevas preguntas”.

— **Salvador Luria.**

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
I. RESUMEN	5
II. INTRODUCCIÓN	15
1. Diabetes mellitus.....	15
1.1 Antecedentes históricos de la diabetes mellitus.....	15
1.2 Aspectos clínicos y clasificación	16
1.3 Diagnóstico de la diabetes mellitus.....	17
2. Diabetes mellitus tipo 2.....	19
2.1 Epidemiología.....	20
2.2 Complicaciones de la diabetes mellitus tipo 2.....	23
2.3 Factores de riesgo.....	27
2.4 Prevención de la diabetes mellitus tipo 2: importancia de la dieta y el estilo de vida.....	29
2.5 Remisión de la diabetes mellitus tipo 2	30
2.6 Mecanismos que intervienen en la patogénesis de la diabetes mellitus tipo 2.....	32
2.7 Diabetes mellitus tipo 2, obesidad y resistencia a la insulina: inflamación como punto convergente	35
2.8 Importancia del papel del intestino en la diabetes mellitus tipo 2.....	38
3. Microbiota intestinal	40
3.1 Microbiota intestinal y obesidad	44
3.2 Microbiota intestinal y diabetes mellitus tipo 2.....	45
3.3 Mecanismos por los cuales la microbiota intestinal podría contribuir en la fisiopatología de la diabetes mellitus tipo 2.....	48
3.3.1 Permeabilidad de la barrera epitelial intestinal y endotoxemia metabólica.....	48
3.3.2 Asociación de la microbiota intestinal con los niveles plasmáticos de BCAAs y resistencia a la insulina	54
3.3.3 Ácidos grasos de cadena corta en el metabolismo del huésped y regulación de la inflamación.....	55
3.3.4 Efectos de la interacción entre microbiota intestinal y ácidos biliares en el metabolismo	63
3.4 La interacción entre dieta y microbiota como aproximación en enfermedades metabólicas.....	69
3.4.1 Dieta como modulador de la microbiota intestinal	69
3.4.2 La microbiota intestinal como factor determinante de la respuesta metabólica a la dieta	75
III. HIPÓTESIS	79
IV. OBJETIVOS	82
V. MARCO GENERAL DEL CONTENIDO DE LA INVESTIGACIÓN: ESTUDIO CORDIOPREV ..	84
1. Población del estudio CORDIOPREV	84
2. Diseño del estudio y evaluación dietética.....	85
3. Aleatorización.....	86

4.	Determinaciones bioquímicas	86
VI. CAPÍTULO 1. <i>Aborda: Objetivo específico 1.</i>		88
<i>Publicación n°1:</i> Vals-Delgado C. et al. “A microbiota-based predictive model for type 2 diabetes remission induced by dietary intervention: from the CORDIOPREV study”. <i>Clin Trans Med.</i> (2021).		88
1.	MATERIALES Y MÉTODOS- CAPÍTULO 1	89
1.	<i>Población de estudio</i>	89
2.	<i>Test OGTT</i>	90
3.	<i>Test de sobrecarga oral grasa</i>	90
4.	<i>Determinación de LPS</i>	91
5.	<i>Análisis de la microbiota intestinal</i>	91
6.	<i>Construcción de modelos predictivos y curvas ROC</i>	92
7.	<i>Construcción de una escala de clasificación numérica (en inglés “score”) de predicción de respuesta basada en la microbiota</i>	93
8.	<i>Análisis estadístico</i>	93
2.	RESULTADOS- CAPÍTULO 1	95
1.	<i>Características basales de la población de estudio</i>	95
2.	<i>Diferencias en la microbiota intestinal basal en función de la respuesta a la intervención dietética</i>	97
3.	<i>Modelo predictivo “random forest” para la remisión de la DMT2 inducida mediante intervención dietética</i>	99
4.	<i>Evaluación basada en la microbiota intestinal de la probabilidad de la respuesta de remisión de la DMT2 inducida mediante intervención dietética</i>	101
5.	<i>Relación entre la puntuación de predicción de respuesta basada en la microbiota intestinal y el aumento postprandial de los niveles plasmáticos de LPS</i>	102
3.	DISCUSIÓN-CAPÍTULO 1.....	105
VII. CAPÍTULO 2. <i>Aborda: Objetivo específico 2.</i>		109
<i>Publicación n°2:</i> Vals-Delgado C. et al. “An altered microbiota pattern precedes Type 2 diabetes mellitus development: from the CORDIOPREV study”. <i>J Adv Res.</i> (2022).		109
1.	MATERIALES Y MÉTODOS- CAPÍTULO 2	110
1.	<i>Población de estudio</i>	110
2.	<i>Test OGTT</i>	110
3.	<i>Análisis de la microbiota intestinal</i>	110
4.	<i>Creación de modelos de predicción</i>	111
5.	<i>Creación de una escala de clasificación numérica de riesgo basada en la microbiota intestinal</i>	112
6.	<i>Análisis estadístico</i>	112
2.	RESULTADOS- CAPÍTULO 2	114
1.	<i>Características basales de la población de estudio</i>	114
2.	<i>Diferencias en la composición de la microbiota intestinal entre los grupos de estudio</i>	114
3.	<i>Modelo predictivo “random forest” para el desarrollo de la DMT2</i>	116

4. Evaluación del riesgo de desarrollo de la DMT2 basada en la microbiota intestinal.....	119
5. Relación entre la escala de clasificación numérica de estimación del riesgo de DMT2 basada en la microbiota intestinal y los índices derivados del OGTT.....	122
3. DISCUSIÓN- CAPÍTULO 2.....	123
VIII. CAPÍTULO 3. <i>Aborda: Objetivo específico 3</i>	129
<i>Publicación n°3: Camargo A*, Vals-Delgado C* et. al. “A Diet-Dependent Microbiota Profile Associated with Incident Type 2 Diabetes: From the CORDIOPREV Study”. Mol Nutr Food Res. (2020) *These authors contributed equally to this work.</i>	129
1. MATERIALES Y MÉTODOS- CAPÍTULO 3.....	130
1. Población del estudio.....	130
2. Test OGTT.....	130
3. Análisis de la microbiota intestinal.....	130
4. Selección de los taxones bacterianos a incluir en las escalas de clasificación numérica.....	132
5. Creación de una escala de clasificación numérica basada en la microbiota intestinal y específica de la dieta consumida para estimar el riesgo de DMT2	132
6. Análisis estadístico.....	133
2. RESULTADOS- CAPÍTULO 3.....	134
1. Características basales de la población de estudio.....	134
3. El perfil de la microbiota intestinal basal de los pacientes incidentes de DMT2 es diferente entre ambos grupos dietéticos	138
4. Construcción de escalas de clasificación numéricas de evaluación del riesgo de desarrollo de DMT2 específicas del modelo dietético usando el modelo RSF.....	139
5. Evaluación de las escalas de clasificación numéricas basadas en los modelos RSF para estimar el riesgo de DMT2 específicas del modelo dietético.....	143
6. Construcción de escalas de clasificación numéricas de evaluación del riesgo de desarrollo de DMT2 específicas del modelo dietético usando el modelo “Lasso-Cox Regression”	145
7. Evaluación de las escalas de clasificación numéricas basada en los modelos “Lasso-Cox Regression” para estimar el riesgo de DMT2 específicas del modelo dietético.....	146
3. DISCUSIÓN-CAPÍTULO 3.....	148
IX. DISCUSIÓN GENERAL	154
X. CONCLUSIONES.....	160
XI. REFERENCIAS	163
XII. PUBLICACIONES	193
XIII. MATERIAL SUPLEMENTARIO	195
1. Material suplementario de la publicación n°1: “A microbiota-based predictive model for type 2 diabetes remission induced by dietary intervention: from the CORDIOPREV study”	195
2. Material suplementario de la publicación n°2: “An altered microbiota pattern precedes Type 2 diabetes mellitus development: from the CORDIOPREV study”	204

3.	Material suplementario de la publicación nº3: “A Diet-Dependent Microbiota Profile Associated with Incident Type 2 Diabetes: From the CORDIOPREV Study”	210
XIV.	ANEXOS	220
	ANEXO 1. Cuestionario de riesgo de diabetes FINDRISC.....	220
	ANEXO 2. Cuestionario de riesgo de diabetes de la ADA.....	221
	ANEXO 3. Certificados de menciones derivadas de la tesis	222

ABREVIATURAS

Las abreviaturas más comúnmente utilizadas en el texto se detallan a continuación:

2h PG	Glucosa plasmática tras 2 horas del OGTT
ADA	Asociación de Diabetes Americana
AHA	American Heart Association
AUC	Área bajo la curva (area under the curve)
AGEs	Productos de glicación avanzada
AGLs	Ácidos grasos libres
AMPK	AMP-proteína quinasa
AMPs	Proteínas antimicrobianas
ARNr	ARN ribosómico
BCAAs	Aminoácidos de cadena ramificada (branched-chain amino acids)
CCA	Acetil-CoA carboxilasa
CHD	Enfermedad coronaria (Coronary heart disease)
CORDIOPREV	CORonary Diet Intervention with Olive oil and cardiovascular PREvention study
CORDIOPREV-DIRECT	DIabetes REgresion CORDIOPREV Trial
DASH	Dietary Approaches to Stop Hypertension
DI	Disposition index
DMT2	Diabetes mellitus tipo 2
DPP	Diabetes Prevention Program
ECV	Enfermedad cardiovascular arteriosclerótica
ENTs	Enfermedades no transmisibles
ER	Retículo endoplásmico
ERC	Enfermedad renal crónica
ERT	Enfermedad renal terminal
FGF19	Factor de crecimiento de fibroblastos 19
FID	Federación Internacional de la Diabetes
FINDRISC	Finnish Diabetes Risk Score
FPG	Glucosa plasmática en ayunas (fasting plasma glucose)
FXR	Receptor X farnesoide
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GAD	Glutamato descarboxilasa
GIP	Polipéptido insulínico dependiente de la glucosa
GLP-1	Péptido 1 similar al glucagón
GLP-1R	Receptores de GLP-1
GPCR/GPR	Receptor acoplado a la proteína G
HbA1c	Hemoglobina glicada
HDAC	Histonas desacetilasas
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HIF1α	Subunidad alfa del factor 1 inducible por hipoxia
HIRI	Índice de resistencia hepática a la insulina (Hepatic insulin resistance index)
HOMA-IR	Homeostasis model assessment of insulin resistance
HR	Cociente de riesgo (Hazard ratio)

IAPP	Polipéptido amiloide de los islotes
IC	Intervalo de confianza
IgA	Inmunoglobulina A
IGI	Índice insulínogénico
IKKB	Quinasa del factor nuclear kappa B
IL-1β	Interleucina-1 beta
IL-6	Interleucina-6
IM	Infarto de miocardio
IMC	Índice de masa corporal
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IRS-1	Sustrato 1 del receptor de insulina
ISI	Índice de sensibilidad a la insulina
JNK	Quinasa amino terminal JUN
Lasso	Least absolute shrinkage and selection operator
LBP	Proteína de unión a LPS
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LEfSe	Análisis discriminante lineal, efecto-tamaño (Linear discriminant analysis Effect Size)
LF	Dieta baja en grasas
LPS	Lipopolisacárido
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos 1
MCT-1	Transportador de monocarboxilato 1
MD-2	Factor de diferenciación mieloide 2
Med	Dieta Mediterránea
MEDAS	Cuestionario de evaluación de la adherencia a la dieta mediterránea (Mediterranean Diet Adherence Screener)
MISI	Índice de sensibilidad a la insulina muscular (Muscle insulin sensitivity index)
MUFA	Ácidos grasos monoinsaturados (monounsaturated fatty acids)
mTORC1	Complejo mecánico de la rapamicina 1
NF-κB	Factor nuclear kappa B
NHANES	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
OGTT	Test de sobrecarga oral de glucosa
OMS	Organización Mundial de la Salud
OTU	Unidad taxonómica operativa (Operational taxonomic unit)
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
P-CR	Proteína C reactiva
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa
PPAR	Receptores activados por proliferadores de peroxisoma
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados (polyunsaturated fatty acids)
QIIME	Quantitative Insights Into Microbial Ecology
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RSF	Random Survival Forest
SCFAs	Ácidos grasos de cadena corta (short chain fatty acids)
SD	Desviación estándar (standard deviation)

SEM	Error estándar de la media (standard error of the mean)
SFA	Ácidos grasos saturados (saturated fatty acids)
SMCT-1	Transportador de monocarboxilato acoplado al sodio 1
Tjp-1	Proteína de unión estrecha-1
TJs	Proteínas de unión estrecha (Tight junction)
TLR	Receptor de tipo Toll (Toll-like receptor)
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa
TRIF	Molécula adaptadora de TLR1
UCP	Proteína de desacoplamiento
VSG	Gastrectomía vertical en manga
Zn-T8	Transportador de zinc 8
ZO-1	Zónula occludens-1

I. RESUMEN

I. RESUMEN

1. Introducción o motivación de la tesis. La prevalencia de la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) se ha incrementado en las últimas décadas suponiendo un grave problema de salud mundial. Ante esta situación, es crucial identificar los pacientes de alto riesgo, para evitar el desarrollo de la enfermedad, así como aquellos subgrupos a los que se pueden aplicar con éxito recomendaciones dietéticas para prevenir o remitir la diabetes, o bien, requieren otro tipo de tratamiento. Esto es especialmente importante en pacientes con enfermedad coronaria (CHD), pues la presencia simultánea de ambas enfermedades aumenta significativamente el riesgo de desarrollar un nuevo evento cardiovascular y, por tanto, un incremento en la mortalidad. En este sentido, el uso de técnicas computacionales automáticas para el reconocimiento de patrones a partir de un conjunto complejo de datos (en inglés, “*machine learning*”) son prometedoras y podrían ayudar a identificar nuevos factores asociados al riesgo o la remisión mejorando la predicción.

La evidencia científica actual sugiere que la microbiota intestinal podría influir en la fisiopatología de la DMT2, por su potencial impacto en la inflamación y metabolismo del huésped. Recientemente, alteraciones de la microbiota intestinal han sido identificadas no solo en pacientes con DMT2, cuya microbiota podría estar afectada por la medicación hipoglucemiante, sino también en los pacientes con DMT2 sin tratamiento y prediabetes, sugiriéndose la existencia de patrones específicos de microbiota asociados a la DMT2. No obstante, se necesita una mayor evidencia sobre un posible papel causal o valor predictivo de la microbiota intestinal. En este sentido, sería de interés estudios prospectivos para la búsqueda de patrones microbianos que pudieran mejorar la predicción de la enfermedad. Es por ello, que en este trabajo se ha analizado la microbiota intestinal de los pacientes años antes del desarrollo de DMT2 abordando dicha investigación.

Por otra parte, hay una variación significativa en las respuestas interindividuales a las intervenciones dietéticas. La dieta es uno de los aspectos esenciales de las modificaciones en el estilo de vida recomendadas para el tratamiento y prevención de la DMT2, siendo esta una alternativa al tratamiento farmacológico, a menos que el nivel de hiperglucemia requiera un tratamiento médico inmediato. Por tanto, es importante descubrir perfiles clínicos y/o bilógicos que se asocien con la eficacia de las estrategias dietéticas, con los cuales se podrían identificar que individuos se beneficiaran en mayor

medida de su consumo para prevenir o revertir la enfermedad. Además, la predicción de la respuesta específica a una dieta determinada permitiría realizar tratamientos nutricionales individualizados. La interacción entre dieta y microbiota intestinal como determinante del estado de salud cada vez está siendo más investigada. Recientemente, se ha sugerido que la respuesta metabólica a una intervención dietética por parte del organismo huésped está asociado con la composición de la microbiota intestinal. Por ello, la composición de la microbiota intestinal podría servir para predecir la capacidad de respuesta a las intervenciones dietéticas, lo que a su vez tendría una relevancia potencial en el campo de la nutrición personalizada.

Basándonos en estos antecedentes, nuestra hipótesis es que patrones específicos de microbiota intestinal podrían ayudar a identificar aquellos pacientes que se beneficiarían de intervenciones dietéticas saludables experimentando una remisión de la DMT2, así como alteraciones de la microbiota intestinal podrían preceder al desarrollo de diabetes y potencialmente mejorar la predicción del riesgo de desarrollo de DMT2. Adicionalmente, podría determinar el riesgo específico de DMT2 asociado al consumo de distintas dietas.

2. Contenido de la investigación.

Objetivo principal. Evaluar el potencial de la composición de la microbiota intestinal como factor predictivo asociado al desarrollo y la remisión de la DMT2 con el consumo de dos modelos dietas saludables (la dieta baja en grasa (LF) y la dieta Mediterránea (Med)), así como perfiles de riesgo específicos para cada una de las dietas, en pacientes con CHD del estudio CORDIOPREV.

Objetivos específicos:

1. Evaluar si la composición de la microbiota intestinal, combinada con las variables clásicas asociadas al riesgo de DMT2, puede mejorar la predicción de la remisión de la DMT2 inducida por el consumo de dos dietas saludables, LF o Med, en pacientes con DMT2 de reciente diagnóstico y CHD del estudio CORDIOPREV.
2. Estudiar si la composición de la microbiota intestinal, combinada con las variables clínicas de riesgo, podría mejorar la predicción de casos incidentes de DMT2 en pacientes con CHD, en el marco del estudio CORDIOPREV.

3. Explorar las diferencias entre la microbiota intestinal basal de los pacientes que desarrollaron DMT2 mientras consumían una dieta LF y los que consumían la dieta Med y, evaluar los riesgos específicos para cada dieta que permitan valorar o predecir el riesgo individual de DMT2 asociado al consumo de cada una de las dietas en el marco del estudio CORDIOPREV.

Participantes, diseño y metodología. Esta tesis se ha desarrollado en el marco del estudio CORDIOPREV, un estudio prospectivo, randomizado y controlado realizado en 1002 pacientes con CHD, asignados aleatoriamente a uno de los dos modelos de dieta (dieta Med o LF) durante un período de siete años de seguimiento.

Publicación 1: En este trabajo se incluyeron todos los pacientes con DMT2 de reciente diagnóstico y sin tratamiento hipoglucemiante al inicio del estudio CORDIOPREV (n=190). Se analizó la microbiota intestinal basal mediante el gen de ARNr 16S en aquellos pacientes de los que se disponía de muestra fecal y que no habían recibido tratamiento antibiótico en los tres meses anteriores a su recogida (n=110). En 73 pacientes de ellos (44 con muestra fecal viable) la DMT2 remitió durante el periodo de seguimiento de 5 años. Se realizaron modelos predictivos usando el algoritmo de aprendizaje automático “Random Forest”, análisis de curvas ROC y de regresión de Cox. Además, se determinó los niveles plasmáticos de LPS en ayunas y tras 4h de una prueba de sobrecarga lipídica al inicio del estudio.

Publicación 2: En este trabajo se incluyeron todos los pacientes sin DMT2 al inicio del estudio CORDIOPREV (n=462) y se analizaron todos aquellos con disponibilidad de muestra fecal basal que no habían consumido antibióticos en los tres meses previos a su recogida (n=273). De entre ellos, 107 pacientes (64 con muestra fecal viable) desarrollaron DMT2 de acuerdo con los criterios de diagnóstico de la ADA tras una mediana de seguimiento de 60 meses. La microbiota intestinal basal fue analizada mediante secuenciación del gen de ARNr 16S y se crearon modelos predictivos usando el algoritmo de aprendizaje automático “Random Forest”. Los modelos fueron evaluados mediante análisis de curvas ROC y el riesgo de desarrollar DMT2 en función de la microbiota inicial mediante análisis de Cox.

Publicación 3: En este trabajo se incluyeron todos los pacientes no diagnosticados con DMT2 al inicio del estudio CORDIOPREV (n=462) con disponibilidad de muestra fecal

basal y sin recibir tratamiento con antibióticos el mes previo su recogida (n=319), aleatorizados para recibir una dieta LF (n=148, de los cuales 28 desarrollaron diabetes) o la dieta Med (n=171, de los cuales 41 desarrollaron diabetes). Se analizó la microbiota intestinal mediante la secuenciación del gen de ARNr 16S, se crearon estimaciones del riesgo basadas en la microbiota intestinal para cada dieta utilizando dos enfoques predictivos (modelos RSF y Lasso) y, se evaluó el riesgo de DMT2 tras una mediana de seguimiento de 60 meses mediante análisis Cox.

Resultados.

Publicación 1: El modelo de predicción de remisión de DMT2 construido exclusivamente con las variables asociadas al riesgo de DMT2 (variables incluidas en el test de riesgo FINDRISC y test de riesgo de la ADA, HDL, triglicéridos y HbA1c) mostró un área bajo la curva ROC de $0,698 \pm 0,152$, mientras que en el modelo generado al combinarlas con los datos de composición basal de la microbiota intestinal el poder de predicción mejoró, aumentando el área a $0,822 \pm 0,135$. Además, la estimación de respuesta a la intervención con una escala de clasificación numérica (en inglés “score”) basada en la microbiota intestinal, que incluía los diez géneros más discriminantes entre aquellos pacientes que remitieron y aquellos que continuaron siendo diabéticos, reveló una mayor probabilidad de remisión de la DMT2 asociada a valores elevados de la escala de clasificación numérica en comparación con valores bajos de dicha escala (Hazard Ratio: 3,195; IC del 95%: 1,37-7,48). Además, esta escala de clasificación se asoció negativamente con el aumento de LPS postprandial ($\chi^2=0,015$).

Publicación 2: Identificamos un perfil de microbiota intestinal asociado al desarrollo de DMT2 mediante un modelo predictivo basado en la composición de la microbiota intestinal. La combinación de los datos de la microbiota intestinal a los parámetros clínicos (variables incluidas en el test de riesgo FINDRISC y el test de la ADA, HDL, triglicéridos y HbA1c) mejoró la predicción del desarrollo de DMT2, aumentando el área bajo la curva ROC de 0,632 a 0,946 en el conjunto de datos de prueba. Además, una escala de clasificación numérica (en inglés “score”) basada en la microbiota intestinal, que incluía los diez géneros más discriminantes, estimó la probabilidad de desarrollar DMT2 en los pacientes de manera que valores elevados en la escala se asociaron con una mayor probabilidad del desarrollo de DMT2 en comparación con valores bajos (HR: 3,22, IC del 95%: 1,56-6,66).

Publicación 3: El análisis lineal discriminante del tamaño del efecto (LEfSe) mostró una microbiota intestinal inicial diferente entre los pacientes que desarrollaron DMT2 consumiendo la dieta LF y la Med. Así mismo, la estimación del riesgo basada en la microbiota asoció un mayor riesgo de desarrollo de DMT2 con una mayor abundancia de *Paraprevotella*, y una menor de *Gammaproteobacterias* y *B. uniformis* (HR=3,66 puntuación RSF-LF, 3,15 puntuación Lasso-LF; IC 95%) cuando una dieta LF fue consumida. Por el contrario, una mayor abundancia de *Saccharibacterias*, *Betaproteobacterias* y *Prevotella* se asoció al riesgo de DMT2 (HR=4,00 puntuación RSF-Med, 3,45 puntuación Lasso-Med; IC 95%) cuando se consumió una dieta Med.

3. Conclusión. Nuestro estudio mostró el potencial papel de la microbiota intestinal como factor predictivo asociado al desarrollo y la remisión de la DMT2 en pacientes con CHD, mejorando la predicción de las variables clínicas de riesgo cuando se construyen modelos predictivos combinando datos de la microbiota intestinal y variables clínicas. Además, nuestros resultados suponen el punto de partida para el desarrollo de herramientas clínicas basadas en el uso de escalas de clasificación numérica (en inglés “*score*”), que evalúen la probabilidad de riesgo o remisión, así como para determinar el modelo dietético más adecuado para prevenir la DMT2.

ABSTRACT

1. Introduction or dissertation background. The prevalence of type 2 diabetes mellitus (T2DM) has been increasing steadily in recent years and has become a major worldwide health problem. In view of this fact, it is essential to identify high-risk patients, in order to prevent the development of the disease, also discriminate between those groups of patients who can successfully prevent or reverse diabetes by dietary recommendations and those whose require another type of treatment. This is especially important in patients with coronary heart disease (CHD), as patients with concurrent CHD and T2DM have a significantly higher risk of developing a new cardiovascular event and, therefore, an increased mortality risk than those without T2DM. In this regard, the use of machine learning algorithms is promising and could help to identify new factors associated with the risk or remission of T2DM to improve their prediction.

The current evidence suggests that the gut microbiota could play a role in the pathophysiology of T2DM, because of its potential impact on inflammation and host metabolism. Recently, alterations of the gut microbiota have been identified not only in patients with T2DM, whose microbiota could be modified by antidiabetic drugs, but also in T2DM patients without treatment and prediabetics, suggesting the possibility of specific gut microbiota patterns associated with T2DM. However, more evidence is needed about the role as a causal driving factor and predictive value of the gut microbiota. In this sense, prospective studies might be useful to identify gut microbiota profiles that could improve the disease prediction. For this reason, this doctoral thesis analyzed the gut microbiota of the patients years before the development of T2DM, focusing on this respect.

On the other hand, different interindividual responses to dietary interventions has been observed. Diet is of paramount importance in the management and prevention of T2DM, being an alternative to drug treatment, unless the level of hyperglycemia requires immediate medical treatment. Therefore, it is important to find clinical and/or biologic profiles that may determine the success of the dietary strategies, which could enable us to identify those individuals who would benefit to a greater extent from their consumption to prevent or reverse the disease. In addition, the prediction of the specific response to a given diet might help to recommend individualized nutritional treatments. The studies about the interaction between diet and gut microbiota as determinant of health status is

on rise. Recently, it has been suggested that the metabolic response to a dietary intervention by the host organism is associated with the composition of the gut microbiota. Thus, the composition of the gut microbiota might predict responsiveness to dietary interventions, which could be relevance for personalized nutrition.

Based on this background, we hypothesize that certain gut microbiota profiles might be useful to identify those patients who would benefit from healthy dietary interventions achieving T2DM remission, likewise, alterations of the gut microbiota might precede the T2DM development and potentially improve the prediction of T2DM development risk. Moreover, it might determine the specific risk of T2DM associated with the consumption of different diets.

2. Research content.

Main objective. The aim was to evaluate the potential of the gut microbiota composition as a predictive factor associated with the development and remission of T2DM by the consumption of two healthy dietary models (the low-fat diet (LF) and the Mediterranean diet (Med)), besides the diet-specific T2DM risk profiles for each diet, in patients with CHD from the CORDIOPREV study.

Specific objectives

1. To evaluate whether baseline gut microbiota composition, in addition to T2DM risk-associated classical variables, may improve the prediction of remission achieved by two dietary models (LF or Med diets) in newly-diagnosed type 2 diabetes patients with coronary heart disease (CHD) within the CORDIOPREV study.
2. To evaluate whether gut microbiota composition, in addition to clinical biomarkers, could improve the prediction of new incident cases of T2DM in patients with CHD, within the CORDIOPREV study.
3. To explore the differences between the baseline gut microbiota of patients who developed T2DM while consuming a LF diet and those consuming the Med diet and, evaluate microbiota-based diet-specific risk scores in order to assess the individual T2DM risk associated with the consumption of a LF or a Med diet, within the CORDIOPREV study.

Participants, design and methodology. This doctoral thesis has been conducted in the framework of the CORDIOPREV study, a prospective, randomized, controlled study including 1002 patients with CHD, randomly assigned to one of two dietary models (Med or LF diet) during a seven-year follow-up period.

Paper 1: All the patients from the CORDIOPREV study newly-diagnosed with type 2 diabetes at baseline (n=190) were included. Gut microbiota was analyzed by 16S rRNA gene in those patients whose fecal sample was available and who had not received antibiotic treatment within three months before baseline sample collection (n=110). 44 of these reverted during the 5-year follow-up. Predictive models were built using the Random Forest machine learning algorithm. We also performed ROC curves and Cox regression analysis. In addition, LPS levels were determined at fasting and after 4h of a lipid overload test at baseline.

Paper 2: All the patients from the CORDIOPREV study without T2DM at baseline were included (n = 462). The gut microbiota composition was determined by 16S rRNA gene sequencing in those patients whose fecal sample was available and who had not received antibiotic treatment within three months before baseline sample collection (n=273). Overall, 107 (64 with available fecal sample) patients developed T2DM after a median of 60 months. The predictive models were built using Random Forest algorithm and hold-out method. The models were evaluated by ROC analysis and the risk of T2DM development was analyzed by Cox analysis.

Paper 3: All the patients from the CORDIOPREV study without T2DM at baseline (n = 462) whose fecal sample were available and who had not received treatment with antibiotics within a month before baseline sample collection were included (n=319), randomized to receive either LF diet (n=148, of which 28 developed diabetes) or Med diet (n=171, of which 41 developed diabetes). The gut microbiota was analyzed by 16S rRNA sequencing. Microbiome-based risk scores were built for each diet using two predictive approaches (RSF and Lasso models) and the risk of T2DM after a median follow-up of 60 months was assessed by Cox analysis.

Results

Paper 1: The model built exclusively with T2DM risk-associated classical variables showed an area under the curve of 0.698 ± 0.152 , whereas the addition of the baseline

microbiome yielded 0.822 ± 0.135 . Furthermore, a microbiota-based response prediction score, including the ten most highly discriminant genera between those patients who reverted of T2DM and those who remained diabetic, revealed a greater likelihood of T2DM remission associated with a high score compared with a low score (Hazard Ratio: 3.195, 95% CI: 1.37-7.48). Moreover, this score was negatively associated with the postprandial LPS increase ($\chi^2=0.015$).

Paper 2: A gut microbiota profile associated with T2DM development was determined through a microbiome-based predictive model. The addition of microbiome data to clinical parameters (variables included in FINDRISC risk score and the diabetes risk score of the ADA, HDL, triglycerides and HbA1c) improved the prediction increasing the area under the curve from 0.632 to 0.946. Furthermore, a microbiota-based risk score including the ten most discriminant genera, was associated with the probability of T2DM development. A higher probability of development of T2DM was associated with a high score compared with a low score (HR: 3.22, 95% CI: 1.56-6.66).

Paper 3: Linear discriminant analysis effect size (LEfSe) analysis showed a different baseline gut microbiota in patients who developed T2DM consuming LF and Med diets. The scores built showed that a higher abundance of *Paraprevotella*, and lower abundance of *Gammaproteobacteria* and *B.uniformis* were associated with T2DM risk (HR=3.66 RSF-LF score, 3.15 Lasso-LF score; 95% CI) when a LF diet was consumed. In contrast, higher abundances of *Saccharibacteria*, *Betaproteobacteria*, and *Prevotella* were associated with T2DM risk (HR=4.00 RSF-Med score, 3.45 Lasso-Med score; 95% CI) when a Med diet was consumed.

3. Conclusion. Our study showed the potential role of the gut microbiota as a predictive factor associated with the development and remission of T2DM in patients with CHD, improving the prediction of clinical risk variables when predictive models are built combining the gut microbiota data and clinical variables. Furthermore, our results might provide a major foothold for the development of clinical tools based on gut microbiota scores to assess the probability of T2DM risk or remission, in addition to recommending the dietary model which is consistent with a lower risk.

II. INTRODUCCIÓN

II. INTRODUCCIÓN

1. Diabetes mellitus

1.1 Antecedentes históricos de la diabetes mellitus

La primera alusión a esta enfermedad se remonta al año 1.552 a.C., con la descripción en un papiro egipcio de una enfermedad caracterizada por una expulsión excesiva de orina. En el siglo I d.C. Aretaeus de Capadocia le acuñó el término diabetes, cuyo significado en griego es “sifón”, describiendo además que se elimina más líquido incluso del cual es ingerido [1-3]. Mientras que en la India los textos de medicina de Sushruta and Charaka citaban la patología como “orina de miel”, pues se dieron cuenta que contenía un dulzor capaz de atraer a las hormigas y moscas. Además, ya observaban diferentes tipos de la patología, resaltando factores como la edad a la que se inicia o el peso [4].

En cambio, en occidente el característico sabor dulce de la orina fue redescubierto en 1675. Un siglo después, la hiperglucemia que define esta enfermedad fue descubierta por Matthew Dobson en 1774, quien identificó que ese dulzor también se encontraba en la sangre de estos pacientes, y lo atribuyó a la presencia de azúcares o semejantes, sugiriendo por primera vez un cambio en el origen de la enfermedad, hasta entonces supuestamente vinculada con el riñón [4]. Así pues, poco después la palabra mellitus (en latín, "dulce como la miel") se le añade por el cirujano general británico John Rollo en 1798, para distinguirla de otras patologías con poliuria [1]. Este fue el primero en aplicar el descubrimiento de Dobson, proponiendo un manejo dietético de la enfermedad con relativo éxito [2].

No obstante, el mayor avance en la etiología de la enfermedad fue en el s. XIX coincidiendo con el desarrollo de la medicina experimental. En 1889 Mering y Minkowski, al experimentar con perros, descubrieron que la extirpación del páncreas producía diabetes mellitus [2-4]. No obstante, la diabetes era una enfermedad muy poco prevalente, [5]. Pocos años después, el descubrimiento de la insulina y su acción hipoglucemiante en 1910 por Mayer y Schaefer [1], fue la base para posteriores experimentos de aislamiento de la insulina y de su aplicación clínica por Banting y Best en 1921, con los cuales se pudo establecer que una deficiencia de insulina es la causa de

la diabetes mellitus [2-4]. A continuación, uno de los acontecimientos que más contribuyó al conocimiento fisiopatológico de la diabetes fue el surgimiento de la técnica de radioinmunoensayo, con la cual la medición de los niveles de insulina permitió descubrir que algunos pacientes con diabetes tenían una gran o total insuficiencia de insulina mientras que otros no. Poco tiempo después, en 1975, el descubrimiento de la hemoglobina glicada (HbA1c) como biomarcador metabólico del control glucémico, mejoró el diagnóstico de la diabetes mellitus y nuestra comprensión de los efectos del control glucémico en los resultados vinculados a esta enfermedad [4]. En este último siglo, las investigaciones científicas sobre la diabetes mellitus han sido enfocadas en la prevención y manejo de la enfermedad debido a la creciente prevalencia de la obesidad la cual favorece el desarrollo de la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2).

1.2 Aspectos clínicos y clasificación

La diabetes mellitus es una enfermedad cuya principal manifestación clínica es la hiperglucemia, como consecuencia de una insuficiencia en la producción y/o respuesta a la insulina, asociada con alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos, las grasas y las proteínas. Los efectos a largo plazo hacen que estén en riesgo de desarrollar una serie de complicaciones crónicas microvasculares y macrovasculares. Estas son potencialmente graves y se asocian con una mayor mortalidad y reducción en la calidad de vida.

Los principales síntomas de la diabetes mellitus son polidipsia, poliuria, pérdida excesiva de peso, acompañado algunas veces de polifagia, visión borrosa y fatiga [6]. En la actualidad, la diabetes mellitus se clasifica según el factor etiológico por el cual se alcanza el estado de hiperglucemia. Las principales categorías son la diabetes tipo 1, la DMT2 y la diabetes gestacional [7].

La diabetes tipo 1 está causada por una reacción autoinmune que causa la destrucción de las células β del páncreas. Esto generalmente conduce a una deficiencia absoluta de insulina. La diabetes tipo 1 puede aparecer a cualquier edad, aunque se empieza a manifestar con más frecuencia durante la infancia y adolescencia, siendo particularmente distintivo la acentuada polidipsia y poliuria. Aunque estos síntomas pueden pasar desapercibidos en los pacientes o no presentarse, siendo un tercio diagnosticado a causa de un ingreso hospitalario tras cetoacidosis con riesgo de

fallecimiento [8]. Por tanto, muchos estudios sugieren la determinación de autoanticuerpos asociados a la diabetes en individuos con antecedentes familiares [9]. Los marcadores autoinmunes incluyen autoanticuerpos de las células de los islotes y autoanticuerpos contra la glutamato descaboxilasa (GAD65), la insulina, las fosfatasa de tirosina IA-2 y IA-2 β , y el transportador de zinc 8 (ZnT8). El estadio 1 de la diabetes de tipo 1 se define por la presencia de dos o más de estos marcadores autoinmunes [10].

La DMT2 se caracteriza por una deficiencia relativa y progresiva en la secreción de insulina relacionada con una situación concurrente de resistencia a la insulina [11]. La DMT2 es el tipo más común representando el 90-95% de los casos de diabetes. El riesgo de desarrollar DMT2 aumenta con la edad, la obesidad y la falta de actividad física. No obstante, suele no ser diagnosticada en los primeros años porque la hiperglucemia se desarrolla muy gradualmente por lo que los síntomas no son perceptibles [10]. Sin embargo, es importante identificar estos pacientes incluso en esa fase temprana porque están en mayor riesgo de desarrollar complicaciones macrovasculares y microvasculares [11]. Se calcula que un porcentaje importante de casos de diabetes (entre el 30 y el 80%, según el país) no están diagnosticados.

La diabetes mellitus gestacional aparece en el segundo o tercer trimestre del embarazo, pero generalmente se recupera la normoglucemia tras este. A pesar de ello, aumenta el riesgo de desarrollar DMT2 posteriormente. Los criterios de diagnóstico de diabetes mellitus gestacional no están consensuados mundialmente, lo que complica la comparación de datos entre estudios [12].

Además de estos principales tipos de diabetes mellitus, el informe publicado por la Asociación de Diabetes Americana (ADA) enumera también la clasificación “otros tipos específicos de diabetes”, que son menos comunes y con diverso origen, incluida la diabetes causada por una alteración monogénica, como por ejemplo la diabetes tipo MODY (diabetes juvenil de inicio en la madurez), la diabetes causada por enfermedades del páncreas exocrino y la diabetes inducida por fármacos o sustancias químicas que pueden detener la secreción o la acción de la insulina [10].

1.3 Diagnóstico de la diabetes mellitus

La ADA reporta en 2021 que la diabetes mellitus puede ser diagnosticada a través de los siguientes tres criterios: niveles de glucosa plasmática en ayunas (FPG) \geq 126

mg/dL (7.0 mmol/L), niveles de glucosa plasmática a las 2 horas (2h PG) durante la prueba de tolerancia a la glucosa oral de 75 g (OGTT) \geq 200mg/dL (11.1 mmol/L) o porcentaje de HbA1c \geq 6,5% (48 mmol/mol) (**Tabla 1**) [10].

Tabla 1. Criterios de diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2

Prueba analítica	Valor umbral
Glucosa en ayunas (no ingesta calórica en al menos 8h)	\geq 126 mg/dl (7.0 mmol/l)
Ó	
Glucosa plasmática tras 2-h del OGTT La prueba debe realizarse según lo establecido por la OMS con una sobrecarga de 75 g de glucosa anhidra disuelta en agua	\geq 200 mg/dl (11.1mmol/l)
Ó	
HbA1c	\geq 6,5% (48 mmol/mol)
Ó	
Glucosa plasmática al azar En pacientes con síntomas clásicos de hiperglucemia o crisis hiperglicémica	\geq 200 mg/dl (11.1 mmol/l)

OGTT, Prueba de tolerancia oral a la glucosa; OMS, Organización Mundial de la Salud.

En general, los tres criterios son igualmente apropiados para el diagnóstico. Las ventajas de usar la determinación de HbA1c en comparación con la FPG o 2h PG es que no necesita de ayuno previo y presenta una menor variación preanalítica. Sin embargo, tiene una sensibilidad inferior en el punto de corte, mayor coste, por lo que en ciertas regiones del mundo no es igualmente accesible y, en ciertos individuos la correlación HbA1c y glucosa promedio se encuentra alterada [13]. Esto ocurre por ejemplo en las hemoglobinopatías o situaciones con recambio de hematíes anormal (gestación, anemia hemolítica, transfusiones de sangre, etc.) [14]. En ese caso es mejor usar los criterios de glucemia. Además, la edad y la raza o etnia son factores que tener en consideración en esta prueba, ya que influyen de manera independiente a la glucemia en este parámetro [15]. Según el informe de la Encuesta Nacional de la Salud y Nutrición (NHANES), en el punto de corte establecido para la HbA1c, se diagnosticó solo un 30% de los casos del total de casos de diabetes identificados colectivamente mediante la prueba HbA1c, FPG o 2h PG [16].

A menos que el diagnóstico clínico sea evidente, por ejemplo, en el caso de pacientes con crisis de hiperglicemia o síntomas clásicos con una glucosa plasmática tomada de manera aleatoria \geq 200mg/dL (11.1 mmol/L), es necesario confirmar el

diagnóstico. Se realizarán dos determinaciones de la misma muestra [17] o en diferentes muestras con el menor tiempo de demora, pudiendo realizarse una repetición de la prueba inicial o una prueba diferente. Si ambas determinaciones están por encima del umbral se confirma el diagnóstico. Si los resultados son discordantes, se repite la prueba que cumple el criterio de diagnóstico, el diagnóstico se realizará sobre la base del resultado de dicha repetición. Si los resultados se encuentran cercanos a los valores umbrales de diagnóstico, se recomienda repetir la prueba después de 3-6 meses. Además, para disminuir el sesgo por variabilidad preanalítica, es fundamental que las muestras de glucosa plasmática sean centrifugadas y separadas inmediatamente después de ser extraídas [10].

Normalmente la DMT2 puede cursar de manera asintomática durante los primeros años, etapa durante la cual ya pueden desarrollarse algunas complicaciones asociadas a la diabetes como la retinopatía o la nefropatía diabética [6]. Por lo que se ha recomendado, realizar la prueba de diagnóstico de diabetes a todas las personas mayores de 45 años o, aquellas menores de 45 años que tengan un índice de masa corporal (IMC) ≥ 25 kg/m² (o ≥ 23 kg/m² en población asiática) y factores de riesgo [10].

2. Diabetes mellitus tipo 2

La DMT2 está caracterizada por una deficiencia relativa de insulina causada por la disfunción de las células β pancreáticas y la resistencia a la insulina. Debido a que existe un bucle de retroalimentación entre la célula β y los tejidos sensibles a la insulina, cuando la resistencia a la insulina se desarrolla, las células β ante la falta de respuesta a la insulina responden aumentando la secreción de insulina y/o la masa de células β [18]. No obstante, el mantenimiento de esta situación de manera crónica por parte de célula β resulta deficiente lo que conduce a la aparición de la hiperglucemia. A medida que la disfunción de las células β y la resistencia a la insulina se agravan, la hiperglucemia se acentúa y conduce a la progresión de la DMT2 [19]. Las incretinas, el microbioma, la desregulación inmunológica y la inflamación han surgido como posibles factores implicados en los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad. La DMT2 se puede tratar de manera eficaz a través de la adopción de estilos de vida saludables, en combinación en los casos necesarios con medicación hipoglucemiante e incluso insulina cuando se produce una mayor progresión de la enfermedad, que mejoran el control de la hiperglucemia para evitar la aparición y/o progresión de las complicaciones asociadas a la diabetes [11].

2.1 Epidemiología

La diabetes se ha establecido en los últimos años como una de las emergencias de salud ya que su incidencia ha crecido de manera abrupta a nivel mundial. Tan solo en estas dos décadas, la cifra de personas entre 20 y 79 años con diabetes ha pasado de 151 millones en el año 2000 a 463 millones de en el año 2019, según estimó la Federación Internacional de la Diabetes (FID). Estas cifras expresadas en relación con el total de población suponen que la prevalencia se ha duplicado, la diabetes ha pasado a representar de un 4,6% a un 9,3% de la población mundial en este grupo de edad. Se estima que esta cifra aumente a 578 millones para el año 2030, y a 700 millones para 2045. Representando la DMT2 el 90-95% de los casos [6] (**Figura 1**).

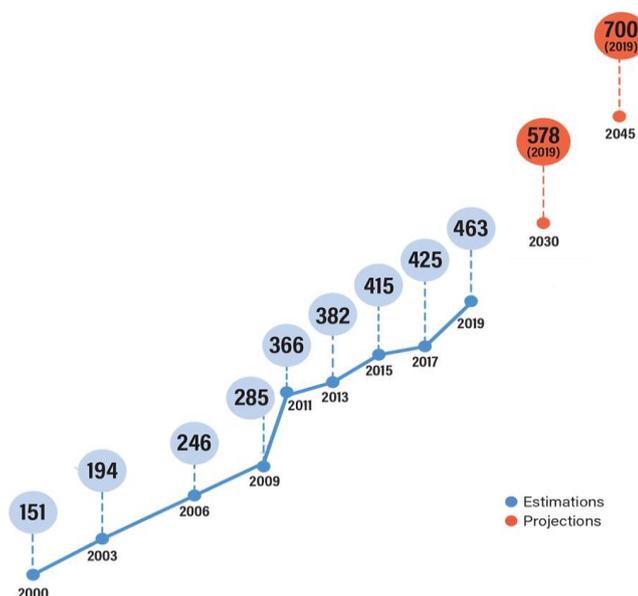


Figura 1. Estimación del número de personas con DMT2 desde el año 2000 a nivel mundial en el grupo de edad de 20-79 años y proyecciones futuras por la FID. *Modificada de la 9ª edición del Atlas de la Diabetes de la FID [6].*

La epidemiología de la DMT2 se ve afectada por factores genéticos y ambientales. La incidencia se ha incrementado debido a una mayor esperanza de vida, así como porque a nivel mundial ha aumentado la obesidad, un estilo de vida sedentario y un consumo de dietas poco saludables con exceso de alimentos procesados, cereales refinados, exceso azúcares y grasas saturadas. Por ese motivo, aunque la predisposición a la DMT2 está asociada a una base genética, puede prevenirse con modificaciones del estilo de vida [20].

La distribución de la DMT2 a nivel mundial no es homogénea. Considerada durante mucho tiempo una enfermedad de los países occidentales y ricos de Europa y Norteamérica, en las últimas décadas se enfoca una mayor preocupación por la mayor prevalencia, mortalidad y años de vida ajustados por discapacidad en relación con la diabetes en los países en vías de desarrollo [21]. Actualmente aproximadamente un 80% de las personas con diabetes vive en países con ingresos medios o bajos, principalmente situados en las regiones de Asia Oriental y Sudeste (principalmente, China e India), aquellos de Latinoamérica, Oriente Medio y norte de África (**Figura 2**) [6]. El rápido desarrollo económico conlleva a que la urbanización, un acelerado cambio nutricional y un estilo de vida cada vez más sedentario, impulsen el aumento de la diabetes [22]. Sin embargo, los servicios sanitarios para gestionar el aumento de diabetes en estos países son limitados y existen pocas campañas educativas de concienciación ciudadana [23]. Las regiones reportadas con una mayor prevalencia de diabetes ajustada por edad según la FID en 2020 fueron la región de Oriente Medio y Norte de África. No obstante, la región con mayor número de pacientes diabéticos no diagnosticados fue la del Sudeste Asiático [6]. Probablemente una de las causas entre otros factores sea que las poblaciones asiáticas tienden a desarrollar diabetes a edades más tempranas y con niveles de IMC más bajos que los caucásicos [22], sugiriéndose en los últimos años la necesidad de una guía práctica específica para esta población [24].

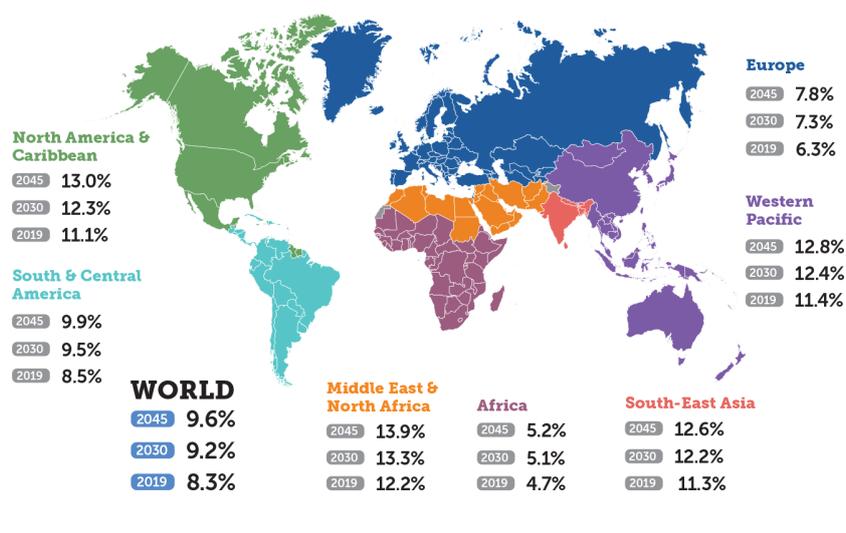


Figura 2. Perfil geográfico de la prevalencia de la DMT2 en adultos (20-79 años) en las distintas regiones del mundo ajustada por edad. *Modificada de la 9ª edición del Atlas de la Diabetes de la FID [6].*

En cuanto a la mortalidad, la diabetes fue la novena principal causa de muerte en el mundo en 2019 según reporta la Organización Mundial de la Salud (OMS) (**Figura 3**). El incremento en la mortalidad en los últimos años es notorio, pues se ha reportado un aumento de un 70% el número de muertes desde el año 2000 [25]. Este se encuentra en consonancia con el aumento de la prevalencia, pues en comparación con las personas que no tienen diabetes, los pacientes con DMT2 tienen un 15% más de riesgo de mortalidad por todas las causas y un riesgo dos veces mayor de mortalidad cardiovascular [26]. En concreto, según el cálculo de la FID la diabetes se relaciona con el 11,3% del total de la mortalidad mundial entre las personas de 20-79 años. El mayor número de muertes relacionadas con la diabetes en 2019 se localizó en la región del Pacífico Occidental [6]. No obstante, en los países desarrollados se ha observado una reducción de la morbilidad de complicaciones diabéticas y mortalidad por causas vasculares en pacientes diabéticos, asociado a una mejora del tratamiento y control de la enfermedad [27].

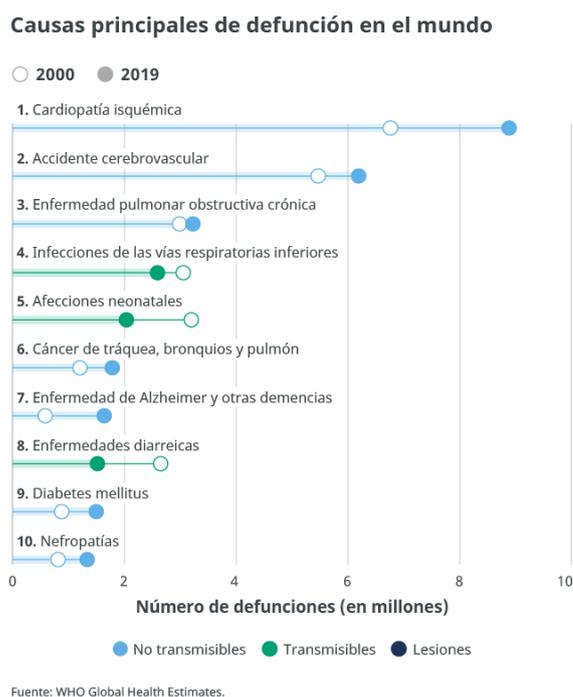


Figura 3. Las 10 principales causas de defunción en el mundo en 2019 reportadas por la OMS. Modificada de *Estimaciones Mundiales de la Salud de la OMS (2020)*.

Consecuencia de una mayor prevalencia de diabetes, el gasto sanitario mundial de la diabetes ha aumentado significativamente. En la actualidad aproximadamente un 10% del gasto sanitario mundial se asocia a la diabetes [6]. Se espera que el impacto económico de la diabetes siga en auge. Los costos en salud del tratamiento contra las complicaciones diabéticas representan más del 50% de los costos en salud directos de la diabetes [28], ya

que los principales factores de coste son la atención hospitalaria y ambulatoria [29]. Estudios recientes han reportado que las tasas de hospitalización por insuficiencia cardíaca (ajustadas por edad y sexo) fueron dos veces mayores en los pacientes con diabetes en comparación con sujetos no diabéticos [30].

Entre los objetivos Desarrollo Sostenible y la Declaración Política de las Naciones Unidas sobre las enfermedades no transmisibles (ENTs) se encuentra reducir en un tercio la mortalidad prematura por ENTs en 2030, siendo la diabetes una de las cuatro ENTs que causan mayor mortalidad [31]. Para ayudar a lograr dicho objetivo se elaboró del Plan de Acción Mundial de la OMS contra las ENTs 2013-2020. Además, el informe mundial sobre la diabetes elaborado por Organización Mundial de la Salud recomienda en consonancia con este objetivo reducir el impacto de la diabetes a través de la financiación y aplicación de planes nacionales. Asimismo, se sugiere que estos planes aborden la asignación de recursos en atención específica a la diabetes, especialmente en el ámbito de la atención primaria, reforzar la aplicación de protocolos y el acceso tecnológico para mejorar el diagnóstico precoz y el manejo de la enfermedad. Además de tener como prioridad las acciones preventivas y concienciación ciudadana [29].

España también se ha visto afectada por el impacto ascendente de esta enfermedad. El estudio Di@betes ha reportado una estimación de la incidencia de la diabetes finalizada en 2016-17 a partir de una cohorte nacional representativa de 2408 sujetos después de un seguimiento de 7,5 años, la cual ajustada por edad y sexo de la población española fue de 11,6 casos por cada 1000 personas cada año (IC 95% = 11.1– 12.1) [32]. No obstante, se ha encontrado una mejora en las hospitalizaciones relacionadas con la diabetes en España en los últimos años. Así pues, se ha reportado una disminución de la tasa de frecuentación y de la duración del ingreso hospitalario [33].

2.2 Complicaciones de la diabetes mellitus tipo 2

Las complicaciones diabéticas son la principal la causa de muerte prematura y baja calidad de vida en los pacientes con esta afección [29]. Además, repercuten de forma significativa en el impacto económico total de la enfermedad, representando más de la mitad del gasto directo de esta afección [6, 28]. Las complicaciones de la DMT2 se dividen en macrovasculares (enfermedad cardiovascular arteriosclerótica) y microvasculares. Además de hiperglucemia, el fenotipo de la DMT2 suele presentar

dislipidemia con niveles elevados de triglicéridos en circulación y colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL), hipertensión y una mayor tendencia a la agregación plaquetaria [18]. Todas estas anomalías son factores de riesgo de vascular [34]. Por ello, un control adecuado y sostenido de los niveles de azúcar en sangre, de la presión arterial y de los niveles de lípidos en sangre puede prevenir o retrasar la aparición de complicaciones relacionadas con la diabetes en las personas que la padecen [28, 35].

Enfermedad cardiovascular arteriosclerótica

La diabetes aumenta el riesgo relativo de enfermedad cardiovascular arteriosclerótica (ECV), que comprende la enfermedad coronaria, conocida por sus siglas en inglés como CHD, la enfermedad cerebrovascular y la enfermedad arterial periférica, siendo la principal causa de morbilidad y mortalidad con esta enfermedad [20]. Un individuo con diabetes tiene un riesgo de infarto de miocardio (IM) equivalente al de los individuos no diabéticos que han sufrido previamente dicho evento [28]. Además, equivale a un riesgo aproximadamente tres veces mayor de IM en comparación con la población general [36]. También la DMT2 es un factor de riesgo independiente que aumenta dos veces el riesgo de mortalidad por enfermedad macrovascular [37]. De hecho, a ECV representa más de la mitad de la mortalidad observada en la población diabética. Así como también es el mayor contribuyente en el gasto sanitario asociado a la diabetes, estimado en 37.300 millones de dólares al año [38].

La glucosa plasmática en ayunas se asocia de forma lineal y significativa con el riesgo de enfermedad cardiovascular [28]. Además, existe abundante evidencia que apoya el papel fisiopatológico de la hiperglicemia por su efecto en la disfunción endotelial [39]. Otros factores como la hiperinsulinemia, la resistencia a la insulina y la dislipemia, podrían estar implicados. La hiperinsulinemia activa rutas de señalización inflamatorias que promueven el desarrollo y progresión de la arteriosclerosis, mientras que la dislipemia, causa disfunción mitocondrial y muerte celular [40].

La insuficiencia cardíaca es otra de las principales causas de morbilidad y mortalidad por enfermedad cardiovascular. Estudios recientes han descubierto que las tasas de hospitalización por insuficiencia cardíaca (ajustadas por edad y sexo) eran dos veces mayores en los pacientes con diabetes en comparación con los sujetos no diabéticos [30].

Para la prevención y el tratamiento tanto de la ECV como de la insuficiencia cardiaca, los factores de riesgo cardiovascular deben evaluarse sistemáticamente al menos una vez al año en todos los pacientes con diabetes. Estos factores de riesgo incluyen la obesidad/sobrepeso, la hipertensión, la dislipidemia, el tabaquismo, los antecedentes familiares de CHD prematura, la enfermedad renal crónica y la presencia de albuminuria [41]

Además, los criterios de valoración clínica más significativos para el pronóstico en pacientes con ECV e insuficiencia cardiaca establecida son la mortalidad y la hospitalización por recurrencia de evento cardíaco. El riesgo de estos criterios de valoración es notablemente superior en los sujetos con diabetes en comparación con los sujetos sin diabetes [42, 43]. Los pacientes con DMT2 y antecedentes de IM tienen un riesgo de recurrencia de IM superior al 40% [44]. Inclusive, los individuos con diabetes tienen una mortalidad un 50% mayor a largo plazo (>1 año) después de sufrir un IM en comparación con aquellos que no la presentan [45]. Por otro lado, presentar ECV, aumenta el riesgo de el desarrollo de DMT2 , y su prevalencia como comorbilidad está aumentando [46]. En general, el 70-75% de todos los pacientes con CHD establecida, presentan diabetes concomitante o perturbaciones significativas de la homeostasis de la glucosa. Dentro de ese porcentaje y, con una tendencia actual creciente, el 30% representa a los pacientes que tienen diabetes coexistente conocida [47]. Por lo cual, la prevención o remisión de diabetes en estos pacientes es de vital importancia.

Las principales complicaciones microvasculares de la diabetes mellitus son las siguientes:

Nefropatía diabética

La enfermedad renal crónica (ERC) atribuida a la diabetes (nefropatía diabética), tiene lugar en el 20-40% de los pacientes con diabetes. Se caracteriza por albuminuria, una baja tasa de filtración glomerular estimada y manifestaciones de daño renal [48]. La estrategia más efectiva para reducir el impacto de la nefropatía diabética es prevenir la DMT2, ya que puede estar presente en el momento del diagnóstico de esta última [6]. Además, la ERC puede progresar hasta convertirse en una enfermedad renal terminal (ERT). La proporción de la ERT que se atribuye a la diabetes varía entre el 10% y el 67% dependiendo de la región, por ejemplo, en EE. UU. es la principal causa de ERT [6].

Además, la presencia de ERC aumenta notablemente el riesgo cardiovascular y los costes sanitarios [49].

Retinopatía diabética

La retinopatía diabética es una complicación vascular muy específica y una de la causa más frecuente de casos de ceguera entre los adultos de 20 a 74 años, con fuertes repercusiones personales y socioeconómicas [6]. La retinopatía diabética se caracteriza por un espectro de lesiones como resultado del daño acumulado a largo plazo en los pequeños vasos sanguíneos de la retina. Estas lesiones incluyen cambios en la permeabilidad vascular, microaneurismas capilares, degeneración capilar y formación excesiva de nuevos vasos sanguíneos (neovascularización). Como consecuencia, el glaucoma, las cataratas y otros trastornos oculares aparecen antes y con mayor frecuencia en las personas con diabetes. La retina neural también es disfuncional con la muerte de algunas células, lo que altera la electrofisiología de la retina y da lugar a una incapacidad para discriminar los colores [36]. Además de la duración de la diabetes, los factores que aumentan el riesgo de retinopatía son la hiperglucemia crónica, la nefropatía, la hipertensión y la dislipidemia [50]. El tratamiento correcto de la diabetes con el objetivo del mantenimiento óptimo de la glucemia, junto el tratamiento de la presión sanguínea cuando sea requerido ha demostrado en grandes estudios prospectivos aleatorios que previene y/o retrasa la aparición y la progresión de la retinopatía diabética [11].

Neuropatía periférica y pie diabético

Más de la mitad de las personas con diabetes acaban desarrollando una neuropatía. Tradicionalmente, la progresión de la enfermedad se caracteriza clínicamente por el desarrollo de anomalías vasculares, como el engrosamiento de la membrana basal de los capilares y la hiperplasia endotelial, con la consiguiente disminución de la tensión de oxígeno e hipoxia, por ello fue encuadrada como complicación microvascular aunque se asocia realmente con un trastorno neuronal y glial subyacente [36]. La neuropatía periférica es la forma más común de neuropatía asociada a la diabetes, que incluye un grupo heterogéneo de alteraciones. Tiene lugar en los nervios distales de las extremidades, en particular, es muy frecuente el entumecimiento de los pies (pie diabético) (32).

Las complicaciones del pie diabético y de las extremidades inferiores se caracterizan por desencadenar úlceras crónicas y una distribución anormal de la presión ósea interna, lo cual deriva a veces en gangrena y amputaciones que provocan una reducción significativa en la calidad de vida y aumentan el riesgo de muerte prematura [6]. Las tasas de amputación en poblaciones con diabetes diagnosticada suelen ser entre 10 y 20 veces superiores a las de los no diabéticos [29]. El reconocimiento y el tratamiento temprano de los pacientes con diabetes y pies en riesgo de sufrir úlceras y amputaciones pueden retrasar o prevenir resultados adversos [50]. De hecho, un ejemplo de ello es que varios estudios han mostrado una reducción de entre el 40% y el 60% en las tasas de amputaciones entre los adultos con diabetes durante los últimos 10-15 años en varios países de Europa, incluido España, EE. UU. Y Australia [29].

2.3 Factores de riesgo

El aumento en la incidencia de la DMT2 ocurre en paralelo con el aumento en la incidencia de la obesidad. El exceso de adiposidad, normalmente evaluado por el IMC, es el factor de riesgo más importante de la DMT2, el cual se asocia con una serie de alteraciones metabólicas que propician la resistencia a la insulina. Además, la obesidad abdominal evaluada a través del perímetro de cintura o la relación cintura-cadera predice el riesgo de DMT2 independientemente del IMC [20]. Esto es aconsejable en algunas poblaciones (como los indios asiáticos), donde la aparición de diabetes tiene lugar con un IMC menor aunque el porcentaje de grasa visceral es mayor [21].

Además, entre los factores de riesgo se incluyen la raza/etnia, por ejemplo ser de origen afroamericano, latino, nativo americano, asiático-americano, isleño del Pacífico confieren un riesgo más elevado [21]. La diabetes gestacional previa, frecuentemente es indicativo de una disfunción subyacente de la célula β , lo que confiere un riesgo notablemente mayor de desarrollo posterior de DMT2 [10]. Recientemente se ha publicado datos de prevalencia en EE. UU., que indican 19.7% de las mujeres que tuvieron diabetes gestacional fueron diagnosticadas de diabetes posteriormente [51]. Los antecedentes familiares con DMT2 no solo se asocian con un mayor riesgo, sino que guardan una relación inversa con la edad de inicio de la DMT2 [52]. También contribuyen a un mayor riesgo factores genéticos, la edad avanzada, presentar criterios de síndrome metabólico, como hipertensión o dislipemia y el síndrome de ovarios poliquísticos [20].

Asimismo, existen factores riesgo modificables relacionados con el estilo de vida, principalmente la dieta, el sedentarismo o la inactividad física, ya que estos claramente predisponen al sobrepeso y obesidad, aumentando el riesgo de DMT2. Las guías de salud pública recomiendan 150 min de actividad física moderada-vigorosa a la semana, lo cual se ha visto asociado una reducción del riesgo de DMT2 del 26%. Esta reducción se acentúa aún más a mayor nivel de actividad física [53]. Además, se ha observado que cambiando solo 30 min de tiempo de inactividad física por una actividad física moderada-vigorosa mejora la sensibilidad a la insulina, con una reducción de un 15% en el “Homeostasis model assessment of insulin resistance” (HOMA-IR) [20]. La dieta también es considerada un factor de riesgo importante. Dietas típicamente occidentales, caracterizadas por alta ingesta calórica total y ser ricas en grasas saturadas, con poco contenido en fibra y un consumo regular de bebidas azucaradas y carnes rojas procesadas, se asocian con un mayor riesgo de diabetes [54]. Otros factores también ligados con el estilo de vida, como el tabaquismo, el estrés y la depresión, se han asociado con un mayor riesgo de DMT2 [20].

El estado socioeconómico se ha relacionado con la DMT2 de manera inversa a nivel mundial. Se ha observado que bajos niveles socioeconómicos se asocian con un 40-60% más de riesgo relativo que altos niveles socioeconómicos. Además, un análisis realizado en Europa atribuyó que las diferencias entre los grupos socioeconómicos podían atribuirse a diferencias en el IMC [55]. En el plano mundial, las poblaciones alto riesgo de DMT2 durante la juventud tienen mayores índices de pobreza y un bajo nivel educativo de los padres [56].

Las personas con riesgo de padecer DMT2 deben ser identificadas para evitar que desarrollen la enfermedad. La evaluación del riesgo se puede realizar utilizando cuestionarios de riesgo validados, como el de la Asociación Americana de Diabetes [10] o el test FINDRISC [57] (ANEXO I Y II). Aunque se han recomendado varias herramientas de estratificación del riesgo, siguen siendo trascendentes los modelos prácticos de predicción con biomarcadores para proporcionar predicciones más precisas [58]. Los recientes avances en las tecnologías de la genómica, la metabolómica y el microbioma intestinal han ofrecido oportunidades y desafíos para la investigación actual por su potencial uso para una prevención y manejo más eficaces de la DMT2 [59].

2.4 Prevención de la diabetes mellitus tipo 2: importancia de la dieta y el estilo de vida

Varios ensayos controlados aleatorios importantes, han demostrado que las modificaciones el estilo de vida, como de la dieta y el ejercicio físico, son eficaces para prevenir la DMT2 en personas de alto riesgo teniendo incluso mayor poder preventivo que el tratamiento con metformina [20, 60]. El ensayo clínico *Diabetes Prevention Program (DPP)*, estudio con mayor nivel de evidencia y principal de referencia para la guía de recomendaciones de prevención de la ADA (2021) [61], demostró que una intervención intensiva sobre el estilo de vida podía reducir el riesgo de DMT2 en un 58% a lo largo de 3 años [20]. Los participantes en estos estudios consumieron una dieta baja en grasas (LF, del inglés “low-fat”). La reducción del riesgo se asoció con una pérdida de peso moderada (7%) [61].

Sin embargo, aunque la pérdida de peso se ha asociado con una mayor reducción en el riesgo de desarrollo de DMT2, los objetivos de pérdida de peso son difíciles de alcanzar y aún más difíciles de mantener, ya que casi el 80% del peso perdido se recupera en 5 años [62]. Además, estudios como el PREDIMED demuestran que el consumo de un patrón dietético puede reducir el riesgo de diabetes a largo plazo en ausencia de cambios significativos en el peso y sin incremento de la actividad física [63].

Previamente, se han sugerido relaciones de la incidencia de diabetes con determinados grupos de alimentos, sin embargo, actualmente el foco de las recomendaciones nutricionales son modelos dietéticos en lugar de nutrientes o alimentos [54]. Además, la evidencia actual sugiere que es más importante la calidad que la proporción de los macronutrientes [64], siendo varios los patrones dietéticos recomendados para la prevención de la DMT2, pues se han asociado con una menor incidencia en ensayos clínicos. Por ejemplo, la dieta LF, la dieta Mediterránea (Med) o las dietas bajas en carbohidratos [61, 64]. Estudios observacionales también sugieren un poder preventivo de la dieta vegetariana, la dieta vegetal (centrada en productos vegetales, pero no en su totalidad) y la dieta DASH (modelo dietético con enfocado a controlar la hipertensión) [64-66]. Todas ellas comparten ser ricas en frutas y verduras, legumbres, nueces y cereales integrales y baja en cereales refinados, carne roja procesada y bebidas azucaradas [54, 64].

A pesar del efecto preventivo de las distintas intervenciones en el estilo de vida evidenciada por ensayos aleatorizados, una proporción de individuos desarrollan diabetes. En la actualidad, no existen predictores válidos de la eficacia de estas medidas para determinar que sujetos se beneficiaran en mayor medida previniendo o retrasando la progresión a DMT2, pues pocos estudios han investigado los predictores clínicos y fenotípicos de una mejor o peor respuesta a las intervenciones sobre el estilo de vida y, los resultados obtenidos son discordantes [67]. Así como también el nuevo enfoque de la medicina de precisión haciendo uso de la nutrición personalizada para prevenir y tratar la DMT2, demanda investigaciones en la cual técnicas de análisis de datos masivos puedan establecer recomendaciones dietéticas individualizadas [59].

2.5 Remisión de la diabetes mellitus tipo 2

La DMT2 se considera en general una enfermedad crónica y progresiva que es consecuencia del aparentemente inexorable declive de la función de las células β . Sin embargo, estudios recientes han demostrado que en las primeras fases de desarrollo puede ser reversible [54]. De hecho, el principal apoyo a este respecto procede de los pacientes sometidos a cirugía bariátrica, que proporcionaron las primeras pruebas de remisión de la DMT2, normalizando sus niveles de glucosa plasmática de manera sostenida tras la cirugía [68].

La remisión de la DMT2 se define como los niveles de glucosa inferiores al nivel de diagnóstico de la diabetes o HbA1c <6,5% en ausencia de medicamentos para la hiperglucemia mantenido en el tiempo durante al menos un año [54]. Factores clínicos como una menor edad, hiperglicemia inicial y duración de la enfermedad junto con no ser tratado con insulina se han sido relacionado con una mayor probabilidad de remisión [69-71].

Además, la remisión de la DMT2 ha sido asociada con la pérdida sustancial de peso, de hecho, es también un factor predictivo del éxito de la regresión de diabetes [70, 72]. La pérdida de peso tras la cirugía es principalmente promovida por una restricción calórica y/o malabsorción, según el tipo de cirugía [71]. Considerándose esto, varios estudios demostraron el éxito de dietas muy bajas en calorías, como aproximación para inducir la restricción calórica y la remisión de la DMT2 también a través de la pérdida de peso, sin necesidad de cirugía [73]. El estudio DIRECT mostró la durabilidad de la

remisión conseguida a través de dietas muy bajas en calorías continuadas con un programa estructurado de mantenimiento de la pérdida de peso, con una tasa de remisión del 36% después de dos años de la intervención [74]. Sin embargo, una crítica común a este enfoque ha sido que las dietas muy bajas en calorías pueden no ser alcanzables o sostenibles para la mayoría de los pacientes [54, 75]. Además, dietas de restricción en carbohidratos, basadas en un cambio en el consumo de este tipo de macronutriente en lugar de calorías, también han demostrado revertir con éxito la DMT2 con intervenciones isocalóricas. Estas han conseguido reducciones significativas de HbA1c con pequeñas pérdidas de peso o sin pérdida de peso [73].

En relación con esto, se ha observado que la normalización de los niveles de glucosa en plasma puede ocurrir en algunos pacientes sólo horas o días después de la intervención quirúrgica bariátrica, por tanto, antes de lograr una pérdida de peso significativa [54, 75]. Se ha sugerido que la restricción calórica es un importante contribuyente de los beneficios metabólicos rápidos tras la cirugía, pues también se ha observado una rápida mejora metabólica equivalente a la de la cirugía bariátrica con dietas de restricción calórica [76]. De manera que la restricción calórica también podría orquestar mecanismos independientes de la pérdida de peso [71, 77]. Esta observación apunta a un papel relevante de regulación de la glucosa por parte del tracto gastrointestinal y a su implicación en la remisión. No obstante, a pesar de los años de investigación, los mecanismos exactos que subyacen a los efectos glucémicos beneficiosos después de la cirugía bariátrica aún no se comprenden del todo. Se ha propuesto que una serie de mecanismos potenciales diferentes, pero no mutuamente excluyentes, pueden contribuir a este efecto, incluidos los cambios en el metabolismo de los ácidos biliares, la detección de nutrientes del tracto gastrointestinal y la utilización de la glucosa, hormonas intestinales y la microbiota intestinal [71].

Una mejor descripción de los mecanismos podría ayudar a mejorar las herramientas para un mejor tratamiento o predecir aquellos pacientes que remitirían de la diabetes. Esto es de vital importancia en la práctica clínica para evitar la carga de la enfermedad, ya que se ha descrito que la vuelta al estado no diabético conlleva una mejora del riesgo cardiovascular, la hipertensión y el perfil lipídico. [54, 78].

En cambio, se encuentran mejor descritos los cambios fisiopatológicos en relación con los dos principales componentes etiológicos de la DMT2, tanto en la remisión a través

de cirugía bariátrica como por consumo de dietas de muy bajo contenido calórico [71, 79]. Los pacientes restablecieron la sensibilidad hepática a la insulina y presentaron una recuperación de la funcionalidad de las células β en paralelo con la observación de una disminución del contenido graso, encontrado en primer lugar en el hígado y, posteriormente en el páncreas [79]. Recientemente se ha descrito, que todos los pacientes sometidos a una intervención con restricción calórica, respondedores y no respondedores, disminuyeron la acumulación lipídica en hígado y páncreas. Sin embargo, solo normalizaron su glucemia los que restauraron la producción de insulina aguda en respuesta a la glucosa. Por tanto, la capacidad de reversibilidad de la función de las células β , posiblemente mediante re-diferenciación, parece ser un factor determinante para lograr la remisión [80]. Además, recientemente un estudio posterior de ese mismo ensayo clínico mostró la reversibilidad de la morfología del páncreas asociada a la remisión de la diabetes a largo plazo. Se observó un incremento del volumen y la regularidad de la forma en los pacientes que remitieron diabetes [81].

2.6 Mecanismos que intervienen en la patogénesis de la diabetes mellitus tipo 2

Los principales mecanismos celulares y moleculares hipotetizados para explicar resistencia a la insulina y la disfunción de las células β en la DMT2 han sido el estrés oxidativo, el estrés del retículo endoplásmico (RE), la deposición de amiloide en el páncreas, la deposición ectópica de lípidos en el músculo, el hígado y el páncreas, y lipotoxicidad y glucotoxicidad [82].

- *Glucotoxicidad*

Se denomina así a los efectos tóxicos de la hiperglucemia. La hiperglucemia crónica que se produce en esta enfermedad ejerce un efecto perjudicial en el fenotipo de las células β , lo que conduce a la disminución progresiva de la masa y funcionalidad de las células β a lo largo del tiempo [83]. La pérdida de identidad de las células β relacionada con la glucotoxicidad produce alteraciones en la expresión de muchos genes que en condiciones normales tienen una expresión enriquecida en las células β , como la del gen que codifica la insulina, que disminuye a causa de la glucotoxicidad [83]. Es destacable que los pequeños cambios en las concentraciones de glucosa, los cuales se manifiestan años antes de la aparición de la DMT2, también son tóxicos para las células β . Además, la hiperglucemia crónica promueve la resistencia a la insulina [82].

- *Lipotoxicidad*

Al igual que ocurre con la glucosa, los niveles de ácidos grasos libres (AGLs) en el plasma suelen aumentar en la obesidad, a consecuencia de la expansión e inflamación en el tejido adiposo y los estados de resistencia a la insulina. Los AGLs promueven tanto la resistencia a la insulina como la disfunción de las células β pancreáticas, desencadenando los dos principales factores subyacentes a la fisiopatología de la DMT2. Estos efectos nocivos de los AGLs en la homeostasis de la glucosa se denominan comúnmente lipotoxicidad [84]. La lipotoxicidad inducida por los AGLs también conduce al estrés del RE de las células β a través de diferentes mecanismos, incluyendo estrés oxidativo, el agotamiento del calcio (Ca^{2+}) y el deterioro del tráfico de proteínas del RE al Golgi [85]. Interesantemente, los ácidos grasos saturados parecen ser especialmente tóxicos, pues conducen a la acumulación de derivados metabólicos, tales como ceramidas, diacilglicerol y acil-coA grasos, que inducen resistencia a la insulina [84]. La combinación de glucosa elevada y AGLs tiene un efecto potenciador de la DMT2 (glucolipotoxicidad). La lipotoxicidad puede actuar a través de la circulación o localmente mediante la deposición ectópica de lípidos en los tejidos, pues la elevación de AGLs en la circulación conduce a su almacenamiento en otros tejidos diferentes al adiposo, principalmente en el hígado y músculo esquelético potenciando la resistencia a la insulina en ambos [86].

- *Estrés oxidativo*

Varios factores de estrés celular, incluida la exposición a largo plazo de altas concentraciones de glucosa y AGLs, conduce a una alta generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno, que generan estrés oxidativo dificultando la funcionalidad y supervivencia de las células [87]. El aumento del flujo glicolítico aumenta la fosforilación oxidativa y la generación de ATP, con la elevación concomitante de superóxido de la cadena de transporte de electrones. Además, niveles de glucosa elevados y persistente puede generar ROS a través de otros mecanismos, como la autoxidación de la glucosa y la generación de productos de glicación avanzada (AGEs), que exacerbaban los niveles intracelulares de ROS [85]. Asimismo, la β -oxidación peroxisomal de AGLs de palmitato genera peróxido de hidrógeno. Dado que las células β carecen de la enzima catalasa que inactiva dicho compuesto, este proceso contribuye especialmente al estrés oxidativo en este tipo celular [88]. Además, la glucosa y el palmitato elevados conducen

a una mayor formación de superóxido a través de la activación de la NADPH oxidasa [84].

El estrés oxidativo perjudica la función mitocondrial e integridad de las mitocondrias [89]. También, está bien establecido que la activación de la señalización de la quinasa amino terminal JUN (JNK) mediada por ROS conduce a disminución de la secreción de insulina. Así como también altera y daña el ADN. Además, las ROS interfieren en importantes vías de señalización celular, como PI3K/Akt, MAPK y del factor nuclear kappa B (NF- κ B) que median procesos de proliferación celular, inflamación y supervivencia celular [85]. Las células β tienen niveles muy bajos de enzimas antioxidantes y, por lo tanto, son especialmente vulnerables al estrés oxidativo [87]. En cuanto a la sensibilidad a la insulina, el estrés oxidativo puede inducir la fosforilación en el residuo Ser307 del sustrato 1 del receptor de insulina (IRS-1) y, por lo tanto, altera la señalización de la insulina contribuyendo a la resistencia a la insulina [85].

- *Estrés del RE*

El flujo de proteínas a través del RE de las células β es bastante elevado en condiciones fisiológicas normales, además en respuesta a la resistencia a la insulina, las células β aumentan la producción de insulina. Esto puede dar lugar a la acumulación de proteínas desplegadas en el RE, ya que el conjunto de chaperonas necesarias y la activación de la respuesta a proteínas desplegadas para evitar el mal plegamiento de las proteínas no es suficiente para la alta tasa de síntesis de proteínas, lo que conlleva a situación de desequilibrio con la acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del RE, desencadenando la respuesta de estrés del RE [87]. La glucolipototoxicidad, inflamación y estrés oxidativo promueve también este estrés del RE. Así como el estrés prolongado del RE conduce a una respuesta inflamatoria mediante activación de liberación de citoquinas como la interleucina-1 beta (IL-1 β) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y también desencadena la apoptosis [85]. También el estrés del RE altera de la señalización de la insulina en el músculo esquelético y el tejido adiposo y promueve un aumento de la gluconeogénesis en el hígado [90].

- *Depósito de amiloide*

Los depósitos de amiloide en los islotes pancreáticos se encuentran en la mayoría de los pacientes con DMT2 (más del 90%). El polipéptido amiloide de los islotes (IAPP)

es un péptido segregado junto con la insulina por las células β [91]. La mayor demanda y producción de insulina en la diabetes da lugar a la acumulación de IAPP sin procesar que podría iniciar la formación de depósitos amiloides, aunque un cambio en el ratio IAPP/insulina también se ha observado en la diabetes. Además, los AGLs también inducen la expresión de IAPP en las células β de humanos [92]. La agregación amiloide induce mecanismos proapoptóticos [91] y la inflamación local de los islotes con la liberación de IL-1 β que promueve la infiltración de macrófagos en el tejido [93].

Todas estas perturbaciones celulares pueden inducir una respuesta inflamatoria o se ven exacerbadas por la inflamación o asociadas a ella, sugiriendo un papel potencial de la inflamación en la patogénesis de la DMT2 [82].

2.7. Diabetes mellitus tipo 2, obesidad y resistencia a la insulina: inflamación como punto convergente

Una característica de esta enfermedad es la falta de respuesta a la insulina, denominada como resistencia a la insulina. La resistencia a la insulina inducida por la obesidad es el factor fisiopatológico subyacente dominante en la DMT2, ya que más del 80% de los pacientes con DMT2 tienen sobrepeso [94]. Actualmente se sabe que esta condición de obesidad caracterizada por un exceso de adiposidad, causa inflamación y disfunción del tejido adiposo, que pueden contribuir al desarrollo de la resistencia a la insulina relacionada con la obesidad [95].

Dado que la obesidad y la resistencia a la insulina se observan con frecuencia en paralelo con una inflamación crónica de bajo grado, la investigación ha tratado de conectar estos fenómenos, sustentando de manera más sólida que las vías inflamatorias son fundamentales en el desarrollo de la de la resistencia a la insulina y su conexión con la adiposidad [96]. Asimismo, estudios transversales y prospectivos han descrito elevados niveles circulantes de proteínas de fase aguda (como como la proteína C reactiva (P-CR), quimioquinas y citoquinas en pacientes diabéticos. Además, los niveles elevados de IL-1 β , IL-6 y P-CR son predictivos de la DMT2 [82].

En este respecto, se ha demostrado que la obesidad se asocia con la disfunción de los adipocitos, la infiltración de macrófagos y la inflamación crónica de bajo grado. La respuesta inflamatoria se activa durante la expansión del tejido adiposo en respuesta al exceso de nutrientes, lo que hace que el sistema inmunitario adopte un fenotipo

proinflamatorio, el cual se mantiene de manera crónica en la obesidad (**Figura 4**) [86, 96]. No obstante, es reversible como se ha observado tras pérdida de peso con una reducción de marcadores inflamatorios [97, 98]. En la actualidad, se conoce la importancia del papel de macrófagos del tejido adiposo en este proceso. Se produce un aumento del número e infiltración de los macrófagos y, una polarización hacia el fenotipo M1-macrofago (con actividad proinflamatoria) durante la expansión y estrés generado en el tejido adiposo. Esto conlleva a un aumento de cascadas inflamatorias y tormenta de citoquinas que contribuyen a la disfunción del tejido adiposo y aumento de AGLs [99]. La liberación de citoquinas, quimioquinas y AGLs del tejido adiposo a la circulación junto con el estrés metabólico, promueven la inflamación en otros tejidos sensibles a la acción insulina, como músculo e hígado, así como en los islotes pancreáticos [86]. Por tanto, no solo afecta a la acción de la insulina sino también al otro gran factor de la diabetes, la disfunción de la célula β . Ante esa situación de estrés y aumento de moléculas inflamatorias circulantes, en los islotes pancreáticos también se produce un reclutamiento de macrófagos, aumentando la producción de citoquinas y quimioquinas con la consecuente inflamación de los islotes que promueve la disfunción de las células β . De hecho, se han sugerido varios mecanismos mediante los cuales las citoquinas inflamatorias contribuyen a una disfunción de la célula β [100].

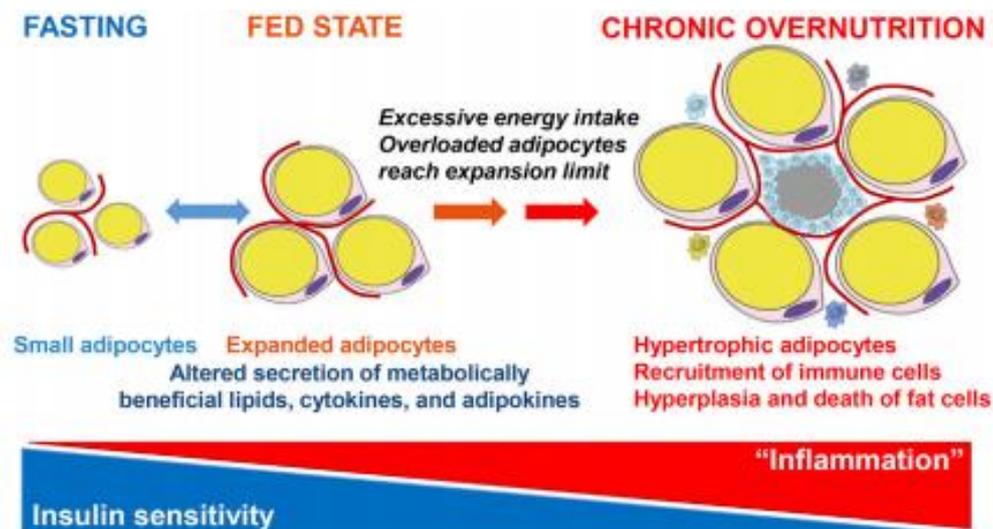


Figura 4. Alteración del tejido adiposo en la obesidad. *Modificada de Santoro et al [86].*

Recientemente, se ha evidenciado que los cambios inmunológicos del intestino influenciados por los factores microbianos y dietéticos asociados a la obesidad, también contribuyen al aumento de la permeabilidad de la barrera intestinal, la inflamación sistémica y alteración del metabolismo de la glucosa [101]. El sistema inmune intestinal

puede potencialmente extender su efecto por diseminación de citoquinas o por migración de células. Así como, el paso de lipopolisacáridos (LPS) y otros componentes bacterianos debido al aumento de la permeabilidad barrera intestinal hacia la circulación promueven la inflamación sistémica [102]. Además, se ha sugerido que la microbiota intestinal actúa como potenciador de la inflamación en el tejido adiposo. Algunos de estos productos de origen microbiano estimulan la señalización del receptor de tipo Toll 4 (TLR4), MyD88 y la molécula adaptadora de TLR1 (TRIF) de los adipocitos, promoviendo la inflamación mediada por la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) en el tejido adiposo, la cual aumenta la acumulación de macrófagos en el mismo [103].

La inflamación está directamente asociada a la resistencia a la insulina. La exposición de las células a citoquinas, incluidas, TNF α , IL-6, IL-1 β o a niveles elevados de AGLs promueve la resistencia a la insulina [82]. Concretamente, muchas de las vías de señalización inflamatorias o de estrés inducidas en la obesidad pueden bloquear directa o indirectamente la acción de la insulina, pues convergen para activar quinasas de serina y treonina [96]. Varias de estas quinasas de serina y treonina contribuyen a la inhibición de la señal intracelular de la insulina, particularmente el inhibidor de la quinasa del factor nuclear kappa B (IKKB), JNK y quizás otras quinasas activadas por el estrés [82], pues inhiben la fosforilación del sustrato del receptor de insulina 1 y 2 (IRS-1 y IRS-2) por el receptor de insulina y, por tanto, la señalización descendente intracelular [104] (**Figura 5**). JNK ha emergido recientemente como un regulador que juega un importante rol en el desarrollo de la resistencia a la insulina en la obesidad [105]. En respuesta a estímulos tales como estrés en el RE, citoquinas y AGLs, JNK es activado y fosforila IRS-1 en serina, bloqueando la fosforilación por el receptor de insulina e impidiendo, por tanto, la señal descendente intracelular de la insulina. Se ha observado una mayor actividad de JNK en hígado, músculo y tejido adiposo en la obesidad [106]. También se ha determinado que la pérdida de JNK previene el desarrollo de resistencia a insulina y diabetes en ratones obesos [105].

Además, estas quinasas de serina y treonina inducidas también son activadas a través de la familia de receptores tipo toll (TLRs) en respuesta a LPS y otros productos microbianos, AGLs y AGEs [82, 104]. Los TLRs están presentes en la superficie celular como un receptor transmembrana de muchos tejidos y células del sistema inmune. La señalización de TLR activa a IKKB y JNK, induciendo resistencia a la insulina además de la respuesta de genes proinflamatorios [104].

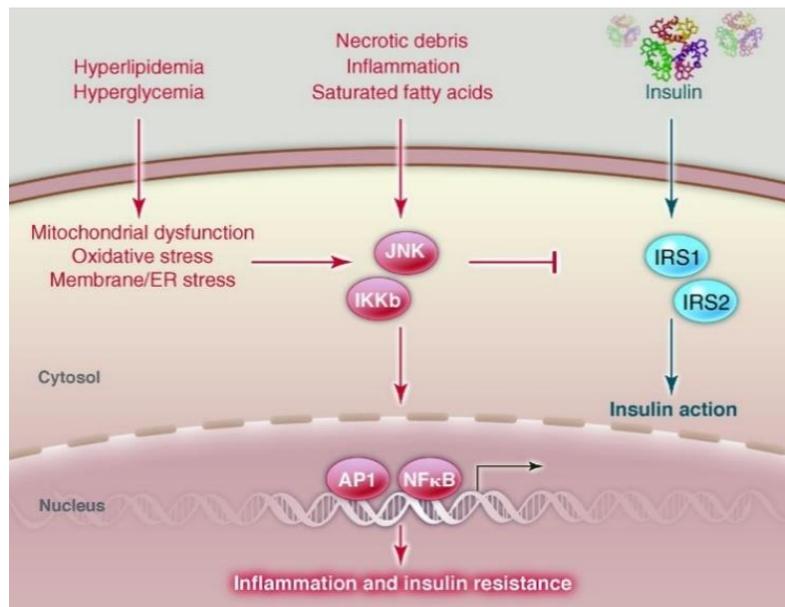


Figura 5. Rutas de señalización que vinculan la inflamación y otras respuestas inducidas por el exceso de nutrientes con la resistencia a la insulina. Modificado de Odegaard et al [107].

2.8 Importancia del papel del intestino en la diabetes mellitus tipo 2

El éxito de la cirugía bariátrica, que conlleva una reorganización del tracto intestinal, en la remisión de diabetes y el surgimiento de varios tratamientos prometedores contra la diabetes y la obesidad derivados de compuestos intestinales, como los análogos del péptido similar al glucagón 1 (GLP-1), ponen de manifiesto el papel del tracto gastrointestinal en las enfermedades metabólicas [19]. Actualmente la visión clásica del tracto gastrointestinal, como órgano de "digestión y absorción" ha cambiado hasta el punto de considerarse un importante contribuyente a la homeostasis metabólica. La ingestión de nutrientes da lugar a mecanismos reguladores complejos, que se originan en el intestino y contribuyen al control de la ingesta de alimentos, el metabolismo de la glucosa, el gasto energético y la termogénesis, entre otros posibles procesos asociados al metabolismo [108]. En el caso del metabolismo glucídico, las señales postprandiales derivadas del intestino pueden reducir la producción hepática de glucosa, aumentar la producción y secreción de insulina, reducir los niveles de glucagón y alterar la captación de glucosa [19].

La señal de los nutrientes intestinales preabsortivos induce la liberación de péptidos intestinales en las células enteroendocrinas de la mucosa epitelial del intestino. Una vez liberados, los péptidos intestinales pueden actuar localmente sobre las neuronas aferentes

que inervan el tracto gastrointestinal, las cuales envían señales nerviosas al sistema nervioso central o a las neuronas entéricas, y/o pueden entrar en la circulación para actuar de manera endocrina en el sistema nervioso central o en los diferentes tejidos, para regular el metabolismo de la glucosa [109]. Por ejemplo, GLP-1 y el polipéptido insulínico dependiente de la glucosa (GIP), conocidos colectivamente como incretinas, actúan en el islote pancreático induciendo la secreción de insulina por las células β e inhibiendo la secreción de glucagón en las células α [110]. Además, los receptores de GLP-1 (GLP-1R) también se localizan en neuronas aferentes vagales que inervan el intestino muy cerca de las células L, lo que indica un posible eje paracrino intestino-cerebro para mediar sus efectos reduciendo la ingesta, así como posiblemente en la homeostasis glucémica [111]. El efecto de GLP-1 se ha puesto de manifiesto con el uso de agonistas del receptor de GLP-1 en el tratamiento de la DMT2. Además, se ha reportado un aumento de las concentraciones de GLP-1 tras la cirugía bariátrica, el cual se ha asociado con los efectos metabólicos beneficiosos de la intervención en los pacientes con DMT2 [110]. Sin embargo, el aumento de GLP-1 no es el único mecanismo por el que puede producirse una disminución de la glucosa tras este procedimiento quirúrgico. Pues la inhibición de la señalización de GLP-1 atenúa, pero no evita la disminución de la glucemia después de la cirugía bariátrica. Así como, los ratones deficientes en GLP-1R siguen mostrando una mejor glucemia después de la intervención quirúrgica [112].

Por otro lado, los ácidos biliares del intestino también son importantes en la regulación del metabolismo de la glucosa, los cuales son otros de los candidatos a contribuir a los efectos de la cirugía bariátrica [19]. De hecho, la gastrectomía vertical en manga (VSG), que implica la extirpación de aproximadamente el 80% del estómago manteniendo la integridad intestinal, da lugar a una reducción de peso sostenida y a una mejora del control glucémico, la cual no se atribuye a cambios en la señalización del GLP-1 [113] u otros péptidos intestinales [114], sino a un aumento de la señalización ácido biliar-receptor X farnesoide (FXR) [115].

Además, la importancia del intestino también se ha puesto de manifiesto a través de fármacos antidiabéticos, como la metformina, que ejerce un efecto glucorregulador a través del intestino, pues activa la vía duodenal dependiente de la AMP-proteína quinasa (AMPK), lo que origina una reducción en la producción hepática de glucosa [116].

Un nexo común de todos estos mecanismos intestinales es la microbiota intestinal. La microbiota produce metabolitos que tienen efectos en la liberación de las hormonas intestinales, así como también regula la composición de los ácidos biliares y es modulada por fármacos como la metformina [117]. Por tanto, las comunidades bacterianas del tracto gastrointestinal pueden representar el desencadenante inicial de las mejoras metabólicas observadas tras estos tratamientos quirúrgicos y farmacológicos [108]. De manera que en los últimos años ha crecido el interés científico por comprender mejor cómo la interacción entre la microbiota intestinal podría repercutir en el metabolismo del huésped y sus aplicaciones clínicas [118].

3. Microbiota intestinal

El intestino humano alberga un ecosistema complejo de microorganismos, mayoritariamente bacterias. Este se estimó que está constituido por alrededor de un trillón de células, es decir, diez veces más que el número de células humanas. Sin embargo, dicha estimación ha sido revisada recientemente en otro estudio, el cual ha sugerido que la proporción de células es en realidad más cercana a 1:1 [119]. El genoma global de esta microbiota, denominado microbioma, tiene más de 5 millones de genes, es decir, 150 veces más que el propio genoma humano [120]. Esto explica la complejidad de las interacciones metabólicas y relaciones simbióticas que se establecen entre la microbiota intestinal y su organismo hospedador, las cuales son necesarias para mantener un estado óptimo de salud [121]. De hecho, actualmente es considerado que actúa como un órgano más del cuerpo [122]. La microbiota intestinal es fundamental para la digestión y absorción de nutrientes, proteger barrera intestinal y evitar el crecimiento de otros microorganismos patógenos, además, potencia el desarrollo y función del sistema inmune, produce vitaminas, realiza la biotransformación de ácidos biliares, metaboliza fármacos y xenobióticos y produce compuestos que regula el metabolismo del huésped [117, 123, 124].

Recientemente, nuestra capacidad para estudiar la amplitud de la microbiota intestinal ha mejorado mucho gracias a la llegada de enfoques independientes del cultivo, como los métodos de secuenciación de alto rendimiento y bajo coste. La secuenciación del gen del ARN ribosómico (ARNr) 16S bacteriano es un enfoque habitual, ya que este gen está presente en todas las bacterias y arqueas y contiene nueve regiones altamente variables (V1-V9), lo que permite distinguir fácilmente entre las diferentes

clasificaciones taxonómicas bacterianas [117, 118, 125]. El Proyecto Microbioma Humano ha proporcionado una descripción suficientemente detallada de la composición microbiana asociada al ser humano. La microbiota intestinal está compuesta principalmente por 5 filos: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* y *Verromicrobia*. En un individuo sano, predominan *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, que representan más del 90% del total de la micorbiota intestinal [126]. El filo *Proteobacteria* se encuentra en una pequeña proporción en personas sanas, sin embargo, se ha encontrado en un mayor porcentaje en personas con algunas patologías, sugiriéndose como marcador potencial de alteración en la microbiota [127].

La composición bacteriana varía a lo largo del tracto intestinal y está condicionada por factores como el pH, la concentración de oxígeno, que aumentan y decrecen respectivamente desde el intestino proximal al distal, o la disponibilidad de nutrientes [118]. En general conforme se avanza a lo largo del intestino aumenta la cantidad y diversidad de organismos. Esto es debido a que en el intestino delgado suele haber altos niveles de ácidos, oxígeno y sustancias antimicrobianas y, un tiempo de tránsito corto. Estas propiedades limitan el crecimiento bacteriano, en cambio, las condiciones del colon favorecen una comunidad numerosa y diversa de bacterias, principalmente anaerobias. En el colon las familias *Prevotellaceae*, *Lachnospiraceae* y *Rikenellaceae* han demostrado ser predominantes [128]. Además, la distribución de los ácidos biliares en el intestino delgado y grueso también puede afectar a la dinámica de la comunidad bacteriana en el intestino. Los ácidos biliares primarios, como el taurocolato, pueden proporcionar señales de búsqueda a las bacterias del intestino y promover la germinación de esporas, y también pueden facilitar la recuperación de la microbiota después de una disbiosis inducida por antibióticos o toxinas [129]. Además, la reducción de la concentración de ácidos biliares en el intestino puede desempeñar un papel importante al permitir la expansión de los taxones microbianos proinflamatorios [130].

La microbiota intestinal juega un papel importante en el mantenimiento de la estructura y función del tracto gastrointestinal, pues, el sistema digestivo mantiene su homeostasis gracias al equilibrio entre microbiota, permeabilidad intestinal e inmunidad local. Si uno de estos factores se altera, repercute en los demás y puede afectar negativamente sobre el organismo [131]. Además, metabolitos y compuestos de origen bacteriano pueden modificar el metabolismo humano [117, 123]. Por ello, la composición de la microbiota intestinal ha logrado un particular interés y se ha asociado con el

desarrollo de muchas enfermedades, en particular enfermedades inflamatorias y metabólicas como la obesidad, la DMT2 y en la enfermedad de hígado graso no alcohólico [117, 132].

La composición de la microbiota intestinal de cada individuo está condicionada desde el momento del nacimiento. Así pues, las infecciones vaginales maternas o la periodontitis pueden provocar la invasión de bacterias en el entorno uterino. En el segundo caso, la microbiota oral podría ser transportada a través del torrente sanguíneo de la madre al feto [133]. La forma de parto también influye, en un parto natural el bebé tiene una microbiota intestinal de composición parecida a la microbiota vaginal de la madre, mientras que si nace por cesárea tienen una composición similar a la microbiota de la piel de la madre [118, 121]. También se ha observado que la leche materna hace que se adquiera en los primeros días una microbiota rica en *Bifidobacterium*, lo cual produce grandes cantidades de acetato y lactato, que protegen contra bacterias patógenas, mientras que si la alimentación se lleva a cabo con leche de fórmula no materna predominan bacterias del género *Clostridium* [132]. Después, durante los primeros 3 años de vida la microbiota intestinal va evolucionando hasta una aparente estabilización de la microbiota intestinal en una configuración similar a la del adulto, durante la cual aumenta la α diversidad, aumentando la abundancia de todos los filos bacterianos y adquieren una microbiota con predominio de géneros dentro del filo *Firmicutes* [134] (Figura 6).

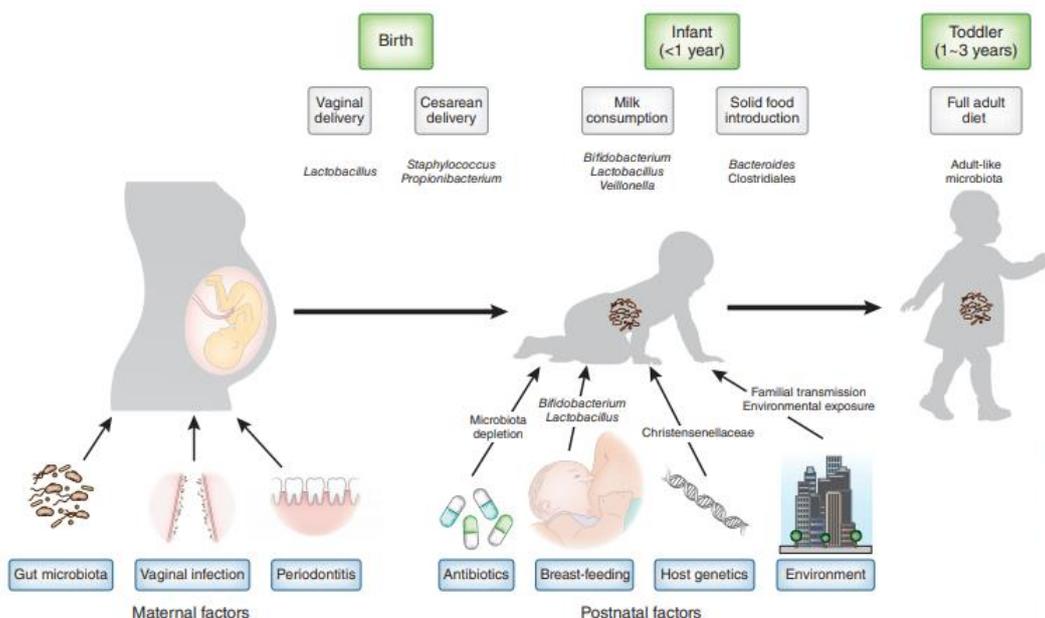


Figura 6. Desarrollo de la microbiota intestinal humana en los primeros años de vida. Modificado de Tamburini et al [133].

Aunque, en la edad adulta, la composición de la microbiota intestinal es relativamente estable, la microbiota intestinal se modifica a lo largo de la vida por una serie de factores como la edad, la dieta o el consumo de antibióticos [121]. Todos estos factores, más los factores genéticos y sociodemográficos contribuyen a la variabilidad interindividual de la microbiota intestinal [132, 135] (**Figura 7**). Asimismo, estos factores pueden alterar la microbiota de manera perjudicial, esta alteración conocida como disbiosis, puede propiciar el desarrollo de las enfermedades relacionadas con la microbiota intestinal [121]. Por tanto, la composición y diversidad de la microbiota intestinal parece ser clave en el desarrollo de estas enfermedades, no obstante, no existe un único perfil de microbiota ideal, pues diferentes bacterias pueden ejercer la misma función metabólica [136]. Sin embargo, cabe destacar que una alta diversidad y riqueza bacteriana intestinal no son por sí solas indicadores imparciales de una microbiota saludable, porque el tiempo de tránsito intestinal afecta a la riqueza microbiana [137], de manera que estudios de composición y funcionalidad parecen aportar mayor conocimiento en el vínculo de la microbiota con las enfermedades metabólicas [117].

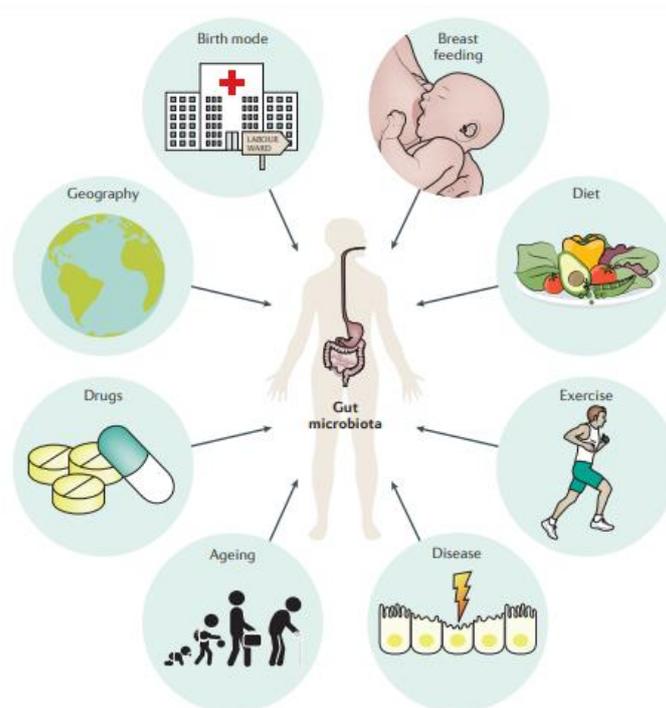


Figura 7. Factores que pueden influir en la composición y función de la microbiota intestinal humana. Modificado de Quigley et al [138].

3.1 Microbiota intestinal y obesidad

Varios estudios realizados tanto en ratones como en humanos describieron un perfil de microbiota asociado al fenotipo obeso, caracterizado por una mayor ratio de *Firmuctes/Bacteroidetes* en comparación con el encontrado en el fenotipo delgado. Sin embargo, otros estudios posteriores en humanos no encontraron dicha relación [132]. Esta aparente controversia se ha apuntado que puede deberse a variaciones en las dietas o en el método usado para determinar la composición de la microbiota, que puede subestimar la representación de *Bacteroides* [118, 139]. Además, otros factores pueden influenciar en esta proporción, como la edad, que favorece una disminución en este ratio, pues en sujetos de edad avanzada se observó un aumento de *Bacteroides spp.* en comparación con la microbiota de sujetos jóvenes [140]. Incluso el consumo de antibióticos, también puede afectar a la abundancia de este género [122]. También podría deberse a un análisis de un taxon bacteriano muy amplio, de manera que un mismo ratio de estos *phyla* podría suponer una composición a nivel de género o especies completamente distinta y, por tanto, con funcionalidad distinta [122, 132]. Mejorando este aspecto, un estudio reciente ha encontrado que la composición de la microbiota intestinal de individuos obesos se caracteriza por una reducción significativa de los géneros *Akkermansia*, *Alistipes*, *Faecalibacterium* y *Oscillibacter*, estas dos últimas bacterias productoras de butirato [141], el cual tiene efectos antiinflamatorios [142]. Así como también se ha descrito una menor diversidad en los pacientes con obesidad [94, 143]. *Akkermansia muciniphila* está asociada con el mantenimiento de la barrera intestinal y la reconstitución de los niveles de esta bacteria se ha observado que mejora la acción de la insulina y la tolerancia a la glucosa [132]. *Alistipes*, es un productor de propionato así como de acetato y, se ha visto también reducido en otras enfermedades metabólicas como en la enfermedad del hígado graso no alcohólico, mostrando una correlación negativa con la progresión de la fibrosis hepática [144].

No obstante, ha sido evidenciado que el perfil de la microbiota intestinal puede determinar la capacidad captar energía a través de los alimentos, con la consecuente contribución a una mayor adiposidad y desarrollo de obesidad. Se demostró que los ratones libres de microorganismos estaban más delgados que sus otros compañeros ratones siendo criados ambos de forma convencional [139]. Además, tampoco adoptan un fenotipo obeso consumiendo la dieta occidental y son menos susceptibles a desarrollar la resistencia a la insulina. Se observó que estos ratones tenían un menor consumo de

calorías y un aumento de la excreción fecal de colesterol [145]. Además, tras el trasplante fecal de la microbiota intestinal de ratones normales a los ratones ausentes de microorganismos, se observó un aumento significativo de la grasa corporal, pese a que se les redujo el consumo de alimentos (**Figura 8**). Esto se relacionó indirectamente con un aumento de la oxidación de ácidos grasos en los ratones libres de microorganismos, pues mostraron una mayor actividad de AMPK [121, 125, 132]. Adicionalmente, estos hallazgos fueron reforzados por un posterior estudio que observó que cuando se transfirió la microbiota de una persona obesa a un ratón delgado, aumentó el porcentaje de grasa total, el cual favorece la resistencia a la insulina. También se demostró que la transferencia de la microbiota de su gemelo delgado, impidió el aumento de la masa corporal y de los fenotipos metabólicos asociados a la obesidad en ratones obesos, aunque el efecto fue dependiente de la dieta [117, 146]. Se concluyó que el microbioma de los ratones obesos es capaz de extraer más energía de los componentes de la dieta.

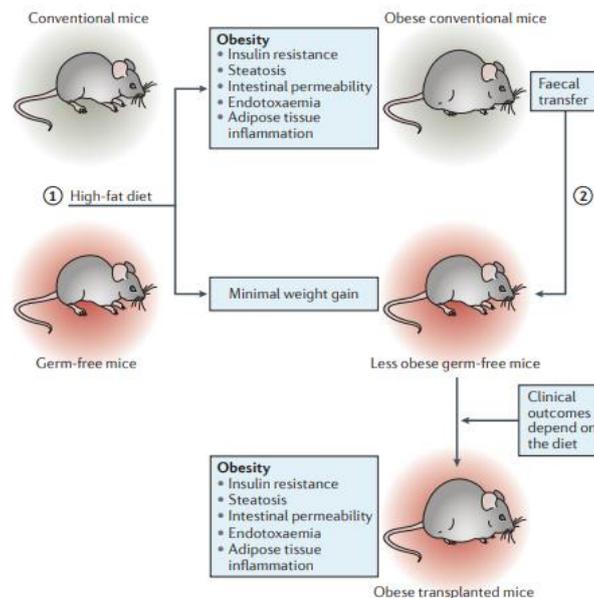


Figura 8. Esquema de los hallazgos a partir de ratones sin gérmenes y transferencia fecal que determinan un papel de la microbiota intestinal en la obesidad. Modificado de Aron-Wisnewsky et al [147].

3.2 Microbiota intestinal y diabetes mellitus tipo 2

En las últimas décadas, investigaciones sobre compuestos de origen bacteriano sugieren que la microbiota intestinal no solo tiene importancia a nivel de obtención y almacenamiento de energía, sino también en la regulación de la homeostasis de la glucosa y lípidos [123]. En cuanto a la composición de la microbiota en la DMT2, estudios

transversales de casos y controles a gran escala basados en análisis del metagenoma han observado una disbiosis en los pacientes con DMT2. La microbiota de estos pacientes diabéticos difiere de la microbiota de los pacientes sanos y se caracteriza por una disminución de bacterias productoras de butirato, como *Roseburia intestinalis* y *Faecalibacterium prausnitzii*. Así como también se identificó un aumento de patógenos oportunistas, como *Bacteroides caccae*, varios *Clostridiales*, incluido *C. clostridioforme*, y *Escherichia coli*. Además, estos estudios basados en metagenómica mostraron un aumento de la expresión de genes microbianos implicados en estrés oxidativo y reducción de sulfato, es decir, indicativo de una microbiota intestinal proinflamatoria [148, 149].

Estos estudios se realizaron en pacientes con DMT2 ya diagnosticada y con tratamiento oral hipoglucemiante. Por tanto, estos estudios, no solo no demuestran causalidad de la composición de la microbiota intestinal en el desarrollo de la enfermedad [94, 118], sino que los resultados de estos estudios podrían haber sido influenciados por fármacos antidiabéticos. Se ha demostrado que la metformina, la acarbosa y terapias basadas en GLP-1 modifican la composición de la microbiota intestinal [150-153]. De esta forma el tratamiento hipoglucemiante, podría ser un factor de confusión. Se ha descrito que la metformina aumenta *Escherichia spp.* y *A. muciniphila*, géneros incrementados en el estudio de referencia Qin et al. en los pacientes con DMT2 [148].

No obstante, un estudio posterior observó que la microbiota intestinal de los pacientes con DMT2 también está alterada en ausencia de tratamiento para la diabetes [154]. Además, también se ha observado una alteración de la microbiota intestinal en pacientes prediabéticos [154, 155]. En concordancia con los anteriores estudios, en estos también la abundancia de varias bacterias productoras de butirato se encontraba reducida. Además, la resistencia a la insulina estaba fuertemente asociada a las diferencias encontradas [154]. Este estudio sugiere que la microbiota intestinal representa un importante factor modificable que tener en cuenta a la hora de desarrollar enfoques de medicina de precisión para la prevención y/o el retraso de la DMT2 [67]. En relación con esto, recientemente los resultados de otro estudio han sugerido el uso potencial del microbioma para evaluar el riesgo de DMT2, no obstante, nuevamente la evidencia científica y valor predictivo de un perfil de microbiota derivado de un análisis transversal es limitado [156].

Un mayor nivel de evidencia científica del papel de un determinado perfil de microbiota intestinal en la fisiopatología de la diabetes es aportado por estudios de transferencia fecal de microbiota. Varios estudios en humanos mostraron una mejora transitoria de la sensibilidad a la insulina tras el trasplante fecal de individuos sanos a pacientes con síndrome metabólico [157, 158].

Además, debido a la preocupación por la variabilidad de los resultados reportados hasta el momento, una revisión sistemática de los estudios observacionales en humanos que han investigado la DMT2 y el microbioma bacteriano, trató de identificar los hallazgos comunes y consistentes entre estos. La abundancia de los géneros de *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Faecalibacterium*, *Akkermansia* y *Roseburia* se asociaron negativamente con la DMT2, mientras que una mayor abundancia de los géneros de *Ruminococcus*, *Fusobacterium* y *Blautia* se asociaron positivamente con la DMT2 [159]. Probióticos con *A. muciniphila* y especies de *Bifidobacterium* apoyan su papel beneficioso en el metabolismo glucídico [160, 161]. Por otro lado, el incremento de *Faecalibacterium* tras cirugía bariátrica en pacientes con DMT2 ha sido asociado con una mejora de la homeostasis de la glucosa [162]. Además, en dicha revisión también se ha propuesto los mecanismo específicos para cada uno de estos taxones bacterianos que podrían ser relevantes para la patología DMT2 [159]. Sin embargo, debido a las discrepancias en los resultados observacionales y la poca consolidación de la causa-efecto directa, aún no existe una caracterización sólida en cuanto al perfil de microbiota asociado a la DMT2 [117].

En la actualidad, con las investigaciones realizadas hasta el momento, mayoritariamente transversales de casos y controles, no se puede concluir si la composición de la microbiota intestinal analizada se vio afectada antes del desarrollo de la enfermedad (causa) o si la composición de la microbiota es un reflejo (consecuencia) de la propia enfermedad o alteración metabólica del huésped [117, 118]. Esta situación puede aclararse en parte en grandes estudios prospectivos, en el que analizar si la composición inicial de la microbiota intestinal actúa como un factor impulsor del desarrollo de la enfermedad, demostrando la contribución causal [118, 139].

Sin embargo, gracias a estos estudios previos, se ha postulado que puede existir un perfil característico de microbiota intestinal asociado a la DMT2, que podría aportar nuevos aspectos sobre su relevancia fisiopatológica. Así mismo, bacterias intestinales

podrían funcionar como marcadores de diagnóstico precoz en la clínica para identificar mejor de aquellos sujetos que son más susceptibles a desarrollar DMT2 [139]. No obstante, para reforzar el potencial predictivo de patrones particulares de diversidad y composición microbiana, más investigación es necesaria, especialmente en cohortes prospectivas y en ensayos de intervención [118].

3.3 Mecanismos por los cuales la microbiota intestinal podría contribuir en la fisiopatología de la diabetes mellitus tipo 2

3.3.1 Permeabilidad de la barrera epitelial intestinal y endotoxemia metabólica

La barrera intestinal está formada por la barrera de la mucosa intestinal, la barrera epitelial intestinal y la barrera vascular intestinal, que en conjunto aíslan el contenido del intestino de los tejidos y órganos extraintestinales. La barrera epitelial intestinal regula la permeabilidad celular y la entrada pasiva de nutrientes, iones y agua. En un individuo sano la permeabilidad se encuentra regulada, dado que existen complejos de unión y conexión entre las células epiteliales, que incluyen uniones estrechas, en inglés “Tight junction” (TJ), uniones tipo gap, uniones de adhesión y desmosomas [163]. En las enfermedades metabólicas, como la DMT2, se produce una destrucción de la barrera intestinal y aumento de la permeabilidad, disminuyéndose la expresión de genes que codifican proteínas de las uniones TJ, asociada a una disbiosis de la microbiota intestinal. Por lo tanto, las citoquinas proinflamatorias y componentes de origen microbiano dañinos pasan más fácilmente través de la barrera intestinal para entrar en la circulación sistémica [164].

La permeabilidad de la barrera intestinal se altera por la propia alteración metabólica que ocurre en esta afección, pues se ha evidenciado que la hiperglucemia en pacientes con DMT2 inhibe la integridad de las uniones TJ y de las uniones de adhesión de manera dependiente del transportador de glucosa GLUT2, con la consecuente aceleración la destrucción de la barrera intestinal [165]. No obstante, la microbiota intestinal también tiene un papel muy relevante en la alteración de la barrera intestinal [118], pues se ha observado que después de trasplantar la microbiota de ratones sanos a ratones alimentados con una dieta alta en grasas, mejoró la integridad de la barrera intestinal y evitó el desarrollo de alteraciones metabólicas asociadas [166]. Además, se ha observado que los cambios en la microbiota intestinal inducido con antibióticos en

ratones alimentados con una dieta alta en grasas reducen los efectos negativos derivados del aumento de la permeabilidad barrera intestinal, como la inflamación y la tolerancia a la glucosa alterada. En particular, se mostró una reducción de la aparición de inflamación del tejido adiposo, el estrés oxidativo y los marcadores de macrófagos; además de prevenir la hipertrofia de los adipocitos y mejorar los parámetros metabólicos de la diabetes y la obesidad en ratones alimentados con una dieta alta en grasas [164].

Esto se debe en parte a compuestos microbianos capaces de ejercer un *cross-talk* con las células epiteliales de la barrera intestinal y alterar su integridad. Existen bacterias intestinales capaces de secretar proteasas que degradan la mucina de la barrera intestinal [163], esto es especialmente importante pues la capa de mucosa de lumen tiene propiedades y componentes antimicrobianos, que impiden la invasión y sobrecrecimiento de bacterias patógenas o perjudiciales [125]. Además, compuestos tóxicos producidos por el metabolismo microbiano, como aminos, indoles, fenoles, H₂S y aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs), también podrían mediar una alteración de la permeabilidad de la barrera intestinal. Probablemente a través de la reducción de la expresión de proteínas de las uniones TJ [118, 125]. Como consecuencia del aumento de la permeabilidad y daño de la barrera intestinal, los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) de las bacterias intestinales, como los LPS de la pared bacteriana de las bacterias gram-negativas, flagelinas y peptidoglicanos, pueden pasar mediante vía paracelular desde el lumen a la circulación sanguínea, contribuyendo a la inflamación crónica de bajo grado que caracteriza a la DMT2. Este fenómeno se conoce como endotoxemia metabólica [164] (**Figura 9**).

La mayoría de los estudios sobre permeabilidad intestinal en relación con enfermedades metabólicas se han centrado en determinaciones de LPS, generándose una evidencia consolidada sobre este [125]. Diferentes estudios, tanto en ratones como en humanos, han mostrado un aumento de los niveles circulantes de LPS en la obesidad con resistencia a la insulina y también se ha asociado con un mayor riesgo de diabetes [167, 168]. También, se ha observado una acentuación aún mayor de niveles plasmáticos de LPS en pacientes diabéticos. Se ha observado que los individuos con DMT2 presentaron un 76% más elevado los niveles de LPS que los individuos sin la enfermedad [132]. Además, la perfusión intravenosa de LPS resultó en inflamación sistémica, resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa [125]. Actualmente se conoce que LPS activa la respuesta inflamatoria interaccionando de manera específica y con una alta afinidad con

los receptores TLR4, el cual se encuentra en la superficie de macrófagos, células dendríticas y otras células del sistema inmune. El reconocimiento de LPS por este receptor está mediado por la proteína de unión a LPS conocido por sus siglas en inglés como LBP, el cual es empleado como marcador de endotoxemia y, se encuentra también incrementado en la obesidad y el síndrome metabólico (186). La interacción de LPS con TLR4 conduce a la activación de la vía de señalización de NF- κ B e induce la liberación de citoquinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6, TNF- α y MCP-1, potenciando la respuesta inflamatoria en los tejidos metabólicos y promoviendo la resistencia a la insulina [164].

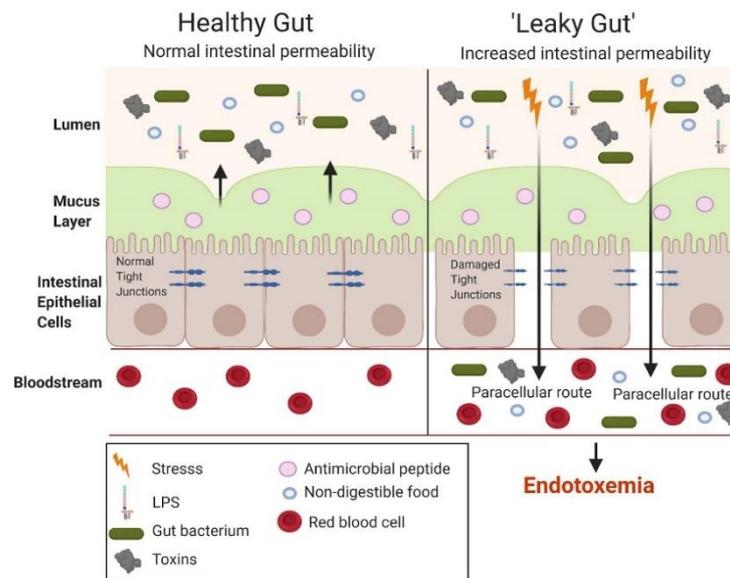


Figura 9. Comparación entre intestino con permeabilidad normal y permeabilidad aumentada. Las uniones estrechas se dañan en respuesta al estrés, por ejemplo, ante el exceso calórico largo plazo, esto provoca un aumento de la permeabilidad que permite el paso de LPS y otros patógenos al torrente sanguíneo, provocando la activación del sistema inmunitario y la inflamación, proceso conocido como endotoxemia. *Modificado de Mohammad et al [102].*

La expresión del receptor TLR4, no es exclusiva de células del sistema inmune, las células con funciones metabólicas relevantes en la acción de la insulina, como los adipocitos, los hepatocitos, células del músculo y células del endotelio, también expresan receptores TLRs, siendo células diana de LPS [132]. En la vía de señalización activada por el TLR4, se activan serinquininasas como JNK e IKK que desempeñan un papel importante en la inducción de la resistencia a la insulina a través de la fosforilación de la serina del IRS-1 [169]. Esta modificación postraduccional del IRS-1 se ha considerado un marcador de resistencia a la insulina [170] (**Figura 10**). Es por tanto que esto podría explicar la correlación positiva entre el aumento de la permeabilidad intestinal y la resistencia a la insulina, observada a través del índice HOMA-IR [171]. La importancia

de la endotoxemia metabólica en la fisiopatología de la resistencia a la insulina y la obesidad ha sido destacada ante el hallazgo de que la inactivación del gen TLR4 en ratones, protegía contra la resistencia a la insulina inducida por una dieta alta en grasas [169]. Además, los ratones *knockout* de TLR4 específicos del tejido hepático que fueron alimentados con una dieta alta en grasas durante 16 semanas, presentaron una mejora en la tolerancia a la glucosa y en la sensibilidad a la insulina, asociada a una mejora en la señalización de la insulina en el hígado [132]. De acuerdo con el importante papel del hipotálamo en la integración de la señalización de la insulina y el metabolismo de la glucosa, el bloqueo de TLR4 en ratones obesos específicamente en el hipotálamo ha mostrado mejorar la acción periférica de la insulina [172]. En concordancia con esto, la mejora del metabolismo de la glucosa junto con la pérdida de peso después de la cirugía bariátrica se ha visto acompañada con reducciones significativas de los niveles de LPS y LBP [167]. Por tanto, la endotoxemia supone un factor asociado al desarrollo de la inflamación y resistencia a la insulina.

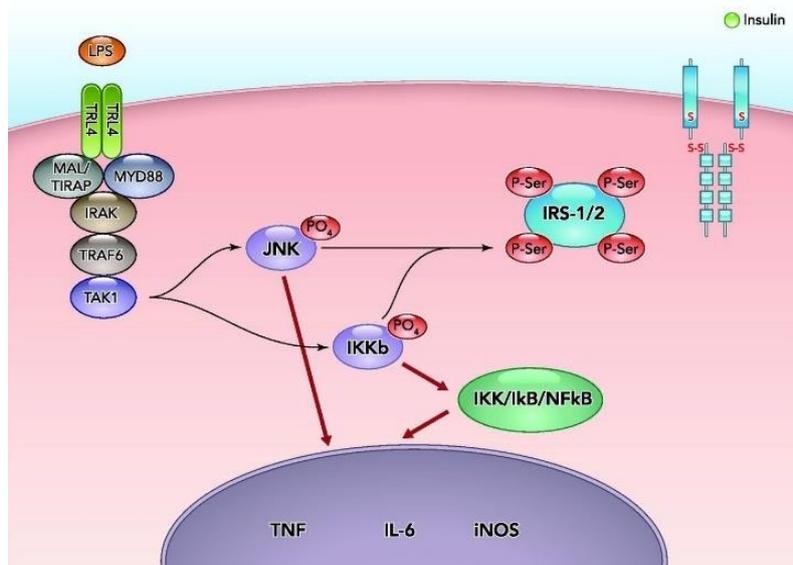


Figura 10. Esquema de la señalización celular mediada por LPS-TLR4 que induce inflamación y la resistencia a la insulina. *Modificada de Saad et al [132].*

Además de este mecanismo clásico de resistencia a la insulina a través del TLR4, el aumento del LPS circulante, conduce a un aumento de la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) [132]. El aumento de la expresión de la iNOS induce la S-nitrosación/nitrosilación de proteínas, en la que el óxido nítrico reacciona con los residuos de cisteína de las proteínas, alterando su función [169]. Por lo tanto, el LPS también puede alterar la señalización de la insulina mediante la S-nitrosación/S-nitrosilación del receptor

de la insulina, IRS-1 y Akt en los tejidos sensibles a la insulina [173, 174]. Muy recientemente se ha demostrado que la S-nitrosación/S-nitrosilación es un fenómeno temprano y central en la inducción del estrés del RE, que también se considera un importante mecanismo molecular de la resistencia a la insulina [132].

Interesantemente, se ha observado un aumento de LPS postprandial con una ingesta alta de grasas, lo cual se explica porque una vía de entrada a la circulación y distribución de LPS son los quilomicrones [125]. Por tanto, el LPS puede entrar en la circulación sistémica a través de tres rutas principales. Una de ellas es la ruta paracelular, a través de las uniones TJ entre las células epiteliales intestinales. Otra es la ruta transcelular, a través de las células epiteliales mediante internalización de LPS- TLR4 activado /MD-2 en microdominios de membrana denominados “rafts” [175]. La última ruta implica la internalización del LPS por las células epiteliales a través de la superficie apical y el transporte del LPS al aparato de Golgi, para su posterior incorporación a los quilomicrones. En este respecto, el cambio ayuno-postprandio de los niveles de LPS, puede ser un factor relevante de la inflamación postprandial [169]. De hecho, los niveles circulantes de LPS postprandiales están exacerbados en pacientes diabéticos [176]. Además, un mayor aumento postprandial de LPS se ha asociado con un mayor riesgo de desarrollo de diabetes [177].

Los cambios en la microbiota que conducen a la endotoxemia, no solo tienen relación con el aumento de la permeabilidad, sino con la alteración en general del funcionamiento de la barrera intestinal. El sobrecrecimiento de bacterias oportunistas proinflamatorias en un estado saludable es controlado por proteínas antimicrobianas (AMPs), secretadas principalmente por las células inmunitarias de Paneth. Sin embargo, los sujetos con obesidad tienen menos AMPs, incluyendo la α -defensina, así como una lisozima reducida [178]. Además, la función de las células Paneth se encuentra alterada en individuos obesos, lo que podría contribuir a la modificación de la microbiota asociada a la obesidad y la DMT2, caracterizada por un mayor incremento de bacterias oportunistas [125]. Otro regulador importante en el sistema inmune intestinal que impide el paso de bacterias o componentes bacterianos, son los anticuerpos IgA, que pueden unirse a las bacterias impidiendo su adherencia a la mucosa como parte de los mecanismos de exclusión inmunológica [179]. En este respecto, se ha evidenciado que la dieta alta en grasas provoca una disminución de la secreción de IgA junto con una menor tolerancia a la glucosa [180].

Por otro lado, existen bacterias intestinales beneficiosas que protegen la barrera intestinal, pues tienen efectos como la disminución de la inflamación, estimulación de la diferenciación de las células caliciformes, aumento del grosor de la capa de moco y mejora de la función de las uniones estrechas. Algunas de estas bacterias son *A. muciniphila*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *F. prausnitzii*, y *Bifidobacterium longum* [181, 182]. *A. muciniphila*, por ejemplo, disminuye la permeabilidad del intestino mediante vesículas extracelulares que mejoran las uniones estrechas intestinales a través de la activación de las AMPK en el epitelio [125]. Además, la proteína de ultramembrana (Amuc_1100) de esta bacteria aumenta la expresión de la ocludina y de la proteína de unión estrecha-1 (Tjp-1) a través de TLR2, mejorando la integridad del intestino [117] (Figura 11).

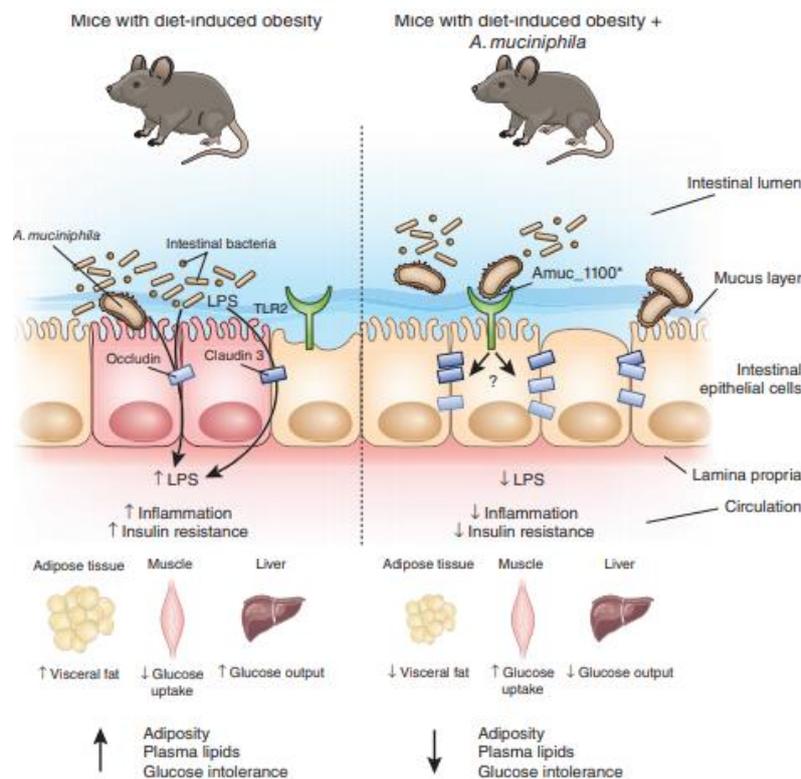


Figura 11. *Akkermansia muciniphila* pasteurizada y su proteína de membrana externa Amuc_1100* mejoran la integridad de la barrera intestinal y el síndrome metabólico en ratones con obesidad inducida a través de la dieta. Modificado de Anhê et al [183].

Además de LPS, otros metabolitos derivados de la microbiota, como el succinato, podrían actuar en la señalización inmunitaria innata y la resistencia a la insulina. Así, en los macrófagos activados por LPS, el succinato estabilizó la subunidad alfa del factor 1 inducible por hipoxia (HIF1 α), que aumentó la producción de IL-1 β y la inflamación.

Por lo tanto, el succinato podría contribuir a la resistencia a la insulina inducida por la inflamación [184]. Acordemente, un estudio observó mayores niveles de succinato en la obesidad inducida por una dieta alta en grasas, los cuales se atenuaron junto con la inflamación con el consumo de una dieta rica en fibra [185]. Sin embargo, en otros estudios con ratones el succinato pareció mostrar un efecto beneficioso, mejoró la sensibilidad a la insulina y la tolerancia a la glucosa mediante termogénesis dependiente de la proteína de desacoplamiento 1 (UCP1) en el tejido adiposo marrón [186]. No obstante, los resultados de los estudios sobre el impacto de la microbiota intestinal en la regulación de este mecanismo aun no son consistentes, además sus efectos en procesos humanos comparables se desconoce [117].

El propionato de imidazol es otro compuesto microbiano el cual se ha sugerido que podría inhibir la señalización de la insulina. Las concentraciones de este compuesto en la circulación sanguínea portal y periférica de individuos con DMT2 son más altas que en los individuos sanos [187]. Además, se evidenció que especies bacterianas intestinales como *Streptococcus mutans* y *Eggerthella lenta*, las cuales se han encontrado incrementadas en pacientes con DMT2 [148, 149], son productoras de propionato de imidazol. En experimentos realizados con ratones, el propionato de imidazol empeoró la tolerancia a la glucosa y la señalización de la insulina a través de la activación la ruta de señalización del complejo mecanístico de la rapamicina 1 (mTORC1). En consonancia con estos resultados, se ha reportado también la sobreexpresión de esta vía de señalización en el tejido hepático aislado de individuos con DMT2 [187].

3.3.2 Asociación de la microbiota intestinal con los niveles plasmáticos de BCAAs y resistencia a la insulina

Concentraciones circulantes elevadas de BCAAs (leucina, isoleucina y valina) están fuertemente asociadas con la resistencia a la insulina y un mayor riesgo de DMT2 [188]. El metaboloma sérico de los individuos con resistencia a la insulina, que se caracteriza por el aumento de los niveles de BCAAs, se correlacionó con una microbiota intestinal que tiene un mayor potencial biosintético para los BCAAs y reducida captación microbiana de BCAAs, evidenciada por un menor número de genes que codifican los transportadores bacterianos de estos aminoácidos. *Prevotella copri* y *Bacteroides vulgatus* se han sugerido como las principales especies productoras de BCAAs que impulsan la asociación entre la biosíntesis de los BCAAs y la resistencia a la insulina.

Además, se demostró que la administración *P. copri* es capaz de inducir en ratones alimentados con una dieta alta en grasa una mayor resistencia a la insulina, agravando la intolerancia a la glucosa y una mayor elevación los niveles circulantes de BCAAs. Por otro lado, *Butyrivibrio crossotus* y *Eubacterium siraeum* se asociaron con el menor transporte bacteriano de aminoácidos [189]. Estos hallazgos, sugieren que el microbioma intestinal puede contribuir al aumento de las concentraciones plasmáticas de BCAAs y a la resistencia a la insulina en condiciones de consumo de una dieta poco saludable [117] (**Figura 12**). El mecanismo por el cual los BCAAs pueden inducir resistencia a la insulina es complejo, varios mecanismos han sido propuestos, por lo que se trata de un área de investigación actual no elucidada completamente aún [132, 190]. Además, en la insuficiencia cardíaca, el catabolismo de los BCAAs está alterado y la acumulación de estos compuestos induce el estrés oxidativo y alteran la función mitocondrial [191].

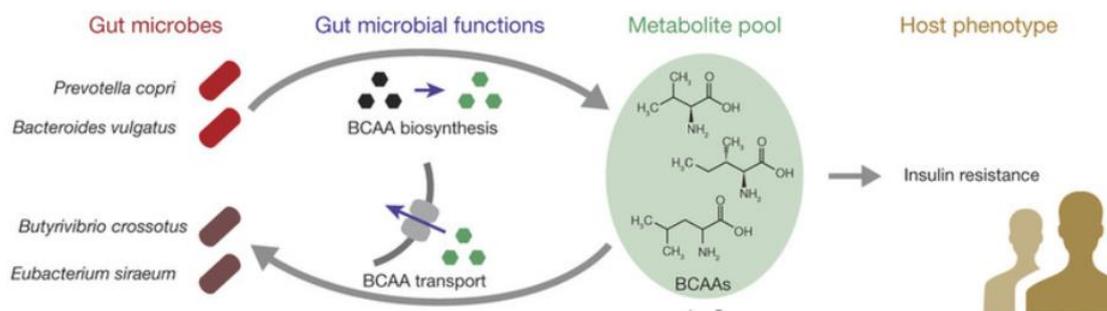


Figura 12. Esquema del papel de la microbiota intestinal como contribuyente a los niveles de BCAAs en suero y a la resistencia a la insulina. Modificado de Pedersen et al [189].

3.3.3 Ácidos grasos de cadena corta en el metabolismo del huésped y regulación de la inflamación

Los ácidos grasos de cadena corta, nombrados comúnmente por sus siglas en inglés SCFAs (short chain fatty acids), son producidos especialmente por fermentación bacteriana de carbohidratos complejos que forman parte de la fibra dietética no digerible en el intestino grueso. Principalmente comprende acetato, propionato y butirato, que representan más del 95%. [118, 192]. Estos son principalmente producidos en el colon proximal donde la disponibilidad de sustratos es mayor, mientras que las concentraciones son menores en el colon distal [132]. El ratio molar de producción en el colon de acetato, propionato y butirato es 60:20:20 respectivamente [192]. No obstante, los patrones de

fermentación intestinal y, en consecuencia, los tipos y la cantidad de SCFAs producidos, están determinados por la cantidad de carbohidratos consumidos, la composición de la microbiota intestinal, el tiempo de tránsito intestinal y el genotipo del huésped [192, 193].

Estos compuestos pueden ser absorbidos en el intestino por difusión no-iónica pasiva, en intercambio 1:1 con bicarbonato o mediante transporte activo mediado por dos receptores principales: el transportador de monocarboxilato 1 (MCT-1) y el transportador de monocarboxilato acoplado al sodio 1 (SMCT-1) [193]. Tanto MCT-1 y SMCT-1 se expresan en gran medida en los colonocitos y en todo el tracto gastrointestinal [132]. La absorción es bastante eficaz, ya que solo un 5-10% de estos productos son excretados en las heces [117]. En los estudios en humanos, en los que se ha medido la dinámica de los SCFAs, el acetato alcanza las mayores concentraciones periféricas en comparación con el propionato y el butirato, ya estos dos son metabolizados en gran medida en el colon y el hígado [192].

La producción de SCFAs comprende ruta interconectadas, complejas y dinámicas [193], de manera que la producción implica un “cross-feeding” entre bacterias, es decir, los productos producidos por algunas de las bacterias son usados como sustratos por otras [194] (**Figura 13**). El acetato se produce a partir del piruvato a través del acetyl-CoA y también a través de la vía de Wood-Ljungdahl. Por otro lado, el butirato se sintetiza a partir de dos moléculas de acetyl-CoA, dando lugar a acetoacetyl-CoA, que se convierte en butyryl-CoA a través de β -hidroxybutyryl-CoA y crotonyl-CoA. Por último, el propionato puede formarse a partir de fosfoenolpiruvato a través de la vía del succinato, o de la vía del acrilato en la que el lactato se reduce a propionato. Además, las bacterias también pueden producir propionato a través de la vía del propanediol a partir de desoxihexosas, como la fucosa y ramnosa [187]. La producción de acetato puede llevarse a cabo entre un amplio grupo de bacterias, mientras que las vías de producción de propionato y butirato están más altamente conservadas. La producción de propionato está dominada por relativamente pocos géneros bacterianos, entre ellos *A. muciniphila*. En cuanto al butirato, la mayor parte de su producción procede de *Faecalibacterium prausnitzii*, *Eubacterium rectale*, *Eubacterium hallii* y *Roseburia bromii* [194]. Además, aunque la fermentación de aminoácidos produce principalmente BCAAs, aminos, fenoles, indoles, tioles, etc. los cuales podrían tener consecuencias negativas sobre las células epiteliales y la función de

barrera intestinal, también puede contribuir en pequeña cantidad a la producción de SCFAs, principalmente acetato y propionato [192].

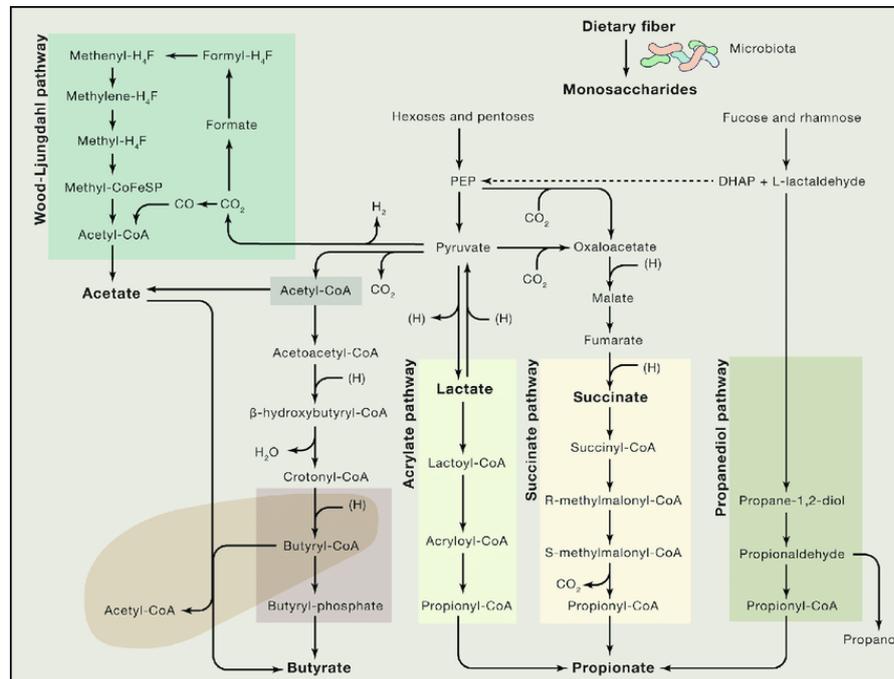


Figura 12. Rutas conocidas para la biosíntesis de SCFAs a partir de la fermentación de carbohidratos y su interconexión. Modificado de Koh et al [187].

Los SCFAs actúan como fuente de energía para las células epiteliales del colón, función atribuida especialmente al butirato, constituyendo un 5-10% de las necesidades energéticas diarias de una persona con un consumo de fibra dietética moderado [117, 122]. Aunque también es importante para la proliferación y diferenciación de estas células [132]. Por otro lado, estos compuestos actúan como sustrato en rutas anabólicas, así el acetato puede ser usado como colesterol o precursor de ácidos grasos en la lipogénesis y el propionato como sustrato en la gluconeogénesis [132, 192].

Además, se ha descrito que estos compuestos tienen efectos beneficiosos en el huésped y mejoran el metabolismo [192]. Por ejemplo, se evidenció que la suplementación en ratones con SCFAs, mejoró la sensibilidad a la insulina y la dislipemia [195]. Actualmente, se conoce que los SCFAs actúan como moléculas señal [118]. Uno de los mecanismos por el cual influyen en el metabolismo es a través de la unión con receptores acoplados a la proteína G (GPCRs), concretamente se unen a los receptores GPR-41 Y GPR-43 (también conocidos como FFA2 Y FFA3) [122, 196] cuyas vías de señalización están implicadas en varios procesos de regulación enteroendocrina,

metabólica e inmunitaria, como la secreción de GLP-1, la regulación de la respuesta inflamatoria, la captación de glucosa, oxidación de ácidos grasos y el metabolismo energético [118, 192]. El GPR-41 es activado principalmente por el propionato, seguido por el butirato y el acetato, mientras que el GPR-43 es activado por los tres SCFA en una proporción similar [192]. Además, los SCFAs también tienen impacto en el huésped modulando la expresión génica al inhibir las histonas desacetilasas (HDAC) [123, 142].

El descubrimiento de receptores de SCFAs, no solo en células del intestino, sino en muchos tejidos diferentes pone de manifiesto que los SCFAs están implicados en la interrelación entre el intestino y los tejidos periféricos [193]. Estos pasan a la circulación sistémica y afectan directamente al metabolismo y a la función de los tejidos periféricos [142]. En efecto, cada vez hay más pruebas que apoyan el papel beneficioso de los SCFAs en el metabolismo y en la función del tejido adiposo, el músculo esquelético y el hígado, contribuyendo así a mejorar la sensibilidad a la insulina [192, 197] (**Figura 13**).

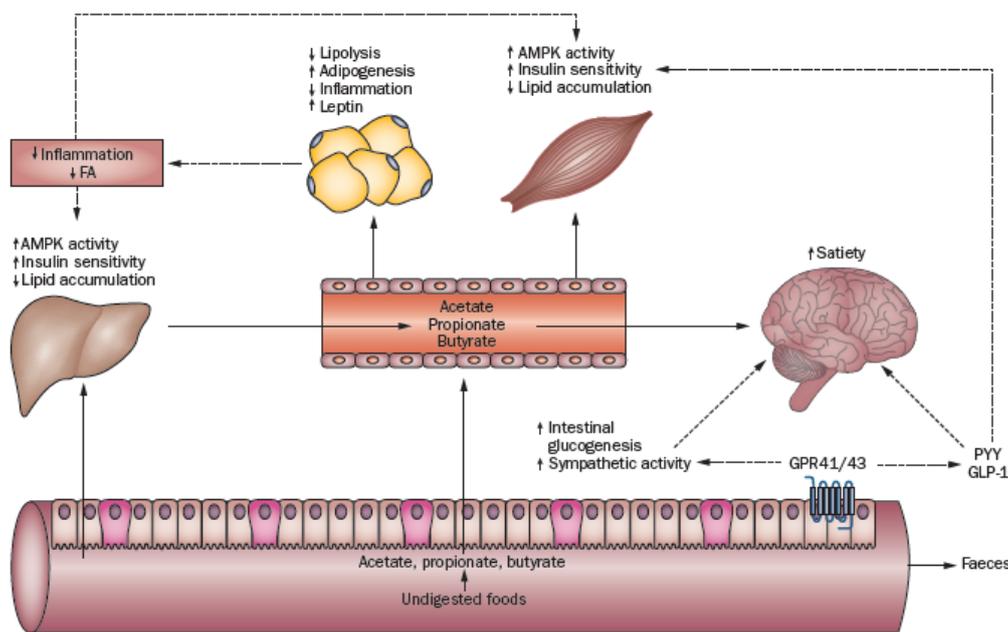


Figura 13. Resumen de los principales efectos de los SCFAs en el metabolismo y sus posibles mecanismos de acción en tejidos periféricos. Modificado de Canfora et al [192].

- *Papel de los SCFAs en la regulación de la saciedad y la ingesta calórica*

Los SCFAs regulan el apetito contribuyendo a un efecto anti-obesigénico, pues al unirse a los receptores GPR-41 Y GPR-43 de la células enteroendocrinas L, reducen la ingesta de alimentos y promueven la saciedad a través de la estimulación de hormonas

anorexigénicas, como GLP-1 y el péptido YY [196, 198]. Se ha observado que la administración oral de butirato previno en ratones la obesidad, la esteatosis hepática y la resistencia a la insulina reduciendo la ingesta de alimentos, lo que se acompañó principalmente de una supresión de la actividad de las neuronas orexigénicas [199]. También la administración en humanos de acetato mediante vía intravenosa o rectal en sujetos con resistencia a la insulina incrementó la producción de GLP-1 y el péptido YY, lo que redujo el aumento de peso [200].

En este contexto, se ha sugerido que el acetato puede cruzar la barrera hematoencefálica y llegar al hipotálamo, tanto en ratones como en humanos [201, 202], afectando a la regulación central del apetito, donde el acetato aumenta el ciclo glutamato-glutamina y la síntesis de GABA, que suprime el apetito y la ingesta de alimentos [202]. Por otro lado, la administración de propionato directamente en el colon en un ensayo controlado en individuos humanos con sobrepeso redujo el aumento de peso y la grasa visceral, provocando un aumento agudo de la liberación del péptido YY y GLP-1 junto con una reducción de la ingesta calórica [203]. Además, se observó que a largo plazo dicha administración disminuyó significativamente el contenido de lípidos en el hígado [203]. Inclusive, se ha evidenciado que los SCFAs son capaces de inducir la expresión de leptina en adipocitos humanos, contribuyendo al efecto de saciedad [121, 123].

- *Papel de los SCFAs en la mejora de la producción de insulina*

La inducción de la secreción de la incretina GLP-1 por lo SCFAs en las células L también produce efectos en el metabolismo [204]. Pues a su vez, GLP-1 además de aumentar la saciedad, promueve la secreción de insulina y la proliferación de las células β , describiéndose una relación inversa de los niveles de esta incretina con el área bajo la curva (AUC) de los niveles postprandiales de glucosa [205].

- *Papel de los SCFAs en el gasto energético*

Adicionalmente, se ha propuesto que estos productos pueden incrementar la oxidación de ácidos grasos y el gasto energético en humanos, reduciendo la ganancia de peso. Los SCFAs incrementan estos procesos activando AMPK, con el subsiguiente aumento de la expresión de los genes diana de PPAR implicados en la oxidación de los lípidos [132, 197]. De hecho, este procedimiento se ha mostrado que es especialmente llevado a cabo por el butirato en el intestino para instruir a las células del colon el

consumo de oxígeno mediante activación de la β -oxidación. Este fenómeno contribuye al mantenimiento de las condiciones anaeróbicas en el intestino y protege frente a la expansión de bacterias potencialmente patógenas [206].

No obstante, este efecto de los SCFAs también se ha evidenciado en tejidos metabólicos periféricos. En el hígado, un estudio en ratones con obesidad inducida con una dieta alta en grasas ha revelado que la administración de SCFAs inducen un cambio de la lipogénesis hepática a la β -oxidación hepática y potencia la función mitocondrial, disminuyendo así la esteatosis hepática y aumentando el gasto energético, lo cual se asoció con una mejora de la resistencia a la insulina y la tolerancia a la glucosa [207]. Además, en este estudio se mostró que la activación de la vía UCP2-AMPK-ACC parece ser necesaria para estos efectos beneficiosos de estos compuestos en el metabolismo hepático [207]. También se ha hallado que los SCFAs aumentan la oxidación de los lípidos en el tejido adiposo a través de la activación de la vía UCP2-AMPK-ACC dependiente de PPAR [197]. Esto tiene especial relevancia pues la resistencia a la insulina se ha asociado con una perturbación de la oxidación mitocondrial de los ácidos grasos, lo que lleva a una oxidación incompleta y a su acumulación excesiva en el tejido adiposo y, esta a su vez, a la deposición ectópica de lípidos en el hígado y el músculo esquelético [56].

- *Papel de los SCFAs en el pardeamiento y adipogénesis del tejido adiposo*

Además, la administración de acetato y propionato ha mostrado reducir los niveles de AGLs en personas sanas, lo cual se asoció en un estudio *in vitro* con una reducción de la actividad lipolítica de los adipocitos cultivados con estos compuestos de manera dependiente de GPR-43 [192, 197]. También otros estudios sugieren que el butirato y acetato provocan el pardeamiento del tejido adiposo blanco, con una disminución del tamaño de los adipocitos y aumento del número de células multiloculares [142, 208]. El pardeamiento del tejido adiposo blanco ha sido demostrado que tiene efectos anti-obesogénicos y anti-diabéticos [197]. En relación con estos datos, se ha descubierto que los SCFAs inducen la diferenciación de los adipocitos en las células 3T3-L1 preadipocitarias y, esta diferenciación inducida por estas sustancias se produce junto con un aumento de la expresión de GPR-43 [142, 192]. La diferenciación de los adipocitos está implicada en la mejora de la sensibilidad a la insulina y su alteración con la resistencia a la insulina [209]. Por lo tanto, las propiedades de promoción adipogénica de estos

compuestos pueden desempeñar un papel relevante en sus conocidos efectos beneficiosos mejorando la sensibilización a la insulina.

- *Papel de los SCFAs en la regulación del sistema inmunitario*

Los SCFAs no solo tienen efecto metabólicos, sino también tienen efectos anti-inflamatorios (**Figura 14**). Se ha demostrado tanto en ratones como en experimentos ex vivo que estos productos bacterianos mejoran la función de la barrera intestinal incrementando la transcripción de genes que codifican mucinas [118], por ende, aumentando su producción, y la expresión de proteínas de las uniones TJ [132]. La mejora de la función de la barrera intestinal evita la exposición del sistema inmunitario innato del huésped a componentes bacterianos, reduciendo potencialmente la inflamación [210]. De todos los SCFAs, el butirato parece ser el regulador más importante de las proteínas de las uniones TJ. Se ha demostrado que mejora la función de la barrera intestinal aumentando la expresión de claudina-1, zónula occludens-1 (ZO-1) y ocludina, proteínas claves de dichas uniones [211]. Además, se ha mostrado que el butirato revierte la expresión alterada de ZO-1 y reduce la translocación de LPS, causando la inhibición de la activación de macrófagos, la producción de citoquinas y la infiltración de células inmunes, resultando además en una reducción del daño hepático en ratones [212], dado que el hígado es la primera diana del LPS [213]. Aún son necesarios estudios en humanos, que confirmen su relevancia.

Además, se ha evidenciado que los SCFAs se unen al GPR-43 expresado por las células T reguladoras y estimulan su expansión y sus propiedades inmunosupresoras, como la producción de IL-10, controlando así las respuestas proinflamatorias [214, 215].

Inclusive, el propionato y el butirato han demostrado tener propiedades antiinflamatorias al disminuir la actividad de NF- κ B vía inhibición de HDAC en células mononucleares de sangre [216], disminuyendo la producción de citoquinas, como la producción de TNF α inducida por LPS en monocitos [123, 193]. Adicionalmente, la actividad inhibitoria de HDAC por parte del butirato se ha asociado directamente con una reducción en la inflamación del tejido adiposo, un factor que como se expuso en un apartado anterior, contribuye al desarrollo de la resistencia a la insulina durante la obesidad [142].

Además, los receptores GPR-43 también se expresan en monocitos, neutrófilos y células dendríticas [193]. De esta forma, los SCFAs parecen tener un papel importante en funciones antiinflamatorias, pues se ha mostrado que estos compuestos inhiben la migración de estas células de manera dependiente de GPR-43 y reducen la liberación de citoquinas y de otros de mediadores proinflamatorios, como $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ y óxido nítrico a través de la reducción la actividad de $\text{NF-}\kappa\beta$ [123]. La supresión de la actividad de $\text{NF-}\kappa\beta$ fue mostrada por los tres principales SCFAs, siendo el orden de potencia butirato>propionato>acetato [193]. Además, se ha evidenciado que el butirato promueve la polarización de los macrófagos a M2 y estimula la función de dicho fenotipo en el tejido adiposo [217]. Inclusive, el butirato previene también de la producción de citoquinas por las células Kupffer inhibiendo $\text{NF-}\kappa\beta$, aminorando la inflamación en el hígado [142]. Por lo tanto, la disminución de SCFAs podría contribuir al aumento de la inflamación subclínica que a menudo se encuentra en pacientes con obesidad y diabetes.

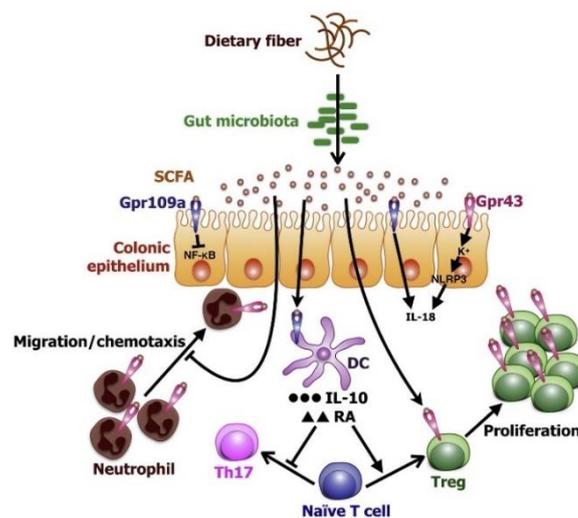


Figura 14. Representación gráfica esquematizada de la regulación de la homeostasis intestinal por los SCFAs. Modificado de Sivaprakasam et al [218].

Aunque la evidencia mostrada hasta el momento sugiere un potencial efecto beneficioso de los SCFAs en la DMT2, la mayoría de los datos proceden de estudios en animales e in vitro, por lo que la relevancia clínica y el impacto metabólico en los seres humanos aún no se han demostrado [192]. Se necesitan estudios de intervención a largo plazo en humanos bien controlados para aclarar el papel de los SCFAs en el control del peso corporal y la mejora del metabolismo de la glucosa [142, 192].

3.3.4 Efectos de la interacción entre microbiota intestinal y ácidos biliares en el metabolismo

Los ácidos biliares son secretados por la vesícula la biliar en el duodeno después de la ingesta de comida, donde actúan como surfactantes para facilitar la absorción de grasas y vitaminas liposolubles [219]. Entre el 90 y el 95% de los ácidos biliares son reabsorbidos eficazmente por transporte activo en el íleo y mediante absorción pasiva en el colon, siendo devueltos al hígado a través de la circulación portal hepática, donde se conjugan predominantemente con taurina y glicina para formar sales biliares. Los ácidos biliares completan dicho ciclo enterohepático entre el intestino y el hígado unas ocho veces al día [220]. Durante su paso por el intestino los ácidos biliares se biotransforman por las bacterias intestinales y, aproximadamente entre el 5 y el 10% se excreta en las heces [121].

Además de su función digestiva, los ácidos biliares desempeñan un papel fundamental en la salud humana y desarrollo de enfermedades metabólicas, principalmente por su papel como moléculas de señalización [117, 219]. Los ácidos biliares pueden unirse y activar receptores, como FXR o el receptor acoplado a proteína G TGR5 en el intestino, así como en órganos y tejidos metabólicos periféricos como en el hígado, el tejido adiposo o el páncreas, regulando el metabolismo de la glucosa y lípidos [219, 221] (**Figura 15**).

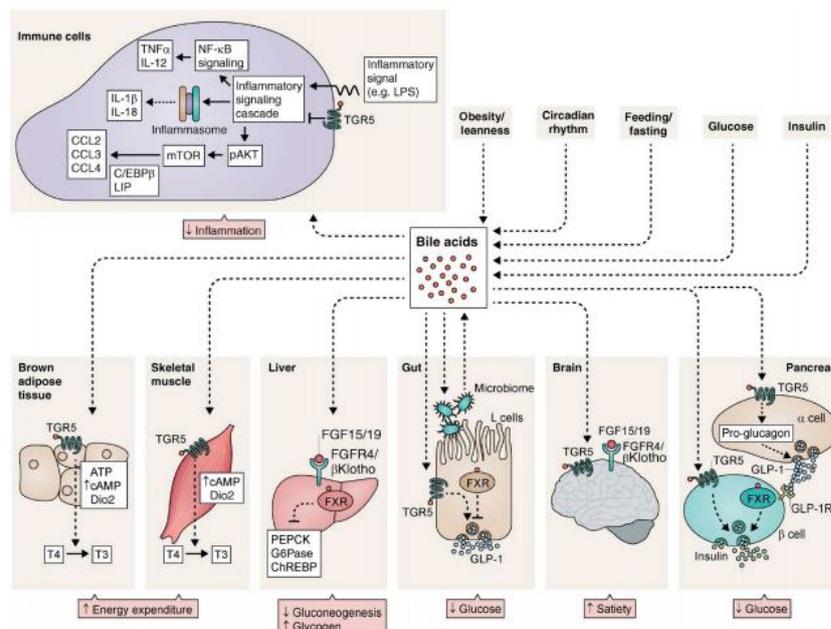


Figura 15. Representación esquematizada de los efectos de la señalización de los ácidos biliares regulando la respuesta glucémica sistémica. Modificado de Shapiro et al [222].

- *Modulación del conjunto de ácidos biliares por la microbiota intestinal*

Los ácidos biliares primarios, principalmente ácido cólico, quenodesoxicólico y sus conjugados, se producen a partir del colesterol en el hígado. Una vez secretados al intestino estos pueden ser modificados por la microbiota intestinal, donde los ácidos biliares primarios son metabolizados a ácidos biliares secundarios, a través de $7\alpha/\beta$ -deshidroxilación, como el ácido desoxicólico o litocólico [118, 219]. Las reacciones necesarias para esta metabolización se llevan a cabo principalmente por las bacterias *Clostridium*, *Eubacterium* y *Bacteroides* [121]. Así como también ciertas bacterias pueden realizar la desconjugación de ácidos biliares, mediante enzimas hidrolasas de sales biliares identificadas en géneros anaeróbicos como *Clostridium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Bacteroides* [219]. Una parte menor de la biotransformación de los ácidos biliares también puede ser llevada a cabo por varios grupos de bacterias aeróbicas, como las actinobacterias y las proteobacterias [121]. De esta forma, las bacterias modulan la composición del conjunto de ácidos biliares y aumentan la diversidad del conjunto. De hecho, los ratones libres de microorganismos o tratados con antibióticos tienen una diversidad más reducida de ácidos biliares [123]. Por tanto, la composición de la microbiota intestinal puede afectar a la fisiología del huésped, puesto que, a través de la modulación del conjunto de ácidos biliares, condiciona las señales inducidas por los mismos [219].

- *Implicación de los ácidos biliares en el metabolismo glucídico*

Los ácidos biliares primarios son ligandos preferentes de FXR, mientras que los ácidos biliares secundarios son ligandos preferentes de TGR5 [117, 219]. La activación de TGR5 estimula el llenado de la vesícula biliar, modula el gasto energético, reprime la glucogenólisis hepática, reduce la inflamación y la activación de los macrófagos [223]. Además, la activación de TGR5 en las células L del intestino por los ácidos biliares secundarios estimula la secreción de GLP-1, el cual a su vez estimula la secreción de insulina, siendo uno de los efectos antidiabéticos más destacados mediado por los ácidos biliares [117, 224]. En consonancia, los ratones knockout en TGR5, presentaron una reducción del conjunto de ácidos biliares, una alteración de la tolerancia a la glucosa y respuestas inflamatorias exacerbada [223].

La activación de FXR en el intestino induce la expresión del factor de crecimiento de fibroblastos 19 (FGF19), este junto con los ácidos biliares reabsorbidos en la circulación entero-hepática producen la activación de FXR en el hígado, lo cual reduce la expresión de la enzima CYP7A, limitante de la ruta de síntesis de ácidos biliares, inhibiendo pues, la síntesis de los mismos [219]. Así, a través de este bucle de retroalimentación intestino-microbiota-hígado se consigue controlar los niveles de ácidos biliares [123]. Además, FGF19 tienen efectos metabólicos en el hígado y tejido adiposo. Se ha demostrado que estimula la síntesis de glucógeno hepático, disminuye la gluconeogénesis y aumenta la glucólisis, lo que conduce a una mejora de la tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina [223]. En el tejido adiposo, el FGF19 aumenta el gasto energético y la sensibilidad a la insulina y, en consecuencia, reduce el peso corporal y los niveles de glucosa circulante. Además, en el cerebro, el FGF19 disminuye la actividad de la proteína r-Agouti y del neuropéptido Y, mejorando también la homeostasis glucémica [225].

No obstante, la señalización de FXR es compleja puesto que podría desencadenar diferentes acciones en distintos tejidos y tipo celulares, por lo que existe controversia en los resultados de los diversos estudios [219]. Así la inducción de FGF19 a través de FXR en el hígado parece inducir efectos metabólicos beneficiosos [225], mientras que la activación de FXR en el intestino [226], como por ejemplo la activación de FXR en las células L, parece ser perjudicial al inhibir la secreción de GLP-1 [227, 228]. También se observó que la supresión específica de la señal intestinal de FXR con ácidos biliares antagonistas para este receptor (p. ej. Ácido gluco- β -tauro-muricólico), resultó en una disminución de los niveles de ceramidas y, por lo tanto, redujo la gluconeogénesis hepática en ratones, efecto que podría contribuir a disminuir la glucemia [229]. Además, la activación de FXR con agonistas ha mostrado tener efectos perjudiciales, disminuyó el gasto energético, así como indujo obesidad y resistencia a la insulina [230]. En cambio, recientemente, otro estudio descubrió que la activación específica del FXR intestinal por agonistas modulaba la microbiota intestinal para activar la señalización TGR5/GLP-1 y mejorar la sensibilidad hepática a la glucosa y la insulina. Por lo cual, la microbiota intestinal desempeña un papel fundamental en el metabolismo de los ácidos biliares y su señalización para regular la homeostasis metabólica en la salud y la enfermedad [224].

- *Cambios en la cantidad y composición de los ácidos biliares asociados con la DMT2 y su remisión*

En relación con una posible alteración de los ácidos biliares en la diabetes, se ha reportado un aumento de los niveles circulantes de ácidos biliares en sujetos obesos con DMT2, los cuales se correlacionan con el IMC [118]. Específicamente, la resistencia a la insulina se ha asociado con un aumento de ácidos biliares 12- α -hidroxilados [231]. No obstante, los niveles circulantes tanto de ácidos biliares primarios como secundarios en ayunas y estado postprandial aumentan después de la cirugía bariátrica y se han correlacionado negativamente con los niveles postprandiales de glucosa. Así como también, se ha observado una correlación positiva de estos con la reducción de peso y con la máxima secreción de GLP-1 [118, 232]. Además, en concordancia con el posible papel perjudicial previamente reportado de los ácidos biliares 12- α -hidroxilados, se observó un mayor aumento de los niveles en ayunas de ácidos biliares no 12- α -hidroxilados en aquellos pacientes que regresaron, en comparación con aquellos que no regresaron después de la cirugía bariátrica [233]. Esto concuerda con el hecho de que en un estudio se observó que la delección en ratones de la enzima CYP8b, necesaria para la síntesis del ácido cólico, el cual es el ácido biliar primario 12- α -hidroxilado del cual derivan el resto de los ácidos biliares 12- α -hidroxilados, protegía frente al aumento peso corporal, la esteatosis hepática y la resistencia a la insulina inducidos por la dieta occidental [234]. Más, estudios son necesarios para elucidar los mecanismos específicos inducidos por este tipo de ácidos biliares.

El aumento del total de ácidos biliares también se ha visto acompañado de aumento de FGF19, el cual es inducido por el receptor FXR, en aquellos pacientes que regresaron de diabetes en comparación con aquellos que no regresaron después de la cirugía bariátrica [235]. En concordancia, el metabolismo de los ratones *knockout* sin FXR no mejora tras la cirugía VSG [115]. No obstante, del mismo modo, la función de TGR5 en los efectos metabólicos de la cirugía bariátrica está respaldada por hallazgos que muestran que la deficiencia de TGR5 puede reducir los efectos beneficiosos de la VSG [236]. Esto sugiere que la señalización desencadenada por los ácidos biliares podría ser uno de los mecanismos subyacentes implicados en el desarrollo o reversibilidad de la diabetes [223]. Además, el papel de los ácidos biliares en el metabolismo de la glucosa también se apoya

por los estudios realizados con secuestradores de ácidos biliares, que han mostrado tener un efecto hipoglucemiante en pacientes con DMT2 [237].

A pesar de las evidencias anteriores, no está claro el papel de los ácidos biliares como mecanismo en la regresión de la diabetes, pues, por el contrario, otro estudio encontró que los ácidos biliares circulantes y el FGF19 no se modificaron en pacientes con DMT2, mientras que la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina mejoraron significativamente en las primeras etapas después de la cirugía bariátrica [238]. Además, otro estudio prospectivo examinó los niveles de ácidos biliares mostrando que los ácidos biliares circulantes disminuían a la semana de la cirugía, aumentaban a los 3 meses de la cirugía y, aumentaban significativamente un año después de la cirugía. Sin embargo, el aumento sustancial del péptido YY y GLP-1, así como un mejor control metabólico se observó a partir de la primera semana de la operación, y fue mantenido [239]. Este hallazgo sugiere que el aumento de los ácidos biliares en plasma podría no contribuir al menos a las rápidas mejoras metabólicas observadas después de la cirugía, sino más bien al contrario, su disminución [232]. Por tanto, la contribución de los cambios de los ácidos biliares y las vías de señalización relacionadas con los efectos metabólicos de la cirugía bariátrica aún no se ha dilucidado por completo, quedando por demostrar cómo se modula la señalización del FXR intestinal en los seres humanos tras la cirugía bariátrica [219].

En particular, varios estudios apuntan hacia un papel beneficioso de ciertos ácidos biliares secundarios en el metabolismo. La administración rectal del ácido biliar secundario taurodesoxicólico mejoró la homeostasis de la glucosa y redujo la ingesta de alimentos, incrementando la secreción de GLP-1, el péptido YY y la insulina en sujetos obesos con diabetes [240]. Por su parte, el ácido litocólico, estimula el gasto energético mediante el pardeamiento del tejido adiposo blanco y la activación de la termogénesis en el tejido adiposo pardo [117]. También se ha evidenciado que una intervención en sujetos no diabéticos mediante administración oral del ácido tauroursodesoxicólico, mejora la sensibilidad a la insulina en el hígado y el músculo [223]. En concordancia, experimentos en modelos animales, han mostrado la capacidad de este ácido biliar de disminuir el estrés del RE, mejorando la producción de insulina en respuesta a la glucosa [223, 241].

Además, recientemente se ha demostrado que los ácidos biliares actúan como nexo en la interacción del huésped y los microorganismos, sugiriéndose que tiene un papel

fundamental en la conformación de las respuestas inmunitarias intestinales del huésped [123]. De hecho, recientemente, dos derivados del ácido biliar secundario litocólico han mostrado incrementar la diferenciación de las células T reguladoras en ratones [242].

- *Interacción recíproca entre ácidos biliares y microbiota intestinal*

La administración de ácidos biliares ha evidenciado modular la composición de la microbiota intestinal [243]. Además, los efectos metabólicos beneficiosos observados tras cirugía bariátrica se han asociado con cambios tanto en los niveles de ácidos biliares como en la composición de la microbiota intestinal [219]. Dada la interacción recíproca entre ambos y, puesto que los cambios en la microbiota y los ácidos biliares pueden afectar al metabolismo, la interacción entre la microbiota intestinal y los ácidos biliares podría ser clave en enfermedades metabólicas como la DMT2. Por ello, se ha propuesto la interacción de ambos como uno de los mecanismos subyacentes que median la mejora los niveles de glucosa tras cirugía bariátrica [118, 232]. De manera que apoyando este hecho un estudio mostró que la abundancia relativa de ciertas bacterias, como *Bacteroides* y *Roseburia*, se alteró significativamente en los ratones después de la cirugía de tipo VSG en comparación con el efecto de la cirugía simulada. En cambio, la abundancia de estas bacterias no varió después de la cirugía en los ratones FXR *knockout*, que no mejoraron tras la VSG, no mostraron pérdida de peso ni mejora de la tolerancia a la glucosa [115]. Además, varios estudios han relacionado los beneficios metabólicos de los tratamientos hipoglucemiantes para la diabetes, como metformina o acarbosa con una disminución de *Bacteroides fragilis* junto con cambios en los ácidos biliares [153, 244], como un aumento del ácido glucoursodesoxicólico acompañado de una disminución de la señalización de FXR [244]. De hecho, se ha observado que aquellos pacientes con mayor abundancia de esta bacteria al inicio, respondieron presentando más cambios de los ácidos biliares en plasma y mayor mejora en los parámetros metabólicos después del tratamiento con acarbosa [153]. En concordancia, en otro trabajo los ratones que fueron alimentados con una dieta alta en grasas, la cual favoreció una mayor colonización de *B. fragilis* después de la intervención, presentaron una intolerancia a la glucosa más severa, y el efecto beneficioso metabólico de la metformina se mostró atenuado [244].

Sin embargo, la mayoría de los estudios sobre el efecto de los ácidos biliares en el metabolismo se han realizado en modelos animales. La composición de ácidos biliares en

humanos es diferente a la de ratones, por lo que las conclusiones derivadas de los estudios en roedores deben interpretarse con precaución [118].

3.4 La interacción entre dieta y microbiota como aproximación en enfermedades metabólicas

La dieta está relacionada con afecciones metabólicas crónicas como obesidad, DMT2 y ECV [245]. Los nutrientes de la dieta son usados también para el crecimiento y los propios procesos biológicos de la microbiota intestinal, pudiendo tener los metabolitos resultantes de su fermentación impactos en la fisiología humana, tal como se ha explicado anteriormente, así como efectos inmunomodulares. De esta forma, estos tres componentes dieta, microbiota intestinal y huésped están interconectados [246]. Como se ha mencionado anteriormente, la composición de la microbiota intestinal y, por ende, la funcionalidad de la misma es modulada por la dieta consumida por el huésped [118]. De manera que la dieta representa un factor mediante el cual se puede remodelar la composición de la microbiota y la producción de metabolitos derivados de la microbiota intestinal para mejorar la salud humana [246].

3.4.1 Dieta como modulador de la microbiota intestinal

Se ha observado que la microbiota responde rápidamente a cambios en los patrones dietético, como cambios en el consumo de fibra o vegetales, cambiando su composición en 1-2 días [247]. Probablemente, como consecuencia de una comunidad microbiana compleja y competitiva que se renueva rápidamente en función de la disponibilidad de nutrientes, lo cual favorece el crecimiento de las bacterias que más eficientemente extraen energía de componentes dietéticos específicos de la dieta, frente a los miembros menos hábiles [246]. Sin embargo, estos cambios a corto plazo son sutiles dentro de la composición global, ya que se demostró que un enterotipo, o agrupación de taxones microbianos intestinales, es menos susceptible de ser modificado a corto plazo y está asociado a la dieta habitual a largo plazo [248]. En concordancia, los hábitos dietéticos a largo plazo son un factor dominante en la determinación de la composición de la microbiota intestinal de un individuo [249].

En concreto, se ha sugerido que la alimentación que caracteriza a los países occidentales, definida por una dieta reducida en fibra junto con un excesivo consumo de grasas saturadas y azúcares sencillos afectaría negativamente a la microbiota, lo que

podría ser de considerable importancia para entender las enfermedades metabólicas [118]. De hecho, la microbiota intestinal de poblaciones rurales agrarias o de cazadores-recolectores nómadas de varias partes del mundo, con un mayor consumo de frutas y vegetales, mostraron una mayor diversidad bacteriana en comparación con la de las poblaciones urbanas occidentales, caracterizada por el consumo de los alimentos procesados y la dieta típica occidental [250-253]. Los taxones microbianos que están ausentes en el intestino occidental, se encuentran presentes en muchas poblaciones rurales o agricultoras alejadas geográficamente, lo que sugiere una fuerte asociación con la dieta y el estilo de vida [249]. De acuerdo con esto, se observó un mayor enriquecimiento de genes asociados con el metabolismo de carbohidratos complejos en el microbioma de poblaciones de agricultores [254]. Además, en estas poblaciones, coherentemente, la alta diversidad de la microbiota también se correspondió con los altos niveles de producción de ácidos grasos de cadena corta, los cuales son producidos a través de los carbohidratos complejos no digeridos [251, 252, 255]. Inclusive, respaldando la asociación entre la diversidad microbiana intestinal y el consumo de fibra, se encontró que la falta de ingesta de fibra en ratones colonizados con una microbiota humana conducía a una diversidad microbiana drásticamente reducida en sólo tres generaciones, que no podía recuperarse cuando los ratones eran trasladados a una dieta normal [256].

También se observó en la microbiota de las poblaciones rurales un incremento significativo de *Prevotella* [252], mientras que en las zonas urbanas se ha observado niveles bajos de *Bifidobacterium* [251], ambas con actividad sacarolítica (permite la fermentación de carbohidratos). Acordemente con esto último, se ha observado que el consumo a largo plazo de patrones dietéticos con una alta ingesta de proteínas y grasas de origen animal se asocia con la preponderancia de *Bacteroides*. Así pues, el ratio *Bacteroides/Prevotella* es mayor con dietas ricas en proteínas y grasas frente a una dieta rica en fibra y alimentos de origen vegetal, la cual se asocia con una disminución de dicho ratio [248]. Estas diferencias en el ratio también se observaron entre poblaciones industrializadas y no industrializadas [252]. Los niños africanos de áreas rurales, que consumían grandes cantidades de polisacáridos vegetales, presentaban una baja abundancia de *Firmicutes* y una alta abundancia de *Prevotella*, en comparación con los niños italianos o incluso de su misma área geográfica de zonas urbanizadas, cuya dieta se caracterizaba por ser de estilo occidental y baja en fibra dietética [252, 255]. Además, también se observó que los niños italianos albergaban niveles elevados de

Enterobacteriaceae, predominantemente *Shigella* y *Escherichia* [252]. En relación con esto, *E. coli* se ha visto aumentada en pacientes con DMT2 [148], así como también se ha hallado recientemente que las muestras de plasma de individuos con DMT2 estaban enriquecidas en *Enterobacteriaceae*, incluyendo los patobiontes *Escherichia-Shigella* [257]. De manera que los cambios en la microbiota inducidos por dietas poco saludables podrían estar ligado a las enfermedades metabólicas, como obesidad y DMT2.

En relación con estos hallazgos, se han realizado más investigaciones que proponen que un aspecto importante por el que la dieta influye en la microbiota es el contenido y tipo de los macronutrientes consumidos [245] (**Figura 16**).

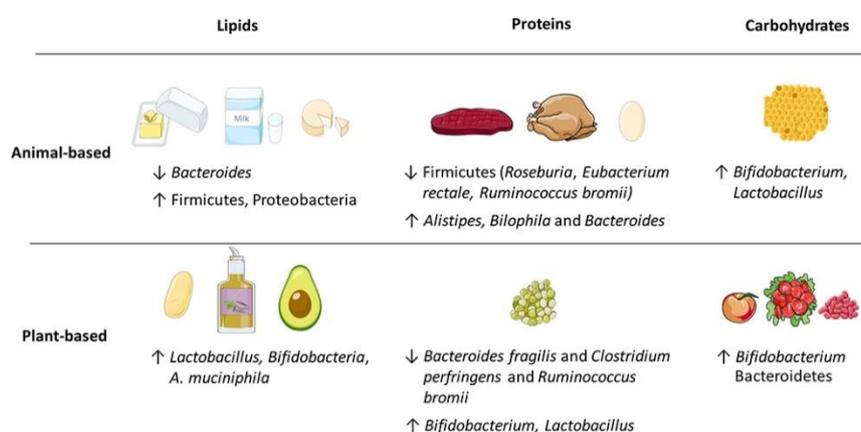


Figura 16. Cambios en la abundancia relativa de la microbiota intestinal producidos por los diferentes macronutrientes. Modificado de Puértolas-Balint et al [258].

- *Proteínas*

El consumo de dietas ricas en proteínas de origen animal provoca el enriquecimiento en bacterias tolerantes a la bilis, tales como *Alistipes*, *Bilophila* y *Bacteroides* y, el descenso bacterias que metabolizan polisacáridos de origen vegetal como *Roseburia*, *E. rectale* y *R. bromii* [247]. El descenso de estas bacterias con este tipo de dietas altas en proteínas y bajas en carbohidratos se ha encontrado estar acompañado de un decrecimiento de la proporción de butirato en las heces [259].

- *Grasas*

En cuanto al consumo de grasas, se ha descrito que el consumo de una dieta LF se asocia con un aumento de *Bifidobacterium* observándose reducciones concomitantes de la glucosa en ayunas y el colesterol total [260]. En el estudio CORDIOPREV, se mostró

que la dieta LF favorece el crecimiento de *F. prausnitzii* [261], la cual se ha encontrado disminuida en personas diabéticas [148]. Además, entre ambas bacterias se ha sugerido una interacción metabólica que potencia la producción de butirato mediante la hidrólisis parcial de carbohidratos no digeribles complejos realizada por *Bifidobacterium* [262].

Se ha propuesto que las grasas saturadas e insaturadas tienen efectos muy diferentes en la microbiota intestinal. De hecho, los cambios en la microbiota que resulta de la alimentación grasas insaturadas pueden ofrecer protección contra el aumento de peso inducido por grasas saturadas [249]. En relación con esto se ha demostrado que los ratones alimentados con una dieta a base de manteca de cerdo experimentaron una floración de *Bilophila* spp., *Turibacter* y *Bacteroides*, mientras que los ratones alimentados con una dieta a base de aceite de pescado experimentaron floraciones de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* spp. y *Akkermansia muciniphila* [103]. Además, los ratones alimentados con manteca de cerdo tenían incrementada la activación de TLRs e inflamación del tejido adiposo y menor sensibilidad a la insulina comparado con los ratones que consumían aceite de pescado. Los autores demostraron que estos resultados se deben, al menos en parte, a las diferencias en la microbiota intestinal entre los dos grupos, pues el trasplante de microbiota de un grupo al otro tras la depleción de microbiota con administración de antibióticos reprodujo los fenotipos inflamatorios y metabólicos que caracterizaban al donante [103]. Estos resultados sugirieron un papel de la microbiota intestinal en la mediación de los efectos diferenciales del tipo de grasa en la salud del huésped.

Además, en otro estudio el consumo de grasas saturadas también se ha asociado con el incremento de *Bilophila wadsworthia*, cuya actividad sulfato-reductora puede promover la alteración de la barrera intestinal (195). Precisamente, la reducción de sulfato ha sido una de las rutas metabólicas que se ha sugerido estar incrementada en la microbiota de pacientes con DMT2 mediante análisis metagenómico (104).

- *Carbohidratos y fibra dietética*

En cuanto a los carbohidratos, tanto digeribles como los no digeribles pero accesibles para la microbiota que forman parte de la fibra dietética, se han asociado con un enriquecimiento de *Bifidobacterium* [263] e inhibición del crecimiento de *Clostridia* [264], mientras que sólo los carbohidratos no digeribles, como se ha observado con el consumo de granos integrales de cebada, enriquecen adicionalmente a *Lactobacillus*,

Ruminococcus, *Eubacterium rectale* y *Roseburia*. [265] asociado a un incremento de SCFAs [266]. Los carbohidratos simples como la sacarosa, tanto individualmente como formando parte de una dieta de estilo occidental rica en grasas y azúcares, causan una rápida remodelación de la microbiota y una disfunción metabólica en animales de experimentación [267, 268]. De manera bastante consensuada, *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* se han visto enriquecidos con una gran variedad de tipos de fibra dietética, incluidos los galactoligosacáricos [246], mientras que el almidón resistente enriquece también *Bifidobacterium adolescentis*, *Ruminococcus bromii*, *Eubacterium rectale*, que poseen la actividad enzimática que les permite ser degradadores primarios de este compuesto [269].

Además, los análisis metagenómicos y metabolómicos confirmaron un cambio frente a la incrementada fermentación y degradación de proteínas en dietas de origen animal en comparación con la aumentada fermentación de carbohidratos que caracteriza las dietas de origen vegetal [247], ya que las dietas con mayor contenido de origen animal frente al vegetal, desplaza el metabolismo microbiano del intestino hacia la utilización de sustratos que provocan un aumento de los metabolitos de naturaleza citotóxica y pro-inflamatoria, como los derivados de la fermentación de aminoácidos, por ejemplo, BCAAs, fenoles, indoles y aminas [246, 269]. Además, con una dieta baja en fibra, ante la falta de glucanos las bacterias consumen las glicoproteínas de la mucosa de la barrera intestinal. El consumo crónico y excesivo de estos componentes, compromete la integridad de la barrera intestinal y aumenta la susceptibilidad de inflamación en estudios con animales [270] (**Figura 17**).

- *Compuestos bioactivos derivados de las plantas*

Además, los polifenoles derivados de uvas y arándanos, los cuales tienen efectos anti-inflamatorios y anti-obesogénicos, podrían relacionarse con la promoción del crecimiento de bacterias beneficiosas específicas, como *A. muciniphila*, la cual favorece la funcionalidad de la barrera intestinal y el metabolismo [271, 272]. Por otro lado, algunos compuestos vegetales son modificados por la propia microbiota intestinal a una forma que se asocia con beneficios para la salud. En este grupo se incluyen los hidroxycinamatos, los cuales están presentes como conjugados de ésteres en las plantas, pero en su forma química libre son compuestos antiinflamatorios y antioxidantes. Los

miembros de los géneros *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y *Escherichia* son capaces de liberar estos compuestos de su forma vegetal conjugada [245].

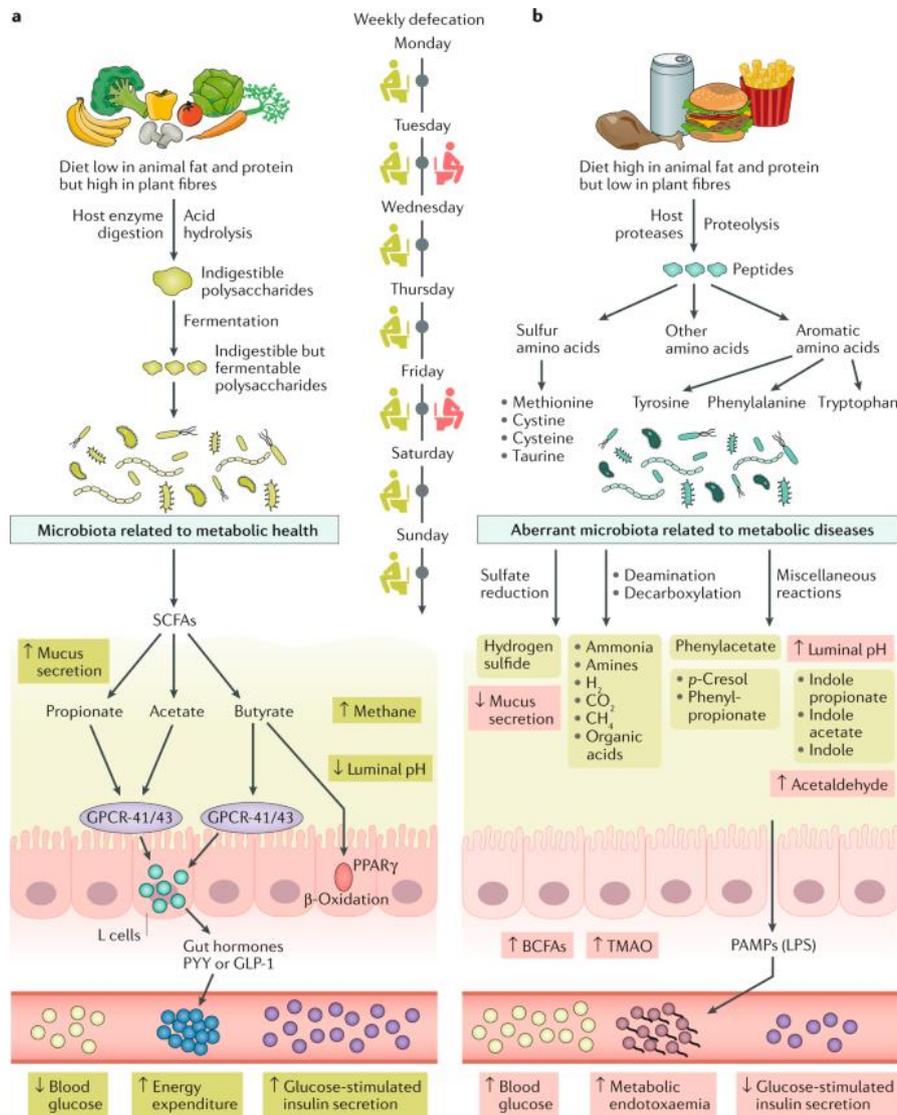


Figura 17. Comparativa del impacto de una dieta rica en productos de origen vegetal y fibra con una dieta alta en grasas y proteínas de origen animal, como la dieta occidental, en la microbiota intestinal y el metabolismo del huésped. Modificado de Fan et al [117].

Una limitación evidente del estudio de la relación entre microbiota con los nutrientes individuales y sus efectos en la salud es que esos nutrientes rara vez se consumen de forma aislada. Dada la limitación de dicho enfoque cada vez la investigación se aleja más de este reduccionismo experimental para examinar de patrones dietéticos [246].

Se ha evidenciado que dos modelos de dieta saludable, como la dieta Med y una dieta LF, inducen cambios en la microbiota intestinal que podrían mejorar la sensibilidad a la insulina en sujetos obesos. Se ha mostrado que el consumo de la dieta Med contrarresta la disminución de la flora sacarolítica observada en pacientes con síndrome metabólico, así como aumenta la abundancia de *Roseburia* [261]. Esto concuerda con el hecho de que *Roseburia bromii* se considera una especie clave para iniciar la degradación de algunos carbohidratos no digeribles y contribuye significativamente a la producción de butirato en el colon. Además, favorece la utilización posterior de sus productos de degradación como sustratos por otras bacterias a través de una red metabólica compleja de alimentación cruzada [269, 273]. También se ha sugerido que la dieta Med disminuye el ratio de *Firmicutes/Bacteroidetes*, asociado con obesidad, junto con un aumento de la proporción de SCFAs en las heces [274].

Por otro lado, la restricción calórica, enfoque dietético propuesto recientemente para inducir la regresión de DMT2 mediante pérdida de peso, puede provocar cambios en la composición de la microbiota. Se ha observado que la restricción calórica en humanos después de un año de intervención reduce la relación *Firmicutes/Bacteroidetes* y potencia el crecimiento de microorganismos beneficiosos como *Bacteroides*, *Roseburia*, *Faecalibacterium* y *Clostridium XIVa* [275]. Aunque no está totalmente elucidado, estos cambios particulares podrían modular los numerosos efectos de promoción de la salud asociados a las dietas con restricción calórica, pues estudios de trasplante de microbiota fecal en ratones gnotobióticos sugieren que la microbiota intestinal desempeña un papel causal en los efectos beneficiosos de la restricción calórica. Especialmente al reducir el peso corporal y la acumulación de lípidos hepáticos [276, 277]. Además, se ha observado que la restricción calórica se asocia con una reducción de endotoxemia [277].

También se ha mostrado cambios de la microbiota intestinal con otros modelos de dietas como las dieta cetogénica, paleolítica, vegetariana y vegana [246].

3.4.2 *La microbiota intestinal como factor determinante de la respuesta metabólica a la dieta*

Actualmente, existe un amplio acuerdo sobre el hecho de que las bacterias intestinales modifican la respuesta del cuerpo humano a los componentes de la dieta

influyendo en el metabolismo. Sin embargo, hay que tener en cuenta que los mecanismos que subyacen a este proceso son excepcionalmente complejos [249].

Un campo actual emergente es la precisión y personalización dietética para prevenir o tratar los desórdenes metabólicos [245]. En la última década se ha sugerido que la respuesta metabólica del huésped a una intervención nutricional o dietética depende de la composición del microbioma, de manera que probablemente sea un factor clave que tener en cuenta en la personalización médica y dietética [246].

Primeramente, en un estudio observaron que cuando la dieta contiene altos niveles de almidón resistente, los individuos que no muestran un crecimiento de *Ruminococcus bromii* y sus descendientes, tienen más niveles de almidón no digerido en sus heces, lo que apoya la idea de que la composición inicial de la microbiota determina si un carbohidrato es accesible a la microbiota [278]. De manera que podría ser clave en la respuesta a la dieta. En otro estudio, una intervención a corto plazo con pan derivado de granos integrales de cebada en personas sanas mostró mejorar la tolerancia a la glucosa en un grupo de individuos. Estos individuos respondedores, tenían una mayor relación *Prevotella/Bacteriodes* y enriquecimiento de *Prevotella copri*, así como representación de hidrolasas glucósidas específicas en su microbioma intestinal al inicio, lo que refleja la capacidad de degradar carbohidratos complejos con respecto a los no respondedores que recibieron la misma intervención dietética [279]. Por tanto, la composición de la microbiota inicial y su funcionalidad, podría permitir que los carbohidratos de los cereales integrales pudieran ser metabolizados por la microbiota de los sujetos que respondieron a la intervención, mientras que sería inaccesibles metabólicamente para aquellos que no respondieron [249].

Una mayor evidencia del papel de la microbiota en la respuestas metabólicas individualizadas a la dieta es aportado por otro estudio que muestra que la variabilidad entre individuos en la respuesta postprandial de glucosa a una determinada comida se correlaciona con la composición de la microbiota intestinal [118]. Un algoritmo de aprendizaje automático, basado tanto en los perfiles clínicos como de microbiota, mostró predecir las respuestas postprandiales de glucosa a diferentes comidas, lo que permitió elaborar intervenciones dietéticas personalizadas basadas en dichas predicciones, que mostraron una mejoría del metabolismo de la glucosa de los sujetos [280].

Este trabajo proporcionó una visión crucial del papel de la microbiota intestinal en la respuesta a la dieta [245]. Por ello, se ha propuesto que los algoritmos de procesamiento de datos, como el aprendizaje automático, podrían utilizarse para identificar aspectos del perfil clínico y del perfil del microbioma de los individuos que ayudan a predecir la respuesta a las intervenciones dietéticas [246] (**Figura 18**). Tras la validación de estos modelos predictivos en cohortes independientes, se podría determinar la mejor intervención para cada individuo y aplicarse para mejorar la salud humana. Además, las bacterias predictivas también podrían utilizarse para guiar posteriores estudios de los mecanismos subyacentes en modelos experimentales [249].

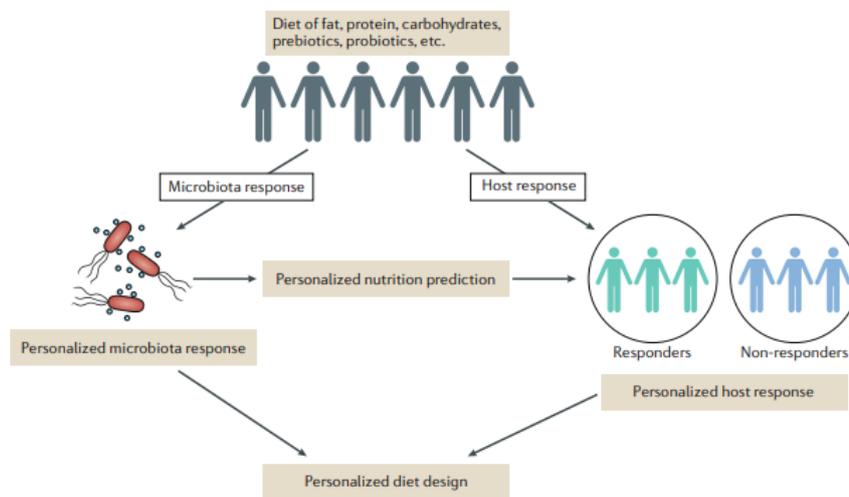


Figura 18. El perfil específico del microbioma antes de la intervención como predictor de las respuestas metabólicas del huésped a la dieta para potenciar estrategias de nutrición personalizadas. Modificado de Kolodziejczyk et al [281].

III. HIPÓTESIS

III. HIPÓTESIS

La prevalencia de la DMT2 ha aumentado notablemente en las últimas décadas [47]. Además, su concurrencia con CHD aumenta el riesgo de desarrollar un nuevo evento cardiovascular y de la mortalidad [282]. Por tanto, es especialmente importante revertir la DMT2 en pacientes con CHD, así como la identificación de cuales de estos pacientes tienen un riesgo alto de desarrollar DMT2, con el propósito de prevenir su desarrollo.

Estudios previos han descrito que la microbiota intestinal en pacientes diabéticos presenta alteraciones, incluso en aquellos sin tratamiento hipoglucemiante y en individuos prediabéticos (154). De hecho, estas alteraciones han sido asociadas a las anormalidades metabólicas, así como al componente inflamatorio responsable de la resistencia a insulina asociados a la DMT2, por lo que actualmente es reconocido el papel relevante que la microbiota intestinal juega en la fisiopatología de esta enfermedad (117). La mejora de la sensibilidad a la insulina observada tras la transferencia fecal de individuos sanos a pacientes con síndrome metabólico apoya este hecho [157, 158]. Por tanto, la microbiota intestinal podría ser uno de los factores asociados al desarrollo de la enfermedad con utilidad en la predicción y evaluación del riesgo. Además, se ha propuesto como uno de los mecanismos involucrados en la remisión de DMT2, en base a la mejora metabólica temprana después de la cirugía bariátrica y, que tiene lugar antes de la pérdida de peso [75]. Así mismo, se ha sugerido que contribuye a los efectos beneficiosos de la restricción calórica [276, 277], la cual ha demostrado ser eficaz para inducir la remisión [73]. Estas relaciones plantean la posibilidad de que la microbiota intestinal pudiera predecir la remisión de DMT2.

Las estrategias nutricionales son ampliamente usadas en el tratamiento y prevención de la DMT2 (61). Además, se ha sugerido que la respuesta metabólica a una intervención dietética está asociada con la composición de la microbiota intestinal inicial [279, 280]. Por ello, la composición de la microbiota intestinal podría servir para predecir la capacidad de respuesta a las intervenciones dietéticas, lo que a su vez tendría una relevancia potencial en el emergente campo de la nutrición personalizada [280].

Basándonos en estos hallazgos, nuestra hipótesis es que un patrones específicos de microbiota intestinal podría ayudar a identificar aquellos pacientes que se beneficiarían de intervenciones dietéticas saludables experimentando una remisión de la DMT2, así como, alteraciones de la microbiota intestinal podrían preceder al desarrollo de diabetes

y potencialmente mejorar la predicción del riesgo de desarrollo de DMT2. Adicionalmente, podría determinar el riesgo específico de DMT2 asociado al consumo de distintas dietas.

IV. OBJETIVOS

IV. OBJETIVOS

El objetivo fue evaluar el potencial de la composición de la microbiota intestinal inicial como factor predictivo asociado al desarrollo y la remisión de la DMT2 con el consumo de dos modelos dietas saludables (la dieta LF y la dieta Med), así como perfiles de riesgo específicos para cada una de las dietas, en pacientes con CHD del estudio CORDIOPREV.

Este objetivo general se divide en tres objetivos específicos, que hemos dado respuesta con los tres trabajos contenidos en esta tesis:

1. Evaluar si la composición de la microbiota intestinal, añadida a las variables clásicas asociadas al riesgo de DMT2, puede mejorar la predicción de la remisión lograda mediante dos modelos dietéticos (dieta LF o dieta Med) en pacientes con DMT2 de reciente diagnóstico y CHD del estudio CORDIOPREV. *Este objetivo se aborda en el CAPÍTULO 1. Se corresponde con la publicación nº1. “A microbiota-based predictive model for type 2 diabetes remission induced by dietary intervention: from the CORDIOPREV study”.*
2. Evaluar si la composición de la microbiota intestinal, añadida a biomarcadores clínicos, podría mejorar la predicción de nuevos casos incidentes de DMT2 en pacientes con CHD, en el marco del estudio CORDIOPREV. *Este objetivo se aborda en el CAPÍTULO 2. Se corresponde con la publicación nº2. “An altered microbiota pattern precedes Type 2 diabetes mellitus development: from the CORDIOPREV study”.*
3. Explorar las diferencias entre la microbiota intestinal inicial de los pacientes que desarrollaron DMT2 mientras consumían una dieta LF y los que consumían la dieta Med y, fundamentándonos en estas diferencias, construir escalas de clasificación numéricas (en inglés “scores”) específicas para cada dieta que permitan evaluar el riesgo individual de DMT2 asociado con el consumo de una dieta LF o Med en el marco del estudio CORDIOPREV. *Este objetivo se aborda en el CAPÍTULO 3. Se corresponde con la publicación la publicación nº 3. “A Diet-Dependent Microbiota Profile Associated with Incident Type 2 Diabetes: From the CORDIOPREV Study”.*

***V. MARCO GENERAL DEL CONTENIDO DE LA
INVESTIGACIÓN: ESTUDIO CORDIOPREV***

V. MARCO GENERAL DEL CONTENIDO DE LA INVESTIGACIÓN: ESTUDIO CORDIOPREV

1. Población del estudio CORDIOPREV

El estudio Coronary Diet Intervention with Olive Oil and Cardiovascular Prevention (CORDIOPREV) es un ensayo controlado, prospectivo y aleatorizado de 1002 pacientes con CHD asignados a consumir uno de dos modelos dietéticos [una dieta Med y una dieta LF] durante un período de siete años además del tratamiento convencional. Este ensayo clínico ha sido registrado conforme a lo exigido por la legislación (Clinical Trials.gov.Identifier: NCT00924937). Los criterios de elegibilidad, el diseño y los métodos del ensayo clínico CORDIOPREV se han sido reportados previamente [283]. Brevemente, los principales criterios de inclusión fueron tener entre 20 y 75 años, con CHD establecida, pero sin eventos clínicos en los últimos seis meses, sin otras enfermedades graves y con una esperanza de vida de al menos cinco años (**Tabla 2**).

Tabla 2. Criterios de inclusión y exclusión del estudio CORDIOPREV. *Modificada de Delgado-Lista J. et al. [283]*

<u>CRITERIOS DE INCLUSIÓN</u>
Declaración escrita de Consentimiento Informado
<ul style="list-style-type: none"> - Enfermedad coronaria crónica inestable - Angina inestable - Infarto agudo de miocardio - Enfermedad coronaria crónica de alto riesgo
Género para ser elegible - Ambos.
<u>CRITERIOS DE EXCLUSIÓN</u>
Edad <20 o >75 años (o esperanza de vida inferior a 5 años).
Pacientes con una revascularización programada con < 6 meses antes de su inclusión en el ensayo.
Grado II-IV de insuficiencia cardiaca (New York Heart Association).
Disfunción ventricular izquierda con una FEVI < 35 %.
Incapacidad o impedimento para seguir el protocolo.
Pacientes con DMT2 severa o no controlada, o aquellos con insuficiencia renal con creatinina plasmática > 2 mg/dl.
Otras patologías crónicas: enfermedades psiquiátricas, insuficiencia renal crónica, hepatopatía crónica, neoplasia activa, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y enfermedades digestivas

Todos los pacientes dieron su consentimiento informado por escrito para participar en el estudio. El protocolo del ensayo y todas sus modificaciones fueron aprobados por el Comité de Ética de Experimentación Humana del Hospital Universitario Reina Sofía (nº 1496/27/03/2009), comité regional responsable de experimentación humana. Todos los procedimientos seguidos se atuvieron a la Declaración de Helsinki de 1975, revisada en 2008 y a las Normas de Buenas Prácticas Clínicas. Además, el trabajo experimental y clínico realizado en este estudio ha cumplido con todos los procedimientos sanitarios y de seguridad obligatorios.

2. Diseño del estudio y evaluación dietética

El diseño del estudio se ha descrito previamente [283]. En resumen, los participantes fueron asignados al azar para recibir dos dietas: una dieta Med o una dieta LF. La dieta LF consistía en <30% de grasa total (12%-14% de ácidos grasos monoinsaturados (MUFA), 6-8% de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) y <10% de ácidos grasos saturados (SFA)), 15% de proteínas y un mínimo de 55% de carbohidratos. La dieta Med incluía <35% de las calorías en forma de grasa (22% de MUFA, 6% de PUFA y <10% de SFA), un 15% de proteínas y un máximo de 50% de hidratos de carbono. En ambas dietas, el contenido de colesterol se ajustó a <300 mg/día. La intervención tuvo como prioridad adaptar los hábitos dietéticos de cada individuo al patrón dietético.

El asesoramiento dietético y la evaluación de la adherencia a la dieta se ha descrito recientemente [284]. Al inicio del estudio y cada año de seguimiento, cada paciente tuvo una entrevista individual y presencial con un nutricionista para rellenar un cuestionario semicuantitativo de frecuencia de consumo de alimentos de 137 ítems, validado en España [285]. También se administró el cuestionario validado de 14 ítems MEditerranean Diet Adherence Screener (MEDAS) para medir la adherencia a la dieta Med [286] y otro cuestionario de 9 ítems para evaluar la adherencia a las pautas dietéticas bajas en grasa, que se desarrolló y utilizó en el estudio PREDIMED.

La dieta Med y la dieta LF fueron diseñadas para proporcionar una amplia variedad de alimentos de todos los grandes grupos alimenticios, incluyendo verduras, frutas, cereales, patatas, legumbres, productos lácteos, carne y pescado, sin una restricción específica sobre el consumo calórico. Los participantes de ambos grupos de intervención

recibieron el mismo asesoramiento dietético intensivo. Las nutricionistas realizaron entrevistas individuales personalizadas en el momento de la inclusión y cada seis meses, así como también se celebraron sesiones trimestrales de educación en grupo con un máximo de 20 participantes por sesión y por supuesto, separadas para cada grupo de intervención. De esta forma, se proporcionaron recomendaciones dietéticas específicas al grupo de intervención asignado, así como estrategias para ayudar a modificar los hábitos dietéticos manteniéndolos a largo plazo. Además, en las entrevistas individuales se realizaron medidas antropométricas (peso, estatura, IMC y perímetro de cintura) de una forma estandarizada.

Además, para garantizar que la principal fuente de grasa de la dieta Med (aceite de oliva) fuera idéntica para todos los pacientes de este grupo, el aceite de oliva fue entregado a los participantes por el equipo de investigación. Los paquetes de alimentos, que incluían alimentos bajos en grasa (cereales galletas, pasta, etc.) de coste similar, se proporcionaron a los pacientes que fueron asignados al azar al grupo LF.

3. Aleatorización

El procedimiento de aleatorización se llevó a cabo de forma que la asignación a ambas dietas estuviera equilibrada. La aleatorización se basó en las siguientes variables: género (hombre, mujer), edad (menor y mayor de 60 años) e infarto de miocardio previo (sí, no). Con esta distribución se crearon ocho grupos distintos, con todas las combinaciones posibles de los factores anteriores, para asignar las dietas (aleatorización en bloque). El proceso de aleatorización fue realizado por la Escuela Andaluza de Salud Pública. El procedimiento de asignación de la dieta fue el siguiente: cuando había un candidato a la aleatorización, los dietistas del estudio llamaban por teléfono al responsable del estudio en la Escuela Andaluza de Salud Pública, que comunicaba la dieta asignada al dietista. Los dietistas eran los únicos miembros del equipo de intervención que conocían el grupo dietético de cada participante.

4. Determinaciones bioquímicas

Las determinaciones bioquímicas basales de los pacientes se obtuvieron tras un período de ayuno de 12 horas. Se obtuvieron muestras de sangre venosa y se recogieron en tubos Vacutainer sin anticoagulante, en tubos que contenían EDTA y tubos para suero,

y se transfirieron inmediatamente a 4°C. Para minimizar la degradación proteolítica, se añadió un cóctel inhibidor de proteasa (Roche Diagnostic, Alemania) al plasma (40 µl / ml). Las muestras de plasma y suero se congelaron a -80°C para un posterior análisis bioquímico. Las mediciones bioquímicas se realizaron en el Hospital Universitario Reina Sofía por personal ajeno a las intervenciones. Para el estudio del perfil lipídico se determinaron los niveles de colesterol total, LDL, lipoproteínas de alta densidad (HDL) y triglicéridos. Los parámetros séricos se midieron en los analizadores Architect c-16000 (Abbott®, Chicago, Illinois, EE. UU) mediante técnicas espectrofotométricas (métodos colorimétricos enzimáticos): método de hexoquinasa para glucosa y oxidación-peroxidación para colesterol total y triglicéridos. El LDL se calculó utilizando la fórmula de Friedewald (siempre que el nivel de triglicéridos fuera inferior a 400 mg/dl).

VI. CAPÍTULO 1. *Aborda: Objetivo específico 1.*

Estudio del potencial de la composición de la microbiota intestinal inicial como factor predictivo asociado a la remisión de la DMT2 inducida mediante intervención dietética: Estudio CORDIOPREV.

Publicación n°1: Vals-Delgado C. et al. “A microbiota-based predictive model for type 2 diabetes remission induced by dietary intervention: from the CORDIOPREV study”.

Clin Trans Med. (2021).

1. MATERIALES Y MÉTODOS- CAPÍTULO 1

1. Población de estudio

Este trabajo forma parte del estudio CORDIOPREV-DIRECT (DIabetes REgression CORDIOPREV Trial), en el cual se incluyeron todos los pacientes del estudio CORDIOPREV con una DMT2 de reciente diagnóstico que no habían recibido tratamiento hipoglucemiante al inicio del estudio (190 de 1002 pacientes). Debido a la imposibilidad de realizar la prueba diagnóstica utilizada en este trabajo en siete de estos pacientes, se evaluó la remisión de la diabetes en los 183 pacientes restantes durante los 5 años de seguimiento de cada participante. Estos pacientes se sometieron a pruebas anuales desde el primer año de seguimiento y se clasificaron como Respondedores, pacientes que revirtieron la DMT2 durante el periodo de cinco años de intervención dietética durante al menos 2 años consecutivos sin el uso de medicación para la diabetes ($n = 73$); o No Respondedores, que no lograron la remisión de la diabetes durante el periodo de seguimiento ($n = 110$). La remisión se definió como una glucemia por debajo del rango diabético durante al menos dos años consecutivos ($HbA1c < 6,5\%$, $FPG < 126$ mg/dl, y $2h PG < 200$ mg/dl) en ausencia de terapia farmacológica o quirúrgica activa según la ADA [287]. Tres participantes fallecieron durante el periodo de seguimiento sin lograr la remisión de la diabetes.

En concreto, el 90% de los Respondedores regresaron a un estado prediabético (remisión parcial), dividiéndose específicamente este porcentaje en un 76% que revirtió manteniendo una glucosa alterada en ayunas (100 mg/dl a 125 mg/dl) y/o de tolerancia alterada a la glucosa (2h PG de 140 mg/dl a 199 mg/dl) y un 14% que revirtió presentando exclusivamente HbA1c de alto riesgo. El 10% restante volvió a los valores no diabéticos de glucemia (remisión total). La remisión de la DMT2 en estos pacientes no se asoció ni con la pérdida de peso ni con el tipo de dieta consumida (**Tablas S1 y S2**, Material suplementario de la publicación nº1). Ambos grupos presentaban la misma adherencia a cada dieta (**Tabla S7**, apartado Material suplementario de la publicación nº1), y no se incentivó cambios en el estilo de vida como la pérdida de peso, la remisión tampoco se asoció con modificaciones en la medicación (**Tabla S6 y S8**, Material suplementario de la publicación nº1).

De este total, se incluyeron en este trabajo todos aquellos pacientes de los que se disponía de una muestra fecal al inicio del estudio CORDIOPREV y que no habían recibido tratamiento con antibióticos en los tres meses anteriores a la recogida de la muestra inicial (n=110). Del total de sujetos con microbiota analizada, 44 de ellos fueron clasificados como Respondedores.

2. Test OGTT

Al inicio del estudio y cada año de seguimiento, los pacientes se sometieron a una prueba OGTT estándar. Después de 12 h de ayuno, se recogió una muestra de sangre antes de la ingesta de glucosa oral (0 min) y de nuevo tras una carga de glucosa de 75 g (Trutol 75; Custom Laboratories, Baltimore, MD, EE.UU.) con muestreo a los 30, 60, 90 y 120 min para establecer los niveles de glucosa e insulina en plasma. Además, se calcularon índices indicativos de la sensibilidad a la insulina y funcionalidad de célula β derivados del OGTT (HOMA-IR, índice de sensibilidad a la insulina (ISI), índice insulinogénico (IGI), índice de resistencia hepática a la insulina (HIRI), índice de sensibilidad a la insulina muscular (MISI) y “disposition index” (DI)) de la forma descrita anteriormente [288].

3. Test de sobrecarga oral grasa

Además, para evaluar la respuesta lipémica postprandial se realizó una prueba oral de tolerancia a la grasa al inicio del estudio, utilizando una comida mixta rica en grasa ajustada al peso (0,7 g de grasa y 5 mg de colesterol por kg de peso corporal) con un 12% SFA, 10% PUFA, 43% MUFA, un 10% de proteínas y un 25% de hidratos de carbono.

La composición de la comida fue diseñada por un grupo de nutricionistas con aceite de oliva, leche desnatada, pan blanco, yemas de huevo cocidas y tomates. Los participantes ingirieron la comida rica en grasas durante unos 20 min de duración aproximada, bajo la supervisión de un miembro del equipo de investigación. Tras la comida, los voluntarios descansaron y no consumieron alimentos durante 5 h, pero se les permitió beber agua. Se recogieron muestras de sangre para realizar pruebas bioquímicas antes de la comida y cada hora durante las 4 h siguientes, siguiendo las recomendaciones para una prueba oral de tolerancia a las grasas propuestas por Mihás et al. [289]. Antes de la prueba, a los pacientes se les solicitó realizar un ayuno durante 12 horas y abstenerse de fumar durante dicho período. Además, se les pidió que evitaran el consumo de bebidas

alcohólicas durante los siete días anteriores y una actividad física extenuante el día anterior a la prueba.

4. Determinación de LPS

Los niveles de LPS se analizaron en el basal, antes (estado de ayuno) y después de 4h de la prueba de tolerancia grasa por vía oral (estado postprandial), utilizando la prueba de lisado de amebocitos de Limulus (QCL-1000 Chromogenic LAL (Lonza Ibérica S.A., Barcelona, España)), como se ha descrito previamente [177]. La razón entre los dos puntos de medida de los niveles de LPS en plasma (cambio de pliegue, en inglés “fold-change”) se calculó como una medida del aumento postprandial de los niveles de LPS en plasma.

5. Análisis de la microbiota intestinal

Las muestras fecales se almacenaron a -80 °C. La extracción de ADN se realizó con el manual QIAamp DNASTool Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN se cuantificó utilizando el kit Qubit dsDNA HS Assay (Life technologies), ya que se trata de un ensayo altamente específico para la detección de dsDNA en 10 pg/ml-100pg/ml. A continuación, se realizaron dos reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) independientes para cada muestra fecal siguiendo el protocolo de preparación de librerías de secuenciación metagenómica 16S de Illumina (Illumina, San Diego CA). En la primera PCR se amplificó la región hipervariable V3-V4 del gen 16S ARNr utilizando 0,2 µm de cada uno de los cebadores universales reportados por Klindworth et al. 5'-TCGTTCGGCAGCGTCAGATGTGTAAAGACAG-3' y 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGACAG-3' [290]. Brevemente, la PCR se llevó a cabo utilizando el mix KAPA HiFi HotStart ReadyMix (KAPABIOSYSTEMS, Darmstadt, Alemania), 1,25µl de ADN extraído (5 ng/µl en 10 mM Tris pH8,5) y 0,2 µM de cada cebador. Los parámetros de ciclo empleados fueron los siguientes: 3 min de desnaturalización a 95°C seguidos de 25 ciclos (30 s a 95°C, 30 s a 60°C, 30 s a 72°C) y una extensión final a 72°C durante 5 min. La purificación de los amplicones de ARNr 16S se llevó a cabo utilizando las perlas Edadntcourt AMPure XP (Beckman Coulter, Brea, CA).

Una segunda reacción de PCR une los índices duales y los adaptadores de secuenciación de Illumina utilizando Nextera XT Index Kit (Illumina, San Diego, CA).

Esta PCR se realizó con KAPA HiFi HotStart ReadyMix (KAPABIOSYSTEMS, Darmstadt, Alemania), 5 µl del amplicón anterior, 5 µl de cada Nextera XT Index Primer 1(N7xx) y 5 uL de cada Nextera XT Index Primer 2(S5xx), utilizando los siguientes parámetros de ciclo: 3 min de desnaturalización a 95°C seguidos de ocho ciclos (30 s a 95°C, 30 s a 55°C, 30 s a 72°C), y una extensión final a 72°C durante 5 min. La purificación del producto de la PCR se llevó a cabo utilizando las perlas Edadntcourt AMPure XP (Beckman Coulter, Brea, CA). La secuenciación se llevó a cabo en la plataforma MiSeq de Illumina (Illumina, San Diego CA).

Las secuencias obtenidas en este estudio han sido enviadas al NCBI Sequence Read Archive (SRA) con el número de acceso PRJNA612599 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/PRJNA612599>). Los resultados de las secuencias se analizaron con el programa Quantitative Insights into Microbial Ecology (QIIME), versión 1.9.1 [291] utilizando los parámetros por defecto de QIIME. Las lecturas emparejadas se ensamblaron utilizando el script `multiple_join_paired_ends.py`, que une las lecturas demultiplexadas en ambos sentidos. El archivo de salida se procesó para filtrar la calidad mediante `split_libraries_fastq.py`. Las secuencias de alta calidad se agruparon en Unidades Taxonómicas Operativas (OTU) con un umbral de identidad de secuencia del 97%, y la taxonomía se asignó examinando las secuencias de alta calidad con la base de datos Greengenes (13_8) [292]. La abundancia taxonómica relativa se midió como la proporción de lecturas sobre el total en cada muestra asignada a una taxonomía determinada. Para excluir los taxones bacterianos que no estaban presentes en la mayoría de las muestras, se fijó un límite de exclusión. Sólo se consideraron los taxones bacterianos que contenían lecturas de secuencias en al menos el 75% del total de las muestras.

6. Construcción de modelos predictivos y curvas ROC

Se construyó un clasificador “random forest” utilizando el paquete `caret` en R. Para evaluar el rendimiento del modelo predictivo y obtener curvas más precisas, utilizamos el método de validación cruzada de 10-fold. Este método consiste en diez divisiones diferentes de entrenamiento y validación, de modo que cada todos los datos sean utilizados una sola vez en el conjunto de validación. Se promediaron las curvas de error de validación cruzada 10-fold (media de diez conjuntos de validación) de los cinco modelos distintos creados a partir de diferentes datos. Además, se calculó la importancia

de las variables de taxones bacterianos mediante determinación de la Disminución Media de la Precisión para el modelo de “random forest”. El rendimiento de los modelos obtenidos se evaluó con curvas ROC calculadas con el paquete R pROC.

7. Construcción de una escala de clasificación numérica (en inglés “score”) de predicción de respuesta basada en la microbiota intestinal

Construimos una escala de clasificación numérica (en inglés “score”) de predicción de respuesta para los pacientes basada en el perfil de la microbiota intestinal. Esta se construyó partir de los diez taxones bacterianos con mayor importancia en el modelo predictivo basado en la microbiota, evaluada mediante los Valores de Disminución Media de la Precisión (**Figura 21**). Clasificamos a los pacientes según la abundancia para cada uno de estos taxones bacterianos en terciles ascendentes, y se asignó un papel perjudicial o beneficioso a cada taxón bacteriano según una mayor abundancia media basal en el grupo de No respondedores o Respondedores, respectivamente. De este modo, para un género perjudicial: el tercil 1 se puntuó como 1 (protector), el tercil 2 como 0 (efecto neutro) y el tercil 3 como -1 (riesgo), y lo contrario para un género beneficioso: el tercil 1 como -1 (riesgo), el tercil 2 como 0 (efecto neutro) y el tercil 3 como 1 (protector). La puntuación se calculó sumando el Valor de Disminución Media de la Precisión para cada taxón bacteriano, con un valor positivo o negativo, según los terciles de protección o riesgo mencionados y, desestimando los terciles con efecto neutro (añadidos como 0). Además, evaluamos la probabilidad de remisión de la DMT2 según los valores numéricos de predicción de respuesta basada en la microbiota intestinal obtenidos, usando análisis de regresiones Cox. Para ello, se categorizó a los pacientes por terciles ascendentes del valor de puntuación de predicción de respuesta: T1, puntuación de predicción de respuesta baja; T2, puntuación de predicción de respuesta intermedia; T3, puntuación de predicción de respuesta alta.

8. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el software estadístico SPSS 21.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). La prueba de Kolmogorov-Smirnov fue utilizada para evaluar si las variables siguen una distribución normal. Las diferencias estadísticas en las variables continuas antropométricas y bioquímicas entre los grupos se evaluaron mediante ANOVA de un factor. Las variables cualitativas se compararon mediante la

prueba de Chi-Cuadrado. Se utilizó el programa LEfSe (Linear discriminant analysis Effect Size) para determinar los taxones de mayor abundancia diferencial entre los grupos utilizando los parámetros por defecto [293]. Además, realizamos un análisis de regresión de Cox con los terciles (orden ascendente) para la escala numérica (“score”) de predicción de respuesta basada en la microbiota construida. También realizamos el modelo de análisis de Cox ajustado por edad, género, IMC, HDL, triglicéridos, dieta e intensidad del tratamiento con estatinas de acuerdo con la American Heart Association (AHA) [294]. La prueba de Chi-cuadrado fue realizada para evaluar la asociación entre los terciles de la escala numérica de predicción de respuesta basada en la microbiota y los terciles del “fold-change” postprandial de los niveles plasmáticos de LPS. En todos los análisis un valor $p \leq 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

2. RESULTADOS- CAPÍTULO 1

1. Características basales de la población de estudio

Se observó un mayor peso, IMC, perímetro de cintura y niveles de glucosa, así como un menor DI en el basal en el grupo No respondedores con disponibilidad de muestra fecal que en los Respondedores con disponibilidad de muestra fecal ($p < 0,05$) (**Tabla 3**). Estas diferencias también se observaron en el total de pacientes con DMT2 de reciente diagnóstico junto con unos mayores niveles de HbA1c, insulina e índice HIRI en el grupo No Respondedores en comparación con el grupo Respondedores (**Tabla 3**). Si bien no observamos diferencias en el basal en los niveles del marcador inflamatorio proteína C-reactiva entre los grupos, se observó una tendencia estadística no significativa de un cambio diferencial entre grupos, con una reducción de la inflamación a través de este marcador en el grupo Respondedores después de los 5 años de seguimiento (**Tabla S5**, Material suplementario de la publicación nº1). Además, confirmamos que la población incluida en este estudio, a pesar de estar limitada por la disponibilidad de muestras fecales y los criterios de exclusión del tratamiento antibiótico, era representativa de la población total de CORDIOPREV-DIRECT (**Tabla 4**).

Tabla 3. Características basales de la población con DMT2 de reciente diagnóstico para el estudio de remisión de la DMT2 y de la población con microbiota intestinal analizada.

	Respondedores (n=73)	No respondedores (n=110)	Valor de p	Respondedores [†] (n=44)	No respondedores [†] (n=66)	Valor de p
Hombre/Mujer	60/13	92/18	0,799	36/8	56/10	0,674
Edad (años)	60,8±1,0	59,3±0,9	0,252	60,1±1,3	57,7±1,2	0,198
Peso (kg)	80,2±1,3	88,4±1,4	<0,001	78,2±1,7	88,0±1,8	<0,001
IMC (kg/m ²)	29,9±0,4	32,1±0,4	0,001	29,2±0,6	31,7±0,5	0,002
Perímetro de cintura (cm)	101±1	108±1	<0,001	99±1,3	108±1,3	<0,001
Presión sanguínea sistólica (mmHg)	137±3	138±2	0,717	137±3	135±2	0,518
Presión sanguínea diastólica (mmHg)	76,6±1,6	77,1±1,0	0,755	76,4±2,1	76,5±1,4	0,945
Triglicéridos (mmol/L)	1,48±0,10	1,69±0,07	0,090	1,60±0,15	1,71±0,09	0,478
Colesterol (mmol/L)	4,16±0,08	4,31±0,08	0,203	4,24±0,11	4,29±0,11	0,726
HDL (mmol/L)	1,11±0,03	1,06±0,02	0,141	1,12±0,05	1,04±0,03	0,116
LDL (mmol/L)	2,31±0,07	2,42±0,07	0,302	2,32±0,10	2,35±0,09	0,828
Proteína C-reactiva (nmol/L)	37,1±5,3	33,5±3,6	0,558	37,8±6,8	32,2±4,5	0,480
HbA1c (mmol/mol)	47,8±0,9	50,7±0,9	0,032	48,1±1,2	50,7±1,3	0,176
HbA1c (%)	6,53±0,08	6,79±0,08	0,032	6,55±0,11	6,79±0,12	0,176
Glucosa (mmol/L)	5,50± 0,09	6,58±0,14	<0,001	5,59±0,12	6,47±0,20	0,001
Insulina (nmol/L)	64,4± 5,5	93,3±7,8	0,007	64,8±7,1	94,8±11,9	0,058
HOMA-IR	3,49±0,42	4,84±0,32	0,010	3,93±0,65	4,76±0,45	0,281

Índice de sensibilidad a la insulina	3,16±0,20	2,37±0,12	<0,001	3,02±0,26	2,47±0,16	0,063
Índice insulinogénico	0,70±0,19	0,68±0,14	0,921	0,89±0,26	0,80±0,22	0,795
Índice de resistencia hepática a la insulina	1421±168	1970±129	0,009	1616±263	1943±182	0,293
Índice de resistencia a la insulina muscular(x10 ²)	1,93±0,22	2,20±0,25	0,452	1,74±0,29	2,23±0,35	0,313
“Disposition Index”	0,68±0,06	0,43±0,02	<0,001	0,65±0,05	0,46±0,03	0,002
Fumador (%)	11,4	16,7	0,440	12,3	11,8	0,917
Hipertensión (%)	57,5	65,5	0,279	61,4	60,6	0,936
Historia de enfermedad vascular periférica (%)	0,0	4,5	0,065	0,0	6,1	0,096
Historia de accidente cerebrovascular o AIT (%)	4,1	4,5	0,888	4,5	4,5	1,000
Historia de infarto de miocardio (%)	53,4	55,5	0,787	56,8	57,6	0,937
Historia de angina (%)	40,0	39,7	0,970	38,6	36,4	0,809
Historia de ICP(%)	93,2	98,2	0,082	90,9	98,5	0,062
Historia de CABG (%)	5,5	2,7	0,342	6,8	1,5	0,146
Medicación basal (%)						
Antiagregantes	94,5	96,4	0,550	95,5	100	0,080
Betabloqueantes	57,5	65,5	0,279	56,8	68,2	0,225
Inhibidores ACE	13,7	17,3	0,517	13,6	12,1	0,815
Diuréticos	39,7	41,8	0,778	29,5	37,9	0,368
Bloqueantes del receptor de Angiotensina-II (ARBs)	20,5	23,6	0,624	22,7	19,7	0,702
Antagonistas de Ca	11,0	19,1	0,140	13,6	19,7	0,410
Nitratos	15,1	7,3	0,090	11,4	9,1	0,697
Antiarrítmicos	2,7	0,9	0,340	2,3	1,5	0,771
Anticoagulantes orales	1,4	0,9	0,769	0,0	1,5	0,412
Estatinas	86,3	88,2	0,707	95,5	95,5	1,000
Hipolipemiantes	6,8	7,3	0,913	6,8	6,1	0,873
Inhibidores de la bomba de protones	83,6	82,7	0,883	86,4	89,4	0,630
Ansiolíticos	6,8	8,2	0,740	9,1	10,6	0,795

Nuestro estudio se llevó a cabo en 183 pacientes con DMT2 de reciente diagnóstico, de los cuales 110 contaban con disponibilidad de muestra fecal y no habían recibido tratamiento con antibióticos en los tres meses anteriores a la recogida de muestras. Los datos son la media±error estándar de la media (SEM). Respondedores: pacientes que revirtieron la DMT2 tras 5 años de seguimiento de la intervención dietética. Respondedores†: pacientes que revirtieron de la DMT2 tras 5 años de seguimiento de la intervención dietética con disponibilidad de muestra fecal. No respondedores†: pacientes que permanecieron con DMT2 después de 5 años de seguimiento. No respondedores‡: pacientes que permanecieron con DMT2 después de 5 años de seguimiento con disponibilidad de muestra fecal. Los valores p se calcularon mediante ANOVA de un factor. Valor p de género analizado mediante Chi-cuadrado. Diferencias significativas (p< 0,05).

Tabla 4. Características basales de la población de la población con DMT2 de reciente diagnóstico para el estudio de remisión de la DMT2 en comparación con la población con microbiota intestinal analizada.

	Respondedores (n=73)	Respondedores [†] (n=44)	Valor de <i>p</i>	No respondedores (n=110)	No respondedores [‡] (n=66)	Valor de <i>p</i>
Hombre/Mujer	60/13	36/8	0,959	92/18	56/10	0,831
Edad (años)	60,8±1,0	60,1±1,3	0,649	59,3±0,9	57,7± 1,2	0,304
Peso (kg)	80,2±1,3	78,2±1,7	0,341	88,4±1,4	88,0±1,8	0,835
IMC (kg/m ²)	29,9±0,4	29,2±0,6	0,361	32,1±0,4	31,7±0,5	0,639
Perímetro de cintura (cm)	101±1	99±1	0,304	108±1	108±1	0,725
Triglicéridos (mmol/L)	1,48±0,10	1,60±0,15	0,515	1,69±0,07	1,71±0,09	0,868
Colesterol (mmol/L)	4,16±0,08	4,24±0,11	0,543	4,31±0,08	4,29±0,11	0,895
HDL (mmol/L)	1,11±0,03	1,12±0,05	0,838	1,06±0,2	1,04±0,03	0,667
LDL (mmol/L)	2,31±0,07	2,32±0,10	0,916	2,42±0,07	2,35±0,09	0,570
Proteína C-reactiva (nmol/L)	37,1±5,3	37,8±6,8	0,938	33,5±3,6	32,2±4,5	0,832
HbA1c (mmol/mol)	47,8±0,9	48,1±1,2	0,870	50,7±0,9	50,7±1,3	0,992
HbA1c (%)	6,53±0,08	6,55±0,11	0,870	6,79±0,08	6,79±0,12	0,992
Glucosa (mmol/L)	5,50± 0,09	5,59±0,12	0,561	6,58±0,14	6,47±0,20	0,649
Insulina (nmol/L)	64,4± 5,5	64,8±7,1	0,968	93,3±7,8	94,8±11,9	0,912
HOMA-IR	3,49±0,42	3,93±0,65	0,555	4,84±0,32	4,76±0,45	0,886
Índice de sensibilidad a la insulina	3,16±0,20	3,02±0,26	0,666	2,37±0,12	2,47±0,16	0,594
Índice insulínogénico	0,70±0,19	0,89±0,26	0,549	0,68±0,14	0,80±0,22	0,621
Índice de resistencia hepática a la insulina	1421±168	1616±263	0,512	1970±129	1943±182	0,904
Índice de resistencia a la insulina muscular(x10 ²)	1,93±0,22	1,74±0,29	0,583	2,20±0,25	2,23±0,35	0,920
“Disposition Index”	0,68±0,06	0,65±0,05	0,713	0,43±0,02	0,46±0,03	0,940

Nuestro estudio se llevó a cabo en 183 pacientes con DMT2 de reciente diagnóstico, de los cuales 110 contaban con disponibilidad de muestra fecal y no habían recibido tratamiento con antibióticos en los tres meses anteriores a la recogida de muestras. Los datos son la media±SEM. Respondedores: pacientes que revirtieron la DMT2 tras 5 años de seguimiento de la intervención dietética. Respondedores[†]: pacientes que revirtieron de la DMT2 tras 5 años de seguimiento de la intervención dietética con disponibilidad de muestra fecal. No respondedores[‡]: pacientes que permanecieron con DMT2 después de 5 años de seguimiento. No respondedores[†]: pacientes que permanecieron con DMT2 después de 5 años de seguimiento con disponibilidad de muestra fecal. Los valores *p* se calcularon mediante ANOVA de un factor. Valor *p* de género analizado mediante Chi-cuadrado. Diferencias significativas (*p*< 0,05).

2. Diferencias en la microbiota intestinal basal en función de la respuesta a la intervención dietética

Se utilizó el análisis LEfSe para identificar los filotipos y taxones de la microbiota intestinal con una mayor abundancia diferencial al inicio del estudio entre los grupos Respondedores y No respondedores. La microbiota intestinal basal en el grupo de pacientes Respondedores se caracterizó por la preponderancia del género *Ruminococcus* de la familia *Lachnospiraceae*. Por el contrario, la microbiota intestinal basal del grupo

No respondedores estaba enriquecida en la familia *Porphyromonadaceae* y el género *Parabacteroides* (Figura 19). Sin embargo, la riqueza y la diversidad bacteriana evaluadas por los principales índices de diversidad α fueron similares entre los grupos, y no se encontraron diferencias significativas (Tabla S3, Material suplementario de la publicación n°1).

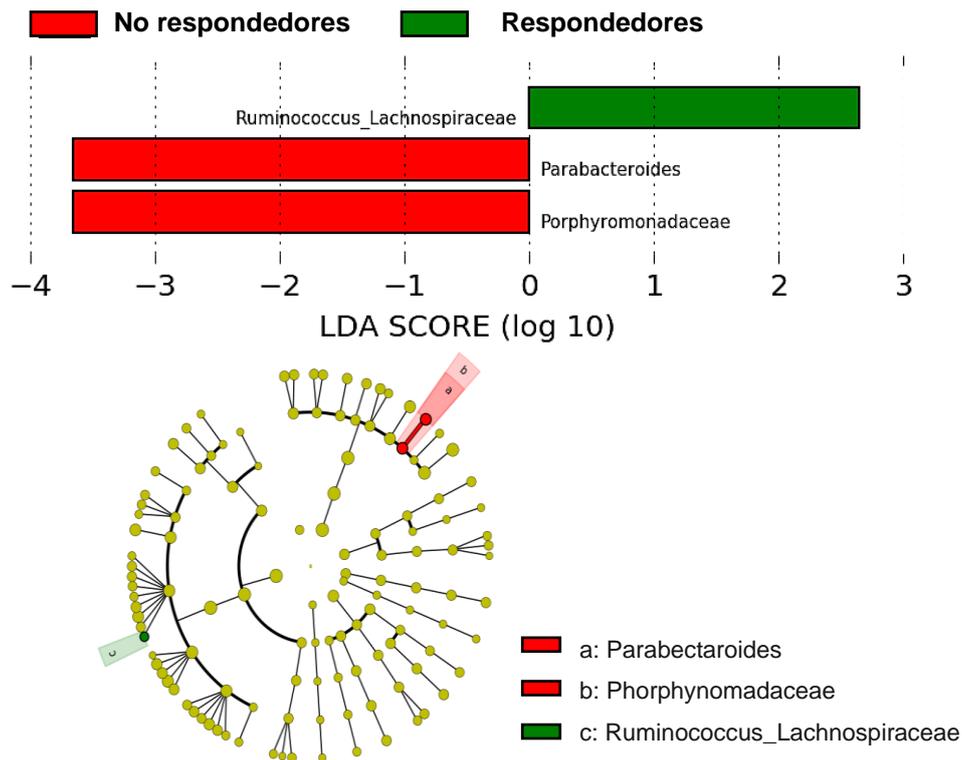
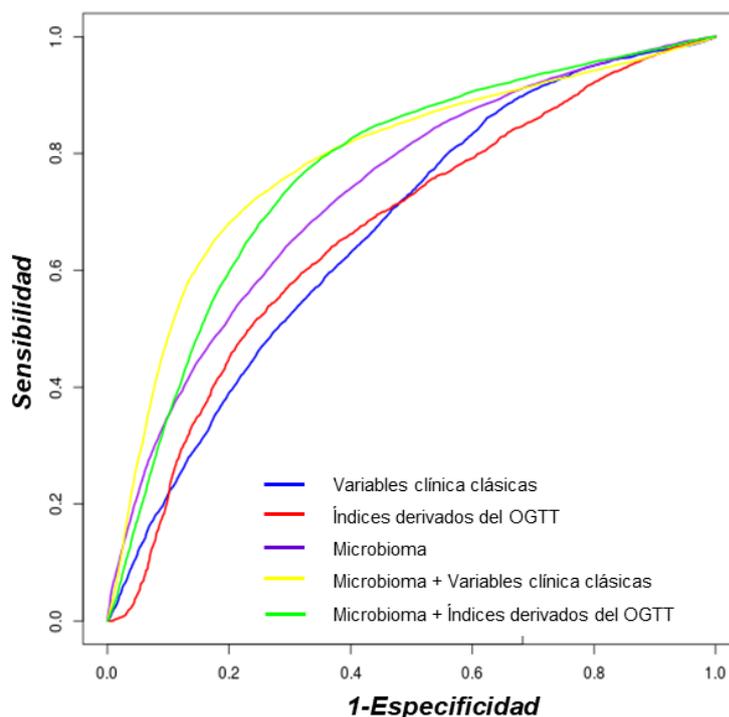


Figura 19. Taxones bacterianos con una abundancia diferencial al inicio del estudio en función de la respuesta a la intervención dietética identificados mediante el análisis LEfSe. Los taxones con mayor abundancia diferencial entre los grupos de estudio se representan en un gráfico de barras según la puntuación LDA (log 10) y en un cladograma taxonómico. Sólo se muestran los taxones con $p < 0,05$ y un umbral de puntuación LDA significativo > 2 . El grupo Respondedores (color verde) se caracterizó por mayor abundancia del género *Ruminococcus* de la familia *Lachnospiraceae*. El grupo de los No respondedores estaba enriquecida en la familia *Porphyromonadaceae* y el género *Parabacteroides* (color rojo). En el cladograma taxonómico, cada círculo concéntrico representa un nivel filogenético diferente. El orden desde el interior hacia el exterior son los niveles de filo, clase, orden, familia y género. Los taxones diferenciales se enumeran en el listado del lado derecho del cladograma.

3. Modelo predictivo “random forest” para la remisión de la DMT2 inducida mediante intervención dietética

Para evaluar el potencial de la composición de la microbiota intestinal como factor predictivo de la remisión de la DMT2, construimos varios modelos clasificadores “random forest” basados en los siguientes datos: (1) las variables clásicas conocidas como factores de riesgo para el desarrollo de la DMT2 (género, edad, IMC, perímetro de cintura, HDL, triglicéridos, HbA1c, actividad física, consumo dietético de frutas y verduras, uso de medicación antihipertensiva y antecedentes familiares de diabetes); (2) Los índices calculados a partir del OGTT (es decir, IGI, HOMA-IR, ISI, HIRI, DI y MISI), (3) el microbioma (composición bacteriana a nivel de género expresada como abundancia relativa), (4) variables clínicas junto con el microbioma, y (5) índices derivados del OGTT combinados con el microbioma.

Todos los modelos se evaluaron mediante el método de validación cruzada de 10-fold. La dieta y la intensidad del tratamiento con estatinas se incluyeron en los análisis como método de ajuste. Las variables clásicas asociadas al riesgo de DMT2 mostraron un AUC de $0,698 \pm 0,152$, que fue similar al AUC obtenido para los índices de sensibilidad a la insulina y función de la célula β derivados del OGTT (AUC = $0,682 \pm 0,156$), pero inferior al AUC obtenido para el microbioma (AUC = $0,762 \pm 0,148$). Además, la adición del microbioma a los índices derivados del OGTT aumentó el valor del AUC a $0,795 \pm 0,148$. No obstante, el AUC más alto se obtuvo con la adición del microbioma a las variables clásicas asociadas al riesgo de DMT2 (AUC = $0,822 \pm 0,135$). Este modelo logró una sensibilidad del 83% y una especificidad del 66% (**Figura 20**). Además, se repitió el análisis incluyendo fumador o no entre las variables clínicas clásicas y los resultados fueron concordantes con los anteriores, el AUC más elevado se obtuvo con la adición del microbioma a las variables clásicas asociadas al riesgo de DMT2 (**Figura S1**, Material suplementario de la publicación n°1).



	AUC	Sensibilidad	Especificidad	Exactitud	Coficiente Kappa
Variables clínica clásicas	0,698±0,152	0,67±0,19	0,60±0,25	0,64±0,14	0,26±0,28
Índices derivados del OGTT	0,682±0,156	0,65±0,19	0,64±0,20	0,65±0,12	0,29±0,23
Microbioma	0,762±0,148	0,72±0,17	0,64±0,21	0,69±0,14	0,36±0,28
Microbioma + Variables clínica clásicas	0,822±0,135	0,83±0,15	0,66±0,23	0,76±0,13	0,50±0,27
Microbioma + Índices derivados del OGTT	0,795±0,148	0,77±0,16	0,68±0,22	0,73±0,14	0,44±0,28

Figura 20. Modelos predictivos “random forest” para la remisión de la DMT2 inducida mediante intervención dietética. (A) Análisis de curvas ROC multivariante basado en los modelos de clasificación “random forest” construidos. Los datos se expresan como media ± desviación estándar (SD) de las curvas ROC promediadas de los modelos predictivos utilizando el método de validación cruzada. Las variables clásicas fueron los parámetros clínicos conocidos como factores de riesgo para el desarrollo de la DMT2: género, edad, IMC, perímetro de cintura, HDL, triglicéridos, HbA1c, actividad física, consumo de fruta y verdura en la dieta, uso de medicación antihipertensiva y antecedentes familiares de diabetes); índices derivados de la prueba de tolerancia oral a la glucosa (OGTT): índice de evaluación del modelo homeostático de resistencia a la insulina, índice “disposition index”, índice de resistencia hepática a la insulina, índice de sensibilidad a la insulina, índice de sensibilidad a la insulina muscular e índice insulinogénico. Los modelos se ajustaron por la dieta consumida (dieta LF o Med) y la intensidad del tratamiento con estatinas, incluyendo estas variables en todos los modelos. AUC, área bajo la curva ROC.

4. Evaluación basada en la microbiota intestinal de la probabilidad de la respuesta de remisión de la DMT2 inducida mediante intervención dietética

También analizamos el posible papel de la microbiota intestinal en la evaluación de la probabilidad de remisión de la DMT2 mediante intervención dietética a través de un análisis de regresión Cox. Para ello, construimos una escala de clasificación numérica de predicción de respuesta para los pacientes en función de su perfil de microbiota intestinal. Concretamente, se construyó a partir de los 10 taxones bacterianos con mayor importancia en el modelo de predicción basado en el microbioma, la cual fue determinada a través de la Disminución Media de la Precisión (**Figura 21**).

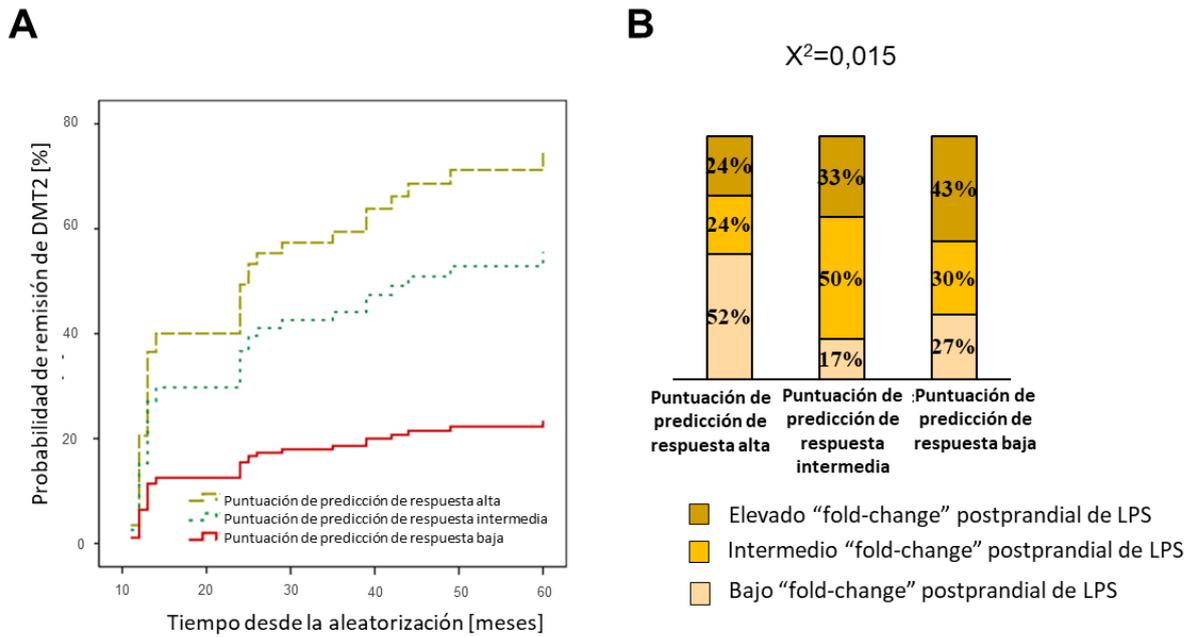


Figura 21. Valores de importancia de las variables del modelo predictivo de microbiota intestinal. El modelo de microbiota intestinal incluía todos los géneros presentes en la microbiota intestinal de los pacientes. Los valores de Importancia de la Variable están representados por la Disminución Media de la Precisión de los modelos cuando se eliminan estos taxones. Una mayor Disminución Media de la Precisión o longitud de las barras indica una mayor importancia de la variable. Los diez géneros más discriminantes se resaltan en un cuadrado.

A continuación, se evaluó mediante análisis de Cox la probabilidad de remisión de la DMT2 en función de la puntuación en la escala de clasificación numérica (o inglés “score”) creada a partir de la microbiota intestinal. Para lo cual, se clasificaron los pacientes en terciles (ascendentes) de la puntuación: T1, puntuación de predicción de respuesta baja; T2, puntuación de predicción de respuesta intermedia; T3, puntuación de predicción de respuesta alta. Observamos un cociente de riesgo o “Hazard ratio” (HR) de 2,372 (Intervalo de confianza (IC) del 95%: 1,04-5,42) del T2 en referencia al T1 y de 3,195 (IC del 95%: 1,37-7,48) del T3 con respecto al T1. Es decir, se observó que la probabilidad de regresar es 2,372 veces mayor de con una puntuación de predicción de respuesta intermedia y, 3,195 veces mayor con una puntuación de predicción de respuesta alta en comparación con una puntuación de predicción de respuesta baja (**Figura 22A**). Además, las características basales de los pacientes agrupados por los terciles de predicción de respuesta no mostraron diferencias, a excepción del DI ($p = 0,040$) (**Tabla S4**, Material suplementario de la publicación nº1).

5. Relación entre la puntuación de predicción de respuesta basada en la microbiota intestinal y el aumento postprandial de los niveles plasmáticos de LPS.

Se analizó la relación entre los grupos definidos por los terciles ascendentes de la puntuación de predicción de respuesta basada en la microbiota intestinal y los terciles del “fold-change” (cálculo de cambio o incremento) postprandial de los niveles plasmáticos de LPS mediante la prueba de Chi-cuadrado. Se observó una relación inversa entre la puntuación de predicción de respuesta y el aumento postprandial de LPS. Así, en el grupo de pacientes categorizados como puntuación de predicción de respuesta alta, encontramos un mayor porcentaje de pacientes con un bajo incremento postprandial de LPS. El grupo de puntuación de predicción de respuesta intermedia se caracterizó por un mayor porcentaje de pacientes con un aumento postprandial intermedio de LPS. Finalmente, el grupo de puntuación de predicción de respuesta baja mostró un mayor porcentaje de pacientes con un aumento postprandial alto de LPS ($\chi^2 = 0,015$) (**Figura 22B**).



		HR	IC 95%	
			Inferior	Superior
T1: Puntuación de predicción de respuesta baja (ref.)		1,00	-----	-----
T2: Puntuación de predicción de respuesta intermedia	<i>No ajustado</i>	2,195	0,986	4,888
	<i>Ajustado*</i>	2,372	1,039	5,415
	<i>Ajustado†</i>	2,604	1,069	6,344
T3: Puntuación de predicción de respuesta alta	<i>No ajustado</i>	2,089	0,931	4,688
	<i>Ajustado*</i>	3,195	1,365	7,481
	<i>Ajustado†</i>	2,604	1,069	6,344

Figura 22. Remisión de la DMT2 en función de la escala de clasificación numérica basada en la microbiota intestinal. (A) Probabilidad de remisión de la DMT2 mediante la intervención dietética (consumo de las dietas LF o Med) analizada con regresión Cox en función de la escala de clasificación numérica de predicción de respuesta basada en la microbiota intestinal. La escala de clasificación numérica de predicción de respuesta basada en la microbiota intestinal se construyó sumando la Disminución Media de la Precisión para los diez taxones bacterianos más discriminantes, con un valor positivo o negativo, según los terciles de protección o riesgo y desestimando los terciles con efecto neutro (añadidos como 0). Para ello, el papel perjudicial o beneficioso se determinó en función de una mayor abundancia media en el basal en los pacientes No Respondedores o en los Respondedores, respectivamente. De este modo, para un género perjudicial: el tercil 1 se puntuó como 1 (protector), el tercil 2 como 0 (efecto neutro) y el tercil 3 como -1 (riesgo), y lo contrario para un género beneficioso: el tercil 1 como -1 (riesgo), el tercil 2 como 0 (efecto neutro) y el tercil 3 como 1 (protector). Los datos representan los valores de la puntuación de predicción de respuesta en la escala construida por terciles (ascendente), T1: Puntuación de predicción de respuesta baja (línea sólida); T2: Puntuación de predicción de respuesta intermedia (guión corto); T3: Puntuación de predicción de respuesta alta (guión largo). *El modelo se ajustó por edad, IMC, género, dieta, HDL, triglicéridos e intensidad del tratamiento con estatinas. † Este modelo se ajustó por las variables anteriores, así como por el tabaquismo, los antecedentes de infarto de miocardio, los antecedentes de accidente cerebrovascular o ataque isquémico transitorio, los antecedentes de enfermedad vascular

periférica, la hipertensión, los antecedentes de injerto de derivación arterial coronaria y los antecedentes de intervención coronaria percutánea. (B) Relación entre la escala de clasificación numérica de predicción de respuesta basada en la microbiota intestinal y el aumento postprandial de los niveles plasmáticos de LPS. La relación entre los grupos definidos en función de los tertiles ascendentes de la puntuación en la escala de predicción de respuesta basada en la microbiota intestinal y los tertiles del “fold-change” (medida de cambio o incremento) postprandial de los niveles plasmáticos de LPS se analizó mediante un análisis de Chi-cuadrado.

3. DISCUSIÓN-CAPÍTULO 1

El capítulo o bloque experimental de tesis correspondiente con la publicación nº1, llevado a cabo en pacientes con DMT2 de reciente diagnóstico y CHD, demostró que un perfil previo de microbiota intestinal mejora la identificación de los pacientes que experimentaron una remisión de la DMT2 mediante una intervención dietética con dietas saludables durante 5 años de seguimiento (Respondedores) y, los que no respondieron a la intervención dietética (No-respondedores), permaneciendo diabéticos. Además, una escala de clasificación numérica (en inglés “score”) de predicción de respuesta basada en la microbiota intestinal, que incluía los diez taxones bacterianos altamente discriminantes entre los pacientes Respondedores y los No Respondedores, se asoció con la probabilidad de remisión. Asimismo, la asociación inversa encontrada entre la puntuación en esta escala y el aumento postprandial de los niveles plasmáticos de LPS proporciona más solidez al papel de la microbiota intestinal como factor predictivo de la remisión de DMT2.

La evidencia actual sugiere que la respuesta metabólica del huésped a una intervención nutricional o dietética depende de la composición de la microbiota intestinal [280, 295]. En nuestro estudio, el análisis comparativo entre los grupos identificó que la microbiota intestinal los pacientes Respondedores que lograron la remisión de DMT2 inducida mediante intervención dietética estaba caracterizada por un enriquecimiento de *Ruminococcus* (familia *Lachnospiraceae*). En relación con esto, existen evidencias previas que sustentan una asociación positiva de *Ruminococcus* (familia *Lachnospiraceae*) con enfermedades como la DMT2 [159], así como con la enfermedad inflamatoria intestinal y la artritis [296-298], probablemente porque se ha demostrado que produce un polisacárido inflamatorio que induce la respuesta inflamatoria y la producción de citoquinas [299]. En cuanto a la diabetes, la inflamación crónica de bajo grado contribuye a la resistencia a la insulina, lo que a su vez conduce a la disfunción progresiva de las células β , siendo los contribuyentes claves en la fisiopatología de la DMT2 [300].

Además de haber sido reportada previamente la asociación positiva de este género con la DMT2, debido a su incrementada abundancia encontrada en pacientes diabéticos y prediabéticos [155, 301], también se ha asociado este género con la reversibilidad del estado glucémico alterado y la remisión de la diabetes. Un estudio reciente identificó que los pacientes que lograron la remisión de la DMT2 mediante cirugía de bypass gástrico

en Y de Roux tenían una mayor abundancia de este género antes de la cirugía, mientras que la microbiota intestinal de los pacientes en los que persistió la DMT2 tras la cirugía bariátrica no se caracterizaba por este enriquecimiento [302]. Acordemente, estos hallazgos previos, junto con los reportados en nuestro estudio, sugieren que una mayor abundancia del género *Ruminococcus* perteneciente a la familia *Lachnospiraceae* podría representar un estado de diabetes con una alta flexibilidad fenotípica. De acuerdo con esto, se ha reportado que la abundancia de este género en los pacientes con DMT2 puede restablecerse con una dieta macrobiótica [301]. Además, la abundancia de este género está correlacionada negativamente con los niveles de ácido indolopropiónico. Este compuesto es un antioxidante asociado a un menor riesgo de DMT2, que está estrechamente relacionado con la ingesta de fibra [303], lo que también apoya las interacciones de este género con la dieta y la DMT2 evidenciadas en esta tesis.

En cuanto al enriquecimiento de *Parabacteroides* en los pacientes No Respondedores, este género se ha asociado previamente con mayores niveles de glucosa durante la prueba OGTT [304] y de inflamación, la cual favorece la resistencia a la insulina [305]. Probablemente, el papel perjudicial que este género bacteriano puede ejercer aumentando la permeabilidad del epitelio intestinal y facilitando la translocación de LPS a la circulación sistémica [306], pudiera contribuir a promover la endotoxemia metabólica y desencadenar así, la inflamación crónica de bajo grado que promueve la resistencia a la insulina [102]. En conjunto, esto respalda nuestros resultados pues los pacientes con una mayor probabilidad de remisión de la diabetes mostraron un menor aumento postprandial del LPS circulantes.

En nuestro estudio, demostramos que la adición de los datos de microbiota intestinal a las variables clásicas asociadas al riesgo de diabetes [57, 307] mejoraba nuestra capacidad para diferenciar entre aquellos individuos respondedores que se beneficiarían del consumo de dos modelos dietéticos (dieta LF o Med) y aquellos cuya diabetes permanecería a pesar de la intervención dietética, con una sensibilidad del 83% y una especificidad del 66%.

Asimismo, cada vez hay más evidencias que apoyan una estrecha relación entre la microbiota intestinal y el desarrollo de DMT2 [158, 308]. En nuestro estudio, cinco de los diez géneros más importantes del modelo predictivo basado en la microbiota intestinal estaban relacionados con la homeostasis de la glucosa y/o la obesidad. De hecho,

Atopobium, que fue el género más importante en nuestro modelo y cuya abundancia fue mayor en el grupo Respondedores, se ha encontrado previamente reducida en los pacientes diabéticos en comparación con sujetos no diabéticos [309], y se ha asociado con una disminución del 66% del riesgo de diabetes [310]. Además, la abundancia de dos taxones bacterianos potencialmente perjudiciales, *Parabacteroides* y *Fusobacterium*, los cuales tenían una menor abundancia en el grupo Respondedores, han sido asociados con niveles altos de glucosa [304] y resistencia a la insulina [311], respectivamente. Además, una mayor abundancia de *Anaerotruncus* [312, 313] y una menor abundancia de *Oscillospira* [314, 315] se han relacionado con la obesidad. Esto se encuentra en consonancia con la menor y mayor abundancia encontrada respectivamente en los Respondedores en comparación con los No Respondedores en nuestro estudio.

El papel de la microbiota intestinal como factor predictivo de los individuos Respondedores también se encontró respaldado por la evaluación de la probabilidad de remisión de la DMT2 dada por una escala de clasificación numérica de respuesta basada en la microbiota intestinal, la cual fue construida con los diez taxones bacterianos más importantes del modelo. De hecho, cuando se clasificaron los pacientes por terciles ascendentes de la puntuación obtenida en dicha escala basada en la microbiota, desaparecieron las diferencias basales entre los grupos Respondedores y No respondedores respecto a las características clínicas, con la excepción del “Disposition Index” (DI). Este índice indica la funcionalidad de la células β , por tanto, este hallazgo es muy relevante, ya que se ha observado previamente que la capacidad de las células β para recuperar la secreción de insulina estimulada por la glucosa es un factor clave en la remisión de la DMT2 [80]. Estos resultados sugieren que el perfil de la microbiota intestinal está asociado con la funcionalidad de las células β y, a su vez, con la pérdida de flexibilidad fenotípica. Por tanto, el papel de la microbiota intestinal como factor predictivo de los pacientes respondedores podría basarse en su potencial para reflejar un punto de no retorno de la funcionalidad de las células β para recuperar la capacidad de producción de insulina. De hecho, dos de los taxones bacterianos incluidos en la escala de clasificación numérica, *Phascolarctobacterium* y *Oscillospira*, los cuales fueron más abundantes en el grupo Respondedores, pueden estar relacionados con la función de las células β a través de la producción de SCFAs, propionato [230] y butirato [316, 317] respectivamente. Estos últimos, inducen la secreción de hormonas incretinas, como GLP-1, al unirse a los receptores GPCRs de las células L, lo que a su vez conduce a la

promoción de la secreción de insulina y la proliferación de las células β [204, 318]. Además, se ha demostrado que estos dos géneros están inversamente correlacionados con la expresión de biomarcadores inflamatorios, y directamente correlacionados con la expresión de Akt y PI3K en el tejido del páncreas de ratas diabéticas [319], estando estas dos últimas vías implicadas en la promoción de la secreción de insulina y la proliferación de las células β [320].

Además, la composición de la microbiota intestinal puede influir en la permeabilidad intestinal a través de la producción de SCFAs, pues estos regulan la expresión de proteínas relacionadas con las uniones TJ en los colonocitos [211]. De hecho, la absorción de componentes bacterianos proinflamatorios a través de la barrera intestinal, como el LPS se ha relacionado con los mecanismos patogénicos que promueven el desarrollo de la obesidad y la DMT2 [164]. Además, varios estudios han demostrado que los niveles circulantes de LPS postprandiales están exacerbados en los pacientes diabéticos, y su aumento postprandial se ha asociado a un mayor riesgo de desarrollo DMT2 [176, 177]. De hecho, el presente estudio respalda aún más estas asociaciones basándose en la relación inversa encontrada entre el aumento de LPS postprandial y la probabilidad de regresión; en otras palabras, el grupo con una puntuación de predicción de respuesta baja se caracterizó por un mayor porcentaje de pacientes con un mayor aumento de LPS posprandial y viceversa.

No obstante, los resultados obtenidos tienen ciertas limitaciones. En particular, la remisión de DMT2 no era el objetivo de evaluación principal del ensayo CORDIOPREV, sino que fue un análisis secundario realizado en el subgrupo de pacientes con CHD a los que se les había diagnosticado DMT2 al inicio del estudio, y por tanto sin tratamiento para la diabetes, lo que limita nuestros resultados a los individuos con estas características. No obstante, la predicción de remisión en pacientes con CHD es esencial, ya que los pacientes CHD y DMT2 tienen un riesgo considerablemente mayor de desarrollar un nuevo evento cardiovascular que los que no padecen DMT2 [282]. Es necesario la validación en una cohorte sin CHD para confirmar inequívocamente y extender nuestros hallazgos a la población general.

VII. CAPÍTULO 2. *Aborda: Objetivo específico 2.*

Estudio del potencial de la composición de la microbiota intestinal inicial como factor predictivo asociado al desarrollo de la DMT2: Estudio CORDIOPREV.

Publicación n°2: Vals-Delgado C. et al. “An altered microbiota pattern precedes Type 2 diabetes mellitus development: from the CORDIOPREV study”. *J Adv Res.* (2022).

1. MATERIALES Y MÉTODOS- CAPÍTULO 2

1. Población de estudio

Este estudio se realizó en el contexto del estudio CORDIOPREV (Clinicaltrials.gov NTC00924937), un ensayo clínico en el que participaron 1002 pacientes con CHD. Se incluyeron todos los pacientes no diabéticos al inicio del estudio CORDIOPREV (n = 462), 107 pacientes fueron diagnosticados de DM2 tras una mediana de 60 meses de seguimiento (CORDIOPREV-DIAB). El diagnóstico se evaluó según los criterios de la ADA [10]. De los pacientes incluidos en este estudio durante el seguimiento, 17 pacientes fallecieron y 7 pacientes abandonaron sin ser diagnosticados de diabetes. Se dispuso de muestras fecales al inicio del estudio para un total de 273 pacientes, los cuales no habían recibido tratamiento con antibióticos en los 3 meses anteriores a la recogida de la muestra; entre ellos, 64 pacientes desarrollaron DM2 durante el seguimiento (grupo Incident-DIAB). Las **Tablas S1** y **S2** (véase Material suplementario de la publicación nº2) muestran las características basales de los grupos.

2. Test OGTT

Se realizó una prueba OGTT al inicio del estudio y cada año durante el periodo de seguimiento para determinar los niveles de glucosa e insulina en plasma. Después de 12h de ayuno, se tomaron muestras de sangre antes de la prueba y en intervalos regulares de 30 min durante 2 h después de tomar la disolución de glucosa (una dilución de 75 g de glucosa anhidra en 250ml de agua) (Trutol 75; Custom Laboratories, Baltimore, MD, EE.UU.). Además, se calcularon índices derivados del OGTT: HOMA-IR, ISI, IGI, HIRI, MISI y DI de la forma descrita anteriormente [288].

3. Análisis de la microbiota intestinal

La extracción del ADN de las muestras fecales que se tomaron en el basal se realizó empleando QIAamp DNASTool Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania) conforme a las instrucciones del fabricante. La secuenciación del gen 16S ARNr realizada utiliza la región hipervariable V4, esta fue amplificada utilizando los cebadores F515 (5'- TAT GGT AAT TGT GTG CCA GCM GCC GCG GTA A-3') y R806 (5'- AGT CAG TCA GCC GGA CTA CHV GGG TWT CTA AT-3') para generar una librería de amplificación [321]. Los cebadores específicos anteriores estaban combinados con una secuencia

adaptadores de Illumina e índices de muestra con una secuencia clave de 8 nucleótidos única [321]. La PCR de amplificación se realizó utilizando Phusion High-Fidelity PCR Master mix (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) con 100 pg de ADN molde. El programa de amplificación realizado fue una desnaturalización inicial durante 30s a 98°C; 30 ciclos de amplificación (10s a 98°C, 30s a 55°C y 30s a 72°C); y una elongación final de 5 min a 72°C. Los productos de la PCR se examinaron con Fragment Analyzer (Advanced Analytical Technologies Inc., Ankeny, IA, USA) para estimar la concentración de ADN. Las librerías de amplicones fueron agrupadas en cantidades equimolares y se purificaron utilizando en un primer paso el kit de extracción en gel QIAquick (Qiagen, Valencia, CA, EE.UU.) y luego con las perlas magnéticas Edadncourt AMPure (Beckman Coulter, Brea, CA, EE.UU.). La concentración de ADN del pool se calculó en un espectrofluorímetro aplicando el kit de ensayo de ADNcd Quant-iT PicoGreen (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). Los amplicones purificados con secuencias de identificación “barcode” obtenidas se secuenciaron con la plataforma Illumina MiSeq (Illumina Technologies, San Diego, CA, EE.UU.) utilizando la configuración 2x250 ciclos y secuenciación tipo pair-end.

Los datos de secuenciación se procesaron y analizaron con la versión Mothur1.36.1. La identificación taxonómica se realizó empleando Ribosomal Database Project (RDP) y la base de datos de ARNr SILVA hasta el nivel de género. Para excluir cualquier taxón bacteriano que no se detectara en la mayoría de las muestras, se estableció un límite de exclusión. Sólo los taxones bacterianos que contenían lecturas de secuencias en al menos el 75% de las muestras totales fueron considerados.

4. Creación de modelos de predicción

Se empleó el clasificador de machine learning “random forest” mediante análisis “hold-out” para la creación de los modelos de predicción haciendo uso del script del paquete caret en R. Cada uno de los modelos se entrenó con el 70% de los datos y el 30% restante se utilizó como conjunto de datos de prueba (no empleados en la creación del modelo) para evitar el sobreajuste. Otros métodos de aprendizaje automático como Support Vector Machine y las redes neuronales también se probaron, arrojando peores resultados que el clasificador “random forest”. Además, para obtener curvas más precisas y evaluar el rendimiento de los modelos en datos no vistos, utilizamos una validación cruzada de 10-fold. Este método consiste en diez divisiones diferentes de entrenamiento

y validación, de modo que todos los datos sean utilizados una sola vez en el conjunto de validación. Las curvas de error de la validación cruzada (media de las diez curvas obtenidas en los conjuntos de validación) y el rendimiento de los modelos fueron promediados. El valor predictivo de cada variable (géneros bacterianos) en los modelos “random forest” se calculó mediante la Disminución Media de la Precisión. El rendimiento de los modelos se evaluó además mediante el área bajo la curva (AUC) en el conjunto de datos de prueba no usados para la creación del modelo (30% de los datos). Se utilizó el paquete pROC R para calcular las curvas ROC.

5. Creación de una escala de clasificación numérica para estimar el riesgo basada en la microbiota intestinal

Creamos una escala de clasificación numérica (en inglés “score”) para estimar el riesgo de DMT2 basada en el perfil de la microbiota intestinal de los pacientes. Concretamente, se emplearon los diez taxones bacterianos con mayor importancia en el modelo de predicción construido con los datos del microbioma. El poder predictivo se evaluó mediante los valores de Disminución Media de la Precisión. En primer lugar, se categorizó a los pacientes en función de la abundancia de estos taxones bacterianos en terciles ascendentes. A continuación, el papel perjudicial o beneficioso de cada taxón se estableció de acuerdo con una mayor abundancia media basal en el grupo Incident-DIAB o Non-DIAB, respectivamente. De este modo, para un género perjudicial: el tercil 1 se puntuó como -1 (protector), el tercil 2 como 0 (efecto neutro) y tercil 3 como 1 (riesgo), y lo contrario para un género beneficioso: tercil 1 como 1 (riesgo), tercil 2 como 0 (efecto neutro) y tercil 3 como -1 (protector). La puntuación se calculó sumando la Disminución Media de la Precisión para cada taxón bacteriano, con un valor positivo o negativo, según los terciles de riesgo o de protectores anteriores y descartándose los terciles con efecto neutro (añadidos como 0).

6. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó con el software estadístico SPSS (IBM SPSS Statistics versión 21.0). En todos los análisis estadísticos, los valores de $p \leq 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos. La prueba de Kolmogorov-Smirnov fue utilizada para evaluar si las variables siguen una distribución normal. Se realizó un ANOVA de un factor para calcular las diferencias estadísticas de las variables

antropométricas y metabólicas cuantitativas entre los grupos, mientras que los datos cualitativos se analizaron mediante el análisis de Chi-cuadrado. El análisis LEfSe fue usado para determinar los taxones bacterianos con mayor abundancia diferencial entre los grupos empleando los parámetros por defecto [293]. Además, se realizó un análisis de regresión de Cox el cual fue ejecutado incorporando como covariables: edad, género, IMC, dieta, HDL, triglicéridos e intensidad del tratamiento con estatinas definido por la AHA. También, se realizó un nomograma con R basado en los resultados de un modelo de supervivencia de Weibull ajustado con la función *psm* empleando el paquete “survival” [322]. La relación entre la escala de clasificación numérica basada en la microbiota intestinal, así como de manera individualizada de los diez taxones bacterianos con mayor poder predictivo, con los índices derivado de la prueba OGTT se analizó mediante ANOVA para medidas repetidas.

2. RESULTADOS- CAPÍTULO 2

1. Características basales de la población de estudio

Los valores basales de peso corporal, perímetro de cintura, HbA1c, glucosa, IMC, insulina, HIRI y HOMA-IR fueron mayores, mientras que los de DI, ISI e IGI fueron menores en el grupo de pacientes que desarrolló diabetes en el periodo de seguimiento (Incident-DIAB), en comparación con el grupo de pacientes que permaneció sin diabetes (Non-DIAB) ($p < 0,05$). No se encontraron diferencias en cuanto a la edad o el género entre los grupos (**Tabla S1**, véase Material suplementario de la publicación n°2). Además, la población de pacientes con muestras fecales disponibles al inicio del estudio y que no habían recibido tratamiento con antibióticos en los 3 meses anteriores a la recogida de muestras, era representativa de la población total del estudio de incidencia de DMT2, CORDIOPREV-DIAB [177]. (**Tabla S2**, véase Material suplementario de la publicación n°2).

2. Diferencias en la composición de la microbiota intestinal entre los grupos de estudio

Se ejecutó el análisis LEfSe para determinar los filotipos y los taxones de la microbiota intestinal con mayor abundancia diferencial al inicio del estudio entre el grupo Incident-DIAB y el grupo Non-DIAB. La microbiota intestinal basal en el grupo Incident-DIAB se caracterizó por la preponderancia de las clases *Negativicutes* y *Bacilli* así como de los órdenes *Selenomonadales* y *Lactobacillales*. Respecto al nivel taxonómico familia, se caracterizó por una mayor abundancia de *Prevotellaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Veillonellaceae*, *Streptococcaceae*, *Actinomycetaceae* y *Oxalobacteraceae*, así como en cuanto a géneros por *Prevotella*, *Granulicatella*, *Streptococcus*, un género no clasificado de la familia *Acidaminococcaceae*, *Sutterella*, *Actinomyces* y *Paraprevotella*. En cambio, la microbiota intestinal basal en el grupo Non-DIAB estaba enriquecida en *Actinobacterias* a nivel de filo y clase, y se caracterizó también por un predominio de las familias *Clostridiaceae*, *Porphyromonadaceae* y *Ruminococcaceae*. Además, en términos de género se caracterizó por una mayor abundancia de *Odoribacter*, *Butyricimonas*, *Sporobacter* y *Barnesiella*, *Parabacteroides*, así como un género desconocido de la familia *Ruminococcaceae* (**Figura 23**).

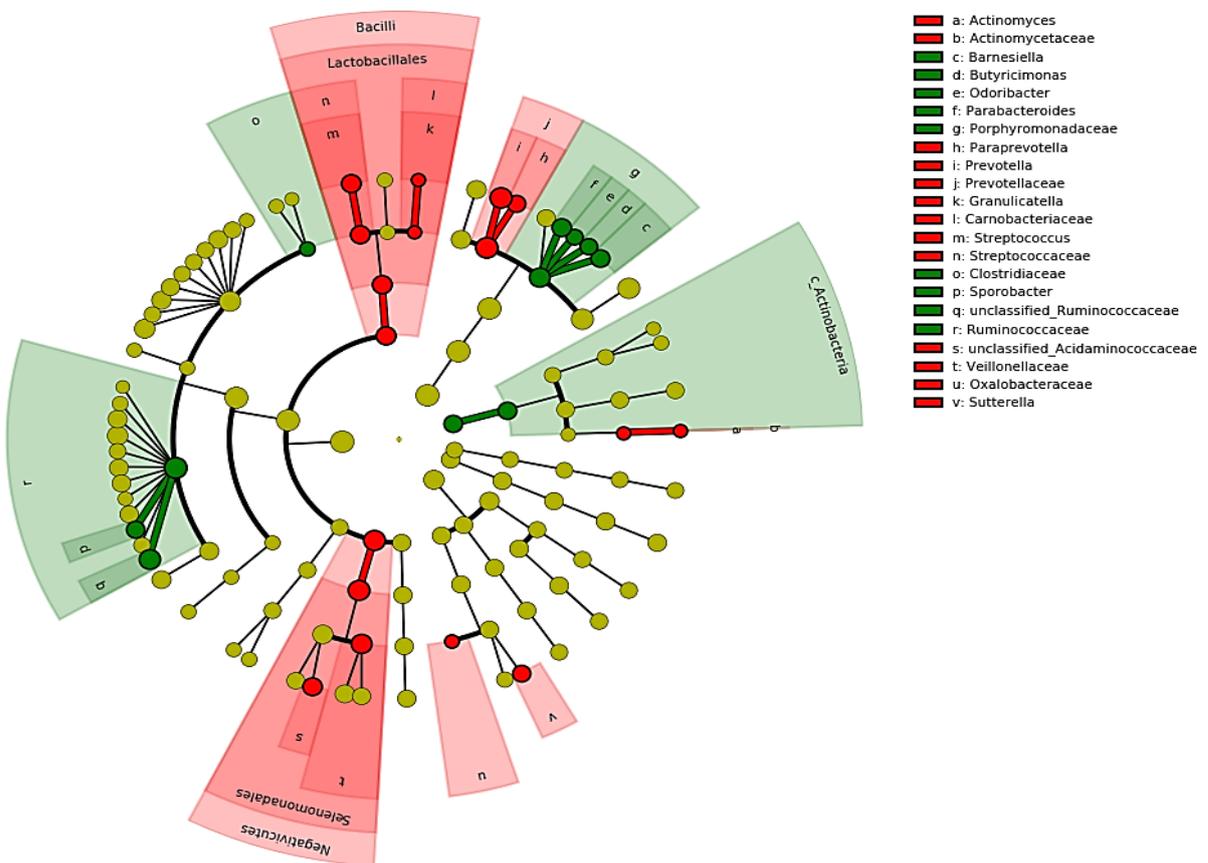
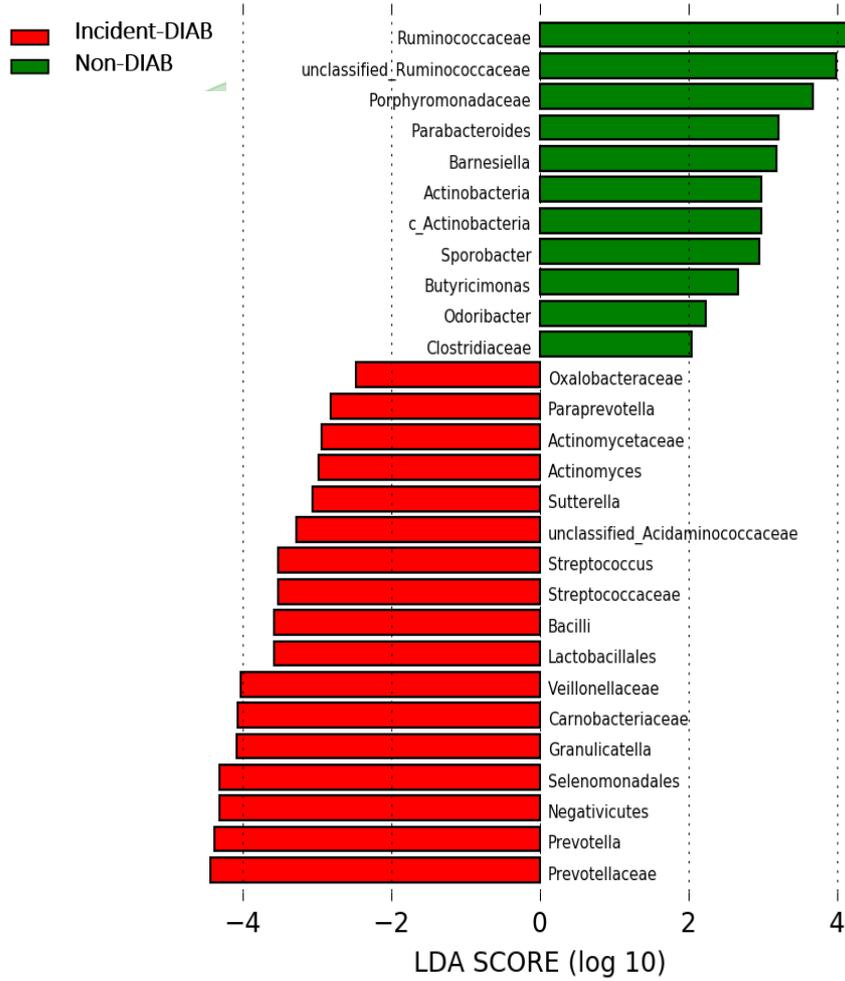


Figura 23. Diferencias en la microbiota intestinal identificadas mediante el análisis LEfSe. Los taxones con mayor abundancia diferencial entre los grupos de estudio se representan en un gráfico de barras según la puntuación LDA (log 10), que es un parámetro de estimación del tamaño del efecto, y en un cladograma taxonómico. Sólo se muestran los taxones que cumplen un umbral de $p < 0,05$ y una puntuación LDA significativa >2 . Los colores representan el grupo en el que el taxón indicado es más abundante en comparación con el otro grupo. En el cladograma taxonómico, cada círculo concéntrico representa un nivel filogenético diferente. El orden desde el interior hacia el exterior son los niveles de filo, clase, orden, familia y género. Los taxones diferenciales se enumeran en el lado derecho del cladograma. *c_Actinobacteria*: Clase Actinobacteria.

Sin embargo, la riqueza y la diversidad bacteriana evaluadas por los principales índices de diversidad fueron similares entre los grupos (media \pm SD en el grupo Incident-DIAB y en el grupo Non-DIAB de Chao1: $164,6 \pm 23,26$ y $162,6 \pm 23,86$ respectivamente, $p = 0,94$; Simpson: $0,926 \pm 0,01$ y $0,928 \pm 0,01$, respectivamente, $p = 0,63$; Shannon $3,12 \pm 0,22$ y $3,14 \pm 0,20$, respectivamente, $p = 0,71$).

3. Modelo predictivo “random forest” para el desarrollo de la DMT2

Se crearon varios modelos clasificadores “random forest” basados en los siguientes datos: (1) variables clínicas (variables comprendidas en las puntuaciones de riesgo del test FINDRISC y de la ADA): IMC, perímetro de cintura, uso de medicación antihipertensiva, edad, consumo de fruta y verduras, actividad física, antecedentes familiares de diabetes, antecedentes de diabetes gestacional, antecedentes de hiperglucemia (es decir, si al participante se le ha determinado alguna vez que tiene la glucosa en sangre alta en una prueba de salud), además de HDL, triglicéridos y HbA1c), (2) Los índices calculados a partir de la prueba OGTT (es decir, IGI, HOMA-IR, ISI, HIRI, DI y MISI), (3) el microbioma (composición bacteriana a nivel de género expresada como abundancia relativa), (4) variables clínicas junto con el microbioma y (5) índices derivados de la prueba OGTT combinados con el microbioma.

En primer lugar, ejecutamos todos los modelos en un conjunto de datos de entrenamiento que representaba el 70% de los pacientes (seleccionados aleatoriamente). Los modelos se ejecutaron con el método validación cruzada 10-fold para evaluar la precisión predictiva y el rendimiento de la generalización del modelo. La dieta y la intensidad del tratamiento con estatinas se incluyeron en los análisis (**Tabla 5A** y **Figura 24A**). A continuación, se realizó la validación de los modelos para confirmar los resultados y descartar la posibilidad de sobreajuste de los modelos. Esta validación se realizó en el conjunto de datos de prueba, el 30% de los pacientes no incluidos en el conjunto de entrenamiento ($n = 82$; 19 casos incidentes) (**Tabla 5B** y **Figura 24B**).

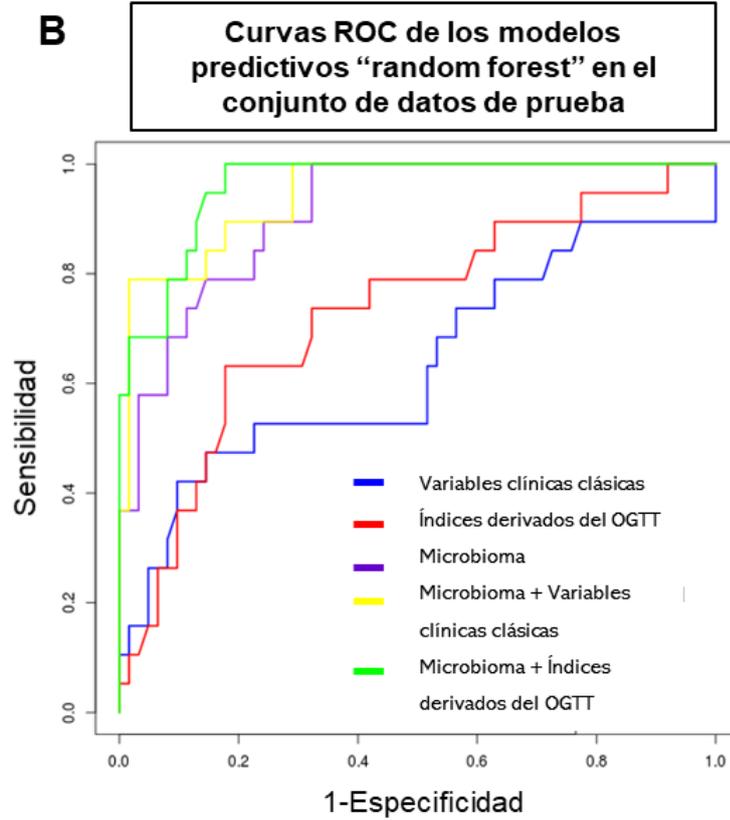
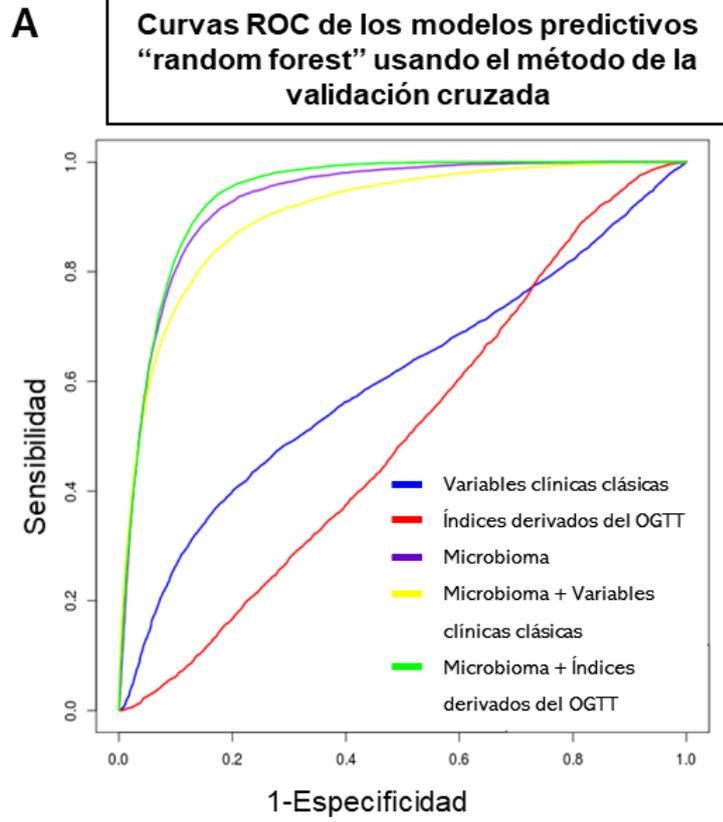


Figura 24. Modelos de curva ROC multivariantes construidos a partir del algoritmo “random forest”. (A) Curvas ROC de los modelos construidos mediante el método de validación cruzada 10-fold en el conjunto de datos de entrenamiento que representaba el 70% del total de pacientes. (B) Curvas ROC de los modelos obtenidos en la validación realizada en un conjunto de datos de prueba compuesto por pacientes no utilizados para construir los modelos (30% de pacientes restantes no incluidos en el conjunto de datos de entrenamiento). Variables clínicas clásicas: variables clínicas incluidas en las puntuaciones del test FINDRISC y de la ADA: edad, IMC, perímetro de cintura, actividad física, consumo de fruta y verdura en la dieta, uso de medicación antihipertensiva, antecedentes de hiperglucemia, antecedentes familiares de diabetes, diabetes gestacional, además de HDL, triglicéridos y HbA1c; Índices: Índices derivados de la prueba OGTT (HOMA-IR, índice de sensibilidad a la insulina; ISI, índice insulinogénico; IGI, índice de resistencia a la insulina hepática; HIRI, índice de sensibilidad a la insulina muscular; MISI y “disposition index”; DI). Los modelos se ajustaron por dieta e intensidad del tratamiento con estatinas incluyendo estas variables en todos los modelos.

Tabla 5. Análisis ROC de los modelos de clasificación “random forest”. (A) Análisis ROC realizado con el método de validación cruzada. (B) Análisis ROC realizado en el conjunto de datos de prueba.

A

	AUC	Sensibilidad	Especificidad	Exactitud	Coefficiente Kappa
VARIABLES CLÍNICAS CLÁSICAS	0,614 (0,139)	0,92 (0,07)	0,24 (0,19)	0,758 (0,068)	0,178 (0,225)
Índices derivados del OGTT	0,511 (0,151)	0,67 (0,13)	0,30 (0,22)	0,586 (0,114)	-0,021 (0,224)
Microbioma	0,952 (0,048)	0,94 (0,07)	0,77 (0,18)	0,896 (0,064)	0,707 (0,178)
Microbioma + Variables clínicas clásicas	0,925 (0,075)	0,92 (0,07)	0,72 (0,24)	0,874 (0,078)	0,637 (0,238)
Microbioma + Índices derivados del OGTT	0,958 (0,038)	0,91 (0,07)	0,89 (0,15)	0,905 (0,060)	0,753 (0,154)

B

	AUC	IC 95%	Sensibilidad	Especificidad	Exactitud	Coefficiente Kappa
VARIABLES CLÍNICAS CLÁSICAS	0,632	0,467-0,797	0,95	0,26	0,790	0,269
Índices derivados del OGTT	0,729	0,593-0,866	0,81	0,63	0,765	0,401
Microbioma	0,913	0,850-0,976	0,92	0,58	0,840	0,527
Microbioma + Variables clínicas clásicas	0,946	0,895-0,997	0,95	0,79	0,914	0,755
Microbioma + Índices derivados del OGTT	0,961	0,924-0,997	0,92	0,79	0,889	0,696

Los datos se expresan como media (SD). Los modelos se ajustaron en función de la dieta y la intensidad del tratamiento con estatinas. Variables clínicas (variables incluidas en las puntuaciones FINDRISC y ADA: IMC, perímetro de la cintura, consumo dietético de frutas y verduras, edad, uso de medicación antihipertensiva, antecedentes familiares de diabetes, antecedentes de hiperglucemia, actividad física, diabetes gestacional, además de HDL, triglicéridos y HbA1c); índices derivados del OGTT: Índices derivados de la prueba OGTT (HOMA-IR, índice de sensibilidad a la insulina; ISI, índice insulinogénico; IGI, índice de resistencia hepática a la insulina; HIRI, índice de sensibilidad a la insulina muscular; MISI y “disposition index”; DI). AUC: área bajo la curva en el análisis ROC; IC: intervalo de confianza.

El modelo construido con las variables clínicas clásicas mostró un AUC de 0,632, es decir, inferior al AUC obtenido para los índices derivados de la prueba OGTT (AUC = 0,729), y el microbioma (AUC = 0,913). Además, el modelo basado en la combinación

de variables clínicas clásicas con el microbioma logró un AUC de 0,946. El AUC alcanzó 0,961 cuando los índices derivados de la prueba OGTT se juntaron con los datos del microbioma. El aumento del AUC observado cuando se adicionó el microbioma a las variables clínicas construyendo un modelo conjunto se evaluó mediante la prueba de Venkatrama y la prueba de DeLong, mostrándose una diferencia significativa del AUC ($p < 0,001$). También observamos que el modelo que combinaba las variables clínicas clásicas y el microbioma obtuvo una sensibilidad del 95% y una especificidad del 79% en el conjunto de datos de la prueba, mientras que el modelo basado exclusivamente en las variables clínicas clásicas mostró una sensibilidad del 95%, pero una especificidad del 26%.

Cuando los modelos incluyeron todos los pacientes con muestras fecales disponibles sin excluir a los que tenían alguna prescripción de antibióticos en los tres meses anteriores a la recogida de muestras fecal inicial, los resultados fueron consistentes con los obtenidos anteriormente (**Tabla S3**, Material suplementario de la publicación n°2).

4. Evaluación del riesgo de desarrollo de la DMT2 basada en la microbiota intestinal

También analizamos la utilidad potencial de la microbiota intestinal para evaluar el riesgo de desarrollo de DMT2 mediante un análisis de regresión Cox. En primer lugar, seleccionamos los diez taxones bacterianos más discriminantes mediante la Disminución Media de la Precisión (**Figura 25**). A continuación, clasificamos a los pacientes por terciles ascendentes según la abundancia de cada género: T1, baja abundancia; T2, abundancia intermedia; T3, alta abundancia. Cuando calculamos el análisis de regresión de Cox para cada uno de los diez géneros, observamos que una mayor abundancia de *Granulicatella* y *Prevotella* estaba asociado a un mayor riesgo de desarrollar diabetes [HR no ajustado T1 vs. T3: 2,310 y 1,844, IC 95%: 1,278-4,175 y 1,001-3,395, respectivamente; HR ajustado T1 vs. T3: 1,963 y 2,147, IC 95%: 1,073-3,593 y 1,134-4,064, respectivamente] (**Figura S1**, Material suplementario de la publicación n°2).

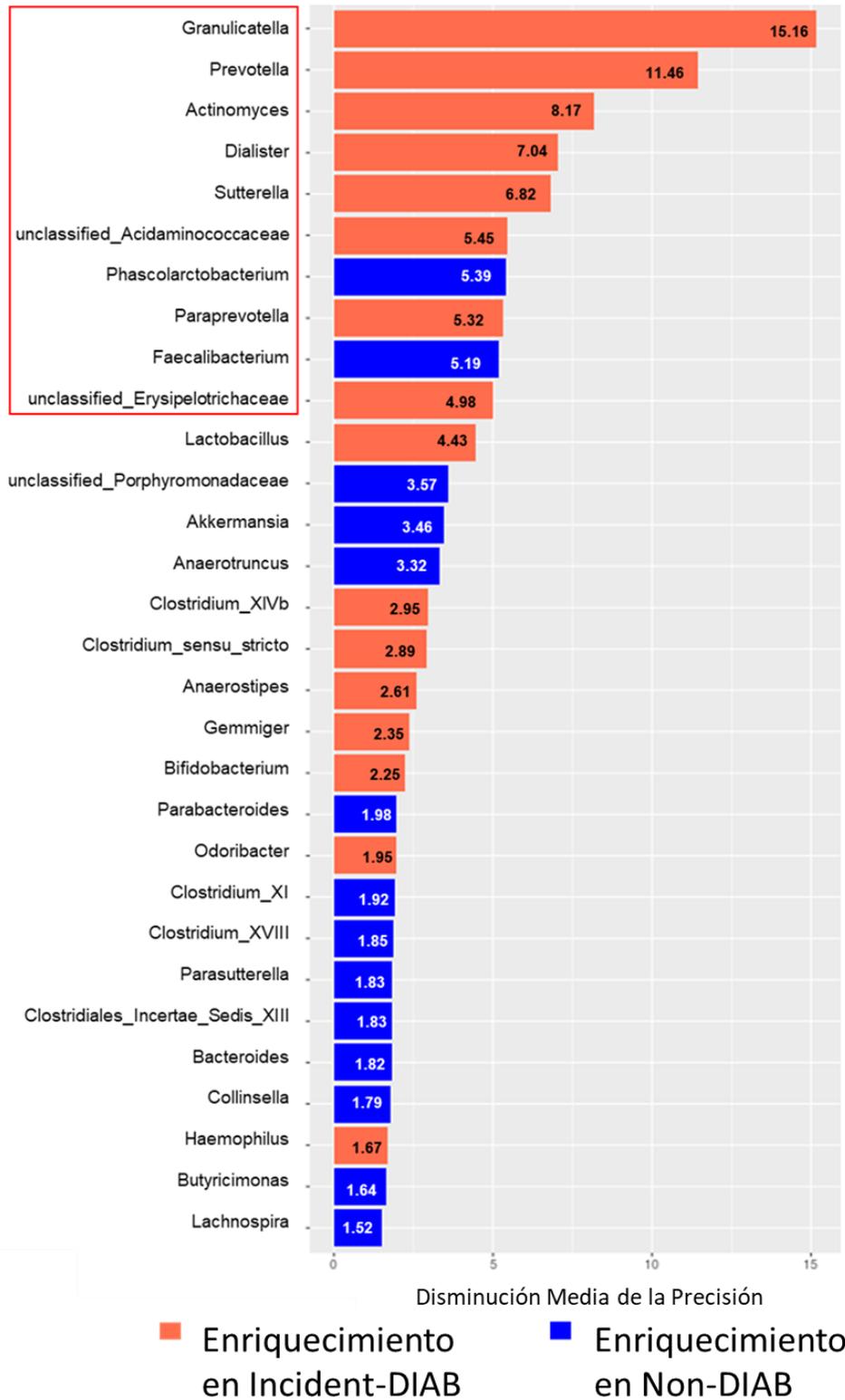
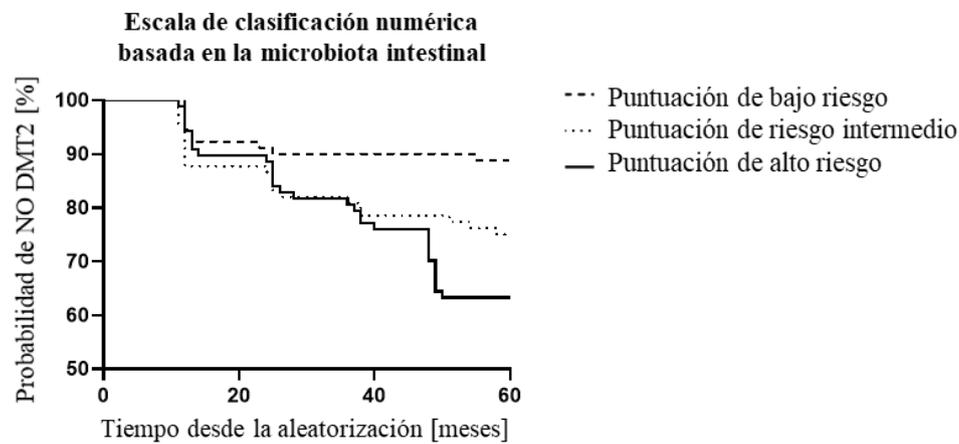


Figura 25. Valores de importancia de las variables del modelo del microbioma. La importancia de las variables está representada por la Disminución Media de la Precisión de los modelos cuando se eliminan estos taxones. Cuanto mayor sea la Disminución Media de la Precisión o la longitud de la barra, mayor será la importancia de la variable. Se han destacado los diez géneros más discriminantes.

A continuación, se creó una escala de clasificación numérica (en inglés “score”) basada en los diez taxones bacterianos más discriminantes (**Figura 25**). Con esa escala, se evaluó el riesgo de desarrollo de DMT2 de acuerdo con los valores numéricos generados mediante análisis de regresión de Cox, categorizando a los pacientes por terciles ascendentes de la puntuación obtenida: T1, puntuación de bajo riesgo; T2, puntuación de riesgo intermedio; T3, puntuación de alto riesgo. El análisis mostró un HR no ajustado de 2,402 (IC del 95%: 1,137-5,072) cuando se comparó el tercil T2 con respecto al T1, y de 3,489 (IC del 95%: 1,715-7,098) para el T3 en referencia con el T1. Además, obtuvimos un HR ajustado de 2,092 (IC del 95% 0,980-4,462) para el tercil T2 frente al tercil T1, y de 3,301 (IC del 95% 1,600-6,811) para el tercil T3 en comparación con el tercil T1 (**Figura 26**).



	Nº en riesgo (nº censurado)							Nº de eventos	Log Rank Test Valor de p
	Basal	10 meses	20 meses	30 meses	40 meses	50 meses	60 meses		
Puntuación de bajo riesgo (T1)	91 (0)	91 (0)	83 (1)	78 (4)	78 (4)	77 (5)	76 (5)	10	
Puntuación de riesgo intermedio (T2)	91 (0)	90 (1)	77 (3)	70 (5)	67 (5)	67 (5)	63 (6)	22	0,001
Puntuación de alto riesgo (T3)	91 (0)	88 (3)	79 (3)	71 (4)	66 (4)	55 (4)	55 (4)	32	

		HR	IC 95 %	
			Inferior	Superior
Puntuación de riesgo basada en la microbiota T1-T2	No ajustado	2,402	1,137	5,072
	Ajustado*	2,092	0,980	4,462
Puntuación de riesgo basada en la microbiota T1-T3	No ajustado	3,489	1,715	7,098
	Ajustado*	3,301	1,600	6,811

Figura 26. Probabilidad de desarrollo de DMT2 mediante análisis de regresión de Cox en función de la puntuación en la escala de clasificación numérica basada en la microbiota intestinal. La escala de clasificación numérica basada en la microbiota intestinal se construyó con los diez taxones bacterianos más discriminantes. Los datos representan los valores de puntuación de la escala por terciles ascendentes: T1,

puntuación de bajo riesgo; T2, puntuación de riesgo intermedio; T3, puntuación de alto riesgo. N° en riesgo: número de pacientes que permanecen no diabéticos. N° censurados: número acumulado de pacientes censurados por no completar el periodo de seguimiento (abandono o muerte). N° eventos: número de pacientes que fueron diagnosticados como diabéticos durante el seguimiento. IC: intervalo de confianza. HR: Hazard ratio o cociente de riesgo. *Este modelo se ajustó por edad, género, dieta, IMC, HDL, triglicéridos e intensidad del tratamiento con estatinas.

Además, construimos un nomograma con la escala de clasificación numérica basada en la microbiota intestinal y las variables clínicas incluidas en el modelo ajustado de Cox. El nomograma mostró la contribución del valor de cada variable a un total de puntos de riesgo de DMT2 que evaluaron la probabilidad de desarrollo de DMT a los 30 y 60 meses (**Figura S2**, Material suplementario de la publicación n°2).

5. Relación entre la escala de clasificación numérica de estimación del riesgo de DMT2 basada en la microbiota intestinal y los índices derivados del OGTT

También evaluamos si un perfil de microbiota intestinal, basado en los taxones bacterianos altamente discriminantes identificados a través del modelo predictivo, puede afectar a los mecanismos fisiopatológicos que subyacen al desarrollo de la DMT2. Para ello, examinamos la relación entre la escala de clasificación numérica de estimación del riesgo, creada a partir de los diez taxones bacterianos más discriminantes, y los índices derivados del OGTT. Los pacientes con una puntuación alta en la escala de estimación del riesgo de desarrollo de DMT2 tenían un DI significativamente menor ($p = 0,048$) y un HIRI significativamente mayor a lo largo del estudio que los pacientes con una puntuación de riesgo baja ($p = 0,046$). Además, hallamos que un menor ISI durante el seguimiento estaba asociado con una alta riqueza de *Suterella* ($p = 0,038$), y una baja abundancia de *Phascolarctobacterium* ($p = 0,040$) y *Faecalibacterium* ($p = 0,007$). Además, un menor DI a lo largo del estudio se asoció con una alta abundancia del género *Dialister* y de un género no clasificado de la familia *Erysipelotrichaceae* ($p = 0,032$ y $p = 0,021$, respectivamente). Por otro lado, un mayor HIRI se asoció con una alta abundancia de *Prevotella* ($p = 0,029$) y una baja abundancia de *Phascolarctobacterium* y *Faecalibacterium* ($p = 0,010$ y $p = 0,019$, respectivamente) (**Figura S3**, Material suplementario de la publicación n°2).

3. DISCUSIÓN- CAPÍTULO 2

Este capítulo o bloque experimental de tesis correspondiente con la publicación nº2, el cual fue realizado en pacientes con CHD, mostró un perfil de microbiota intestinal inicial diferente entre los grupos. Por lo tanto, estos resultados sugieren que un perfil de microbiota intestinal previo se asocia con el desarrollo de la DMT2 varios años antes de su diagnóstico clínico. Además, la adición de los datos de la microbiota intestinal basal a las variables clínicas de riesgo tradicionales incluidas en el test de la ADA y el test FINDRISC, mejoró significativamente la predicción del desarrollo de la DMT2. Así mismo, una puntuación basada en la microbiota intestinal, que incluía los diez taxones bacterianos más relevantes en el modelo predictivo de microbiota intestinal, mostró que los pacientes con un determinado perfil de microbiota intestinal "perjudicial" tenían un riesgo significativamente mayor de presentar DMT2.

Los biomarcadores clínicos utilizados para identificar a los pacientes con riesgo de DMT2, como los contenidos en la escala de puntuación FINDRISC, no son capaces de predecir con exactitud el desarrollo de la enfermedad en todas las poblaciones [57, 323]. Dada la necesidad de identificar nuevos biomarcadores para la detección precoz del riesgo de diabetes, anteriormente nuestro grupo demostró que las curvas de probabilidad libre de diabetes basadas en el "fold-change" postprandial de LPS, mejoraban la evaluación del riesgo de diabetes en comparación con la citada puntuación FINDRISC [177].

Las evidencias actuales relacionan el desarrollo de enfermedades metabólicas, incluida la DMT2, con modificaciones en la composición de la microbiota intestinal [117]. En este sentido, la microbiota intestinal tiene potencial para diferenciar a los pacientes con DMT2 de los individuos no diabéticos, como es sostenido por los resultados de varios estudios [94]. Sin embargo, estos estudios no pueden demostrar de forma concluyente la causalidad de la microbiota intestinal en el desarrollo de la DMT2, ya que la mayoría se realizaron en pacientes con una DMT2 ya diagnosticada cuya microbiota intestinal también podría verse alterada por varios factores de confusión, como la duración de la enfermedad y el tratamiento farmacológico antidiabético [150]. Por el contrario, nuestro estudio tiene el valor añadido de haberse realizado años antes del diagnóstico clínico de la diabetes, lo que apoya una evidencia más sólida de una asociación entre el perfil de la microbiota y el desarrollo de la DMT2.

Desarrollamos un modelo predictivo combinando los datos de la microbiota intestinal basal y los parámetros de riesgo clínico tradicionales del test de la ADA y FINRDRISC para la DMT2. Este modelo fue capaz de predecir con precisión, con una sensibilidad del 95% y una especificidad del 79%, el desarrollo de la DMT2 en el conjunto de datos de prueba.

De hecho, nuestro estudio aplicó los parámetros de riesgo clínico tradicionales de las puntuaciones ADA y FINRDRISC para la DMT2 a pacientes con CHD y alto riesgo de DMT2. Los resultados del análisis indicaron que la adición de la microbiota basal a los parámetros de riesgo clínico tradicionales mejoraba significativamente la predicción en los pacientes con CHD.

El rendimiento obtenido con el modelo de este estudio mejora los modelos recientemente reportados basados en las características de la microbiota intestinal combinadas con los factores de riesgo tradicionales para identificar a los pacientes con DMT2 [154, 156]. Es destacable, que los modelos referenciados anteriormente se obtuvieron a partir de estudios transversales. Por lo que resultaba necesaria una investigación clínica prospectiva de la microbiota intestinal como factor predictivo del desarrollo de la DMT2 como la realizada en este estudio. Por lo tanto, a la vista de estos resultados, los estudios prospectivos podrían ser más apropiados para la selección de los taxones bacterianos asociados al desarrollo de la DMT2, la solidez de los modelos predictivos y la construcción de escalas de clasificación numéricas evaluadoras del riesgo basadas en la microbiota intestinal.

Varios de los taxones bacterianos que muestran un alto poder predictivo según nuestro modelo han sido asociados previamente con enfermedades metabólicas. Por ejemplo, la abundancia de *Granulicatella* se ha relacionado positivamente con el síndrome metabólico [324], con el porcentaje de grasa corporal y los niveles de glucosa en ayunas [325]. *Prevotella* se ha relacionado recientemente con la resistencia a la insulina [189]. El grupo Incident-DIAB se caracterizó por la preponderancia de estos dos géneros, así mismo, una alta abundancia de estos géneros se asoció con un mayor riesgo de desarrollo de DMT2 en nuestro estudio. El género *Sutterella* también se ha asociado positivamente con el síndrome metabólico [326] y la prediabetes [155]. Además, se ha reportado que la abundancia de *Prevotella* y *Paraprevotella*, ambas altamente discriminantes en nuestro modelo y más abundantes en el grupo Incident-DIAB,

disminuye después de la cirugía de manga duodenal-endoluminal en paralelo con una mejora de la homeostasis de la glucosa [327]. La abundancia de *Faecalibacterium* [117] y *Phascolarctobacterium* [328], previamente asociadas con efectos beneficiosos en términos de producción de SCFAs, también se identificaron como significativas en nuestro modelo; el grupo Incident-DIAB tenía una concentración significativamente menor de estas bacterias. Este resultado se apoya en el hecho de que *Faecalibacterium* es un género productor de butirato disminuido en los pacientes diabéticos [159]. Es remarcable, que el butirato ejerce propiedades antiinflamatorias [211]. Por su parte, *Phascolarctobacterium* es un productor de acetato y propionato [329]. Destacar que el acetato es esencial para la síntesis de butirato a través de la vía butiril CoA:acetato CoA transferasa, utilizada por el género *Faecalibacterium* [330].

Algunas de las bacterias altamente predictivas de nuestro modelo difieren de las identificadas en estudios previos que comparaban la microbiota intestinal de pacientes diabéticos diagnosticados con controles [94]. Sin embargo, estas diferencias pueden ser atribuidas al hecho de que, a diferencia de los estudios anteriores, los modelos predictivos utilizados en este estudio incluyeron datos de composición de microbiota que preceden al diagnóstico clínico de DMT2. En general, el perfil de la microbiota intestinal relacionado con la incidencia de la DMT2 de nuestro estudio está en consonancia con la funcionalidad propuesta previamente para estos taxones bacterianos.

En este contexto, varios estudios han señalado que *Akkermansia* actúa de forma beneficiosa a través de su participación en la integridad de la barrera intestinal y la respuesta inmunitaria [331]. Sin embargo, en otro estudio, los pacientes diabéticos mostraron una gran abundancia de *Akkermansia*, probablemente debido a los efectos de la metformina, que puede incrementar la abundancia de esta bacteria [94]. Por tanto, un punto fuerte de nuestro estudio es que la microbiota se analizó años antes del diagnóstico clínico, evitando así cualquier efecto producido por el tratamiento farmacológico antidiabético. A pesar del papel potencial de este género bacteriano en la integridad de la barrera intestinal, *Akkermansia* figuró en la decimoquinta posición de nuestro modelo predictivo.

Además, creamos una escala de clasificación numérica (en inglés “score”) para evaluar el riesgo de DMT2 basada en la microbiota intestinal, a partir de los diez taxones bacterianos más importantes del modelo predictivo de microbiota intestinal. Una

puntuación elevada en esta escala, que implicaría un efecto nocivo por alteración en estas bacterias con mayor poder predictivo, se relacionó con un mayor riesgo de desarrollar DMT2, lo que pone de manifiesto la potencialidad de un determinado perfil de microbiota intestinal para identificar a los pacientes de alto riesgo en una población con CHD. Para explorar los mecanismos fisiopatológicos subyacentes que podrían reforzar estos resultados, analizamos la relación entre la escala de clasificación numérica evaluadora del riesgo basada en la microbiota intestinal y los índices derivados de la prueba OGTT. Nuestros resultados sugirieron que los pacientes con una puntuación de riesgo alta en la escala de clasificación basada en la microbiota intestinal, presentaban una mayor disfunción de la célula β y resistencia a la insulina a lo largo del estudio, mostrado por un menor DI y un mayor HIRI, respectivamente. Sin embargo, a pesar de estas observaciones y de la elevada incidencia de DMT2 en nuestra población con CHD, superior a la observada en el conjunto de la población [332], observamos un AUC más elevado en el análisis ROC de los modelos que incluían el conjunto de datos de la microbiota intestinal que los que incluían los índices derivados del OGTT, lo que sugiere que la microbiota intestinal es un importante factor predictivo asociado al desarrollo de la DMT2.

También encontramos que un menor DI estaba relacionado con una alta abundancia basal de *Dialister*. *Dialister invisus* es una especie no productora de SCFAs, cuyo crecimiento es potenciado por el succinato [333]. Es plausible que una mayor abundancia del género *Dialister*, como se observó en el basal en el grupo Incident-DIAB, pueda representar una mayor abundancia de esta especie consumidora de succinato, siendo este último un precursor de la producción de propionato y butirato [334]. En consecuencia, la producción de estos SCFAs puede disminuir, lo que conduciría a un descenso de GLP-1 y de la producción de insulina, ya que estos SCFAs son capaces de provocar la secreción de GLP-1 al unirse a los receptores GPCR de las células L. A su vez, GLP-1 promueve la secreción de insulina y la proliferación de las células β [117]. Esta sugerencia se encuentra sostenida por la reducción de la abundancia de *D. invisus* mostrada en los pacientes diabéticos sometidos a cirugía bariátrica, junto con una mejora de su estado metabólico [162]. Además, la abundancia de *Dialister* se correlacionó positivamente con una elevada HbA1c en pacientes prediabéticos [335]. También se observó una mayor abundancia de este género en pacientes diabéticos sin tratamiento con metformina en comparación con los controles [335].

La microbiota intestinal puede regular la funcionalidad de las células β a través del metabolismo de los ácidos biliares. Algunos ácidos biliares secundarios sintetizados por la microbiota intestinal han sido reconocidos como ligandos de GPCR TGR5, cuya activación conduce a la producción de GLP-1 [117]. También observamos un menor DI en los pacientes con una alta abundancia basal de un género no identificado perteneciente a la familia *Erysipelotrichaceae*, la cual se ha relacionado con el metabolismo de los lípidos y colesterol del huésped [336]. De hecho, la abundancia de esta familia bacteriana está relacionada negativamente con la excreción fecal de colesterol [337]. Dada esta asociación, una mayor abundancia de este género no clasificado de la familia *Erysipelotrichaceae* podría reflejar una menor excreción fecal de ácidos biliares, por ende, menores niveles de ácidos biliares en el colon y, en consecuencia, una menor producción de ácidos biliares secundarios. Esto, a su vez, puede reducir la activación de TGR5, disminuyendo consecuentemente la secreción de GLP-1 y de insulina estimulada por la glucosa. Esta vía sugerida ha sido respaldada por el hecho de que los secuestradores de ácidos biliares (que aumentan la excreción fecal de ácidos biliares) producen un efecto de reducción de la glucosa y aumentan los niveles de GLP-1 en la DMT2 [237].

Aparte de otros posibles mecanismos por los que un patrón específico de la microbiota intestinal puede desencadenar el desarrollo de la DMT2, la endotoxemia metabólica puede desempeñar un papel crucial. En este contexto, la microbiota intestinal puede influir en la permeabilidad intestinal y, por tanto, afectar a la absorción de componentes bacterianos proinflamatorios, como el LPS, que se ha demostrado que induce la resistencia hepática a la insulina [213]. Anteriormente, este mismo grupo ha demostrado en la misma población que una mayor endotoxemia postprandial precede al desarrollo de la DMT2 [177]. El aumento de los niveles de LPS puede ser parcialmente responsable del mayor HIRI observado en este estudio en los pacientes con una puntuación de riesgo alta en la escala basada en la microbiota, puesto que es conocido que el hígado es la primera diana de la resistencia a la insulina inducida por LPS [213]. Además, la abundancia basal de *Phascolarctobacterium* y *Faecalibacterium* tuvo un efecto positivo en la progresión del HIRI, probablemente a través de la reducción de la inflamación inducida por el butirato y la mejora de la integridad de la barrera intestinal [211, 338]. Otro posible mecanismo que relaciona el perfil de la microbiota intestinal con la resistencia a la insulina hepática puede ser la modulación de los niveles séricos de BCAAs. Nuestro estudio demostró que la resistencia a la insulina hepática también podría

verse afectada negativamente por la abundancia basal de *Prevotella*, la cual se ha reportado previamente como un género potencialmente biosintético de BCAAs, que impulsaría la asociación positiva entre los niveles elevados de BCAAs y la resistencia a la insulina [189].

Este estudio presenta ciertas limitaciones. Realmente, se trata de un estudio secundario realizado en el subgrupo de pacientes no diabéticos al inicio, ya que la prevención de la DMT2 no era el objetivo principal del estudio CORDIOPREV. Por lo tanto, esto limita nuestros hallazgos a los individuos con esta comorbilidad. No obstante, la predicción de la DMT2 es esencial, ya que los pacientes con CHD y DMT2 tienen un riesgo considerablemente mayor de sufrir un nuevo evento cardiovascular que los que no tienen diabetes [282]. Sería ideal validar los resultados en una cohorte sin CHD para confirmar de forma inequívoca nuestros resultados y extenderlos a la población general.

VIII. CAPÍTULO 3. *Aborda: Objetivo específico 3.*

Estudio del potencial de la microbiota intestinal para evaluar el riesgo individual de DMT2 asociado con al consumo de una dieta LF o Med: Estudio CORDIOPREV

Publicación n°3: Camargo A*, Vals-Delgado C* et. al. “A Diet-Dependent Microbiota Profile Associated with Incident Type 2 Diabetes: From the CORDIOPREV Study”.

Mol Nutr Food Res. (2020) *These authors contributed equally to this work.

1. MATERIALES Y MÉTODOS- CAPÍTULO 3

1. Población del estudio

Este estudio se realizó en el contexto del estudio CORDIOPREV (Clinicaltrials.gov NTC00924937), un ensayo clínico en el que participaron 1002 pacientes con CHD. Se incluyeron el total de pacientes no diabéticos al inicio del estudio CORDIOPREV (n = 462), de los cuales 107 pacientes desarrollaron DMT2, según los criterios de la ADA, tras una mediana de seguimiento de 60 meses (**Tabla S1**, véase Material suplementario de la publicación nº3). De los pacientes incluidos en este estudio durante el seguimiento, 17 pacientes murieron y 7 pacientes abandonaron sin ser diagnosticados de diabetes [10]. La disponibilidad de muestras fecales al inicio del estudio de pacientes que no hubieran recibido tratamiento con antibióticos en el mes anterior a la recogida de la muestra inicial fue de un total de 319; de este total, 69 pacientes desarrollaron DMT2 durante el periodo de seguimiento (**Tablas S2 y S3**, Material suplementario de la publicación nº3). Las características basales de la población del estudio según la dieta consumida y la incidencia de DMT2 se muestran en la **Tabla S4** del Material suplementario de la publicación nº3.

2. Test OGTT

Al inicio del estudio y cada año de seguimiento, los pacientes se sometieron a una prueba OGTT estándar. Después de 12 horas de ayuno, se recogió una muestra de sangre antes de la ingesta de glucosa oral (0 min) y de nuevo tras una carga de glucosa de 75 g (Trutol 75; Custom Laboratories, Baltimore, MD, EE.UU.) con muestreo a los 30, 60, 90 y 120 min para establecer los niveles de glucosa e insulina en plasma. Además, se calcularon índices derivados del OGTT: HOMA-IR, ISI, IGI, HIRI, MISI y DI de la forma descrita anteriormente [288].

3. Análisis de la microbiota intestinal

Las muestras fecales se almacenaron a -80 °C. La extracción de ADN se realizó con el manual QIAamp DNASTool Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN se cuantificó utilizando el kit Qubit dsDNA HS Assay (Life technologies), altamente específico para la detección de dsDNA en 10 pg/ml-100pg/ml. A continuación, se realizaron dos PCR independientes para cada muestra fecal siguiendo el protocolo de preparación de librerías de secuenciación metagenómica 16S

de Illumina (Illumina, San Diego CA). En la primera PCR se amplificó la región hipervariable V3-V4 del gen 16S ARNr utilizando 0,2 µm de cada uno de los cebadores universales reportados por Klindworth et al. 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTAAAGACAG-3' y 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGACAG-3' [290]. Brevemente, la PCR se llevó a cabo utilizando el mix KAPA HiFi HotStart ReadyMix (KAPABIOSYSTEMS, Darmstadt, Alemania), 1,25µl de ADN extraído (5 ng/µl en 10 mM Tris pH8,5) y 0,2 µM de cada cebador. Los parámetros de ciclo empleados fueron los siguientes: 3 min de desnaturalización a 95°C seguidos de 25 ciclos (30 s a 95°C, 30 s a 60°C, 30 s a 72°C) y una extensión final a 72°C durante 5 min. La purificación de los amplicones de ARNr 16S se llevó a cabo utilizando las perlas Edadntcourt AMPure XP (Beckman Coulter, Brea, CA).

Una segunda reacción de PCR unió los índices duales y los adaptadores de secuenciación de Illumina utilizando Nextera XT Index Kit (Illumina, San Diego, CA). Esta PCR se realizó con KAPA HiFi HotStart ReadyMix (KAPABIOSYSTEMS, Darmstadt, Alemania), 5 µl del amplicón anterior, 5 µl de cada Nextera XT Index Primer 1(N7xx) y 5 uL de cada Nextera XT Index Primer 2(S5xx), utilizando los siguientes parámetros de ciclo: 3 min de desnaturalización a 95°C seguidos de ocho ciclos (30 s a 95°C, 30 s a 55°C, 30 s a 72°C), y una extensión final a 72°C durante 5 min. La purificación del producto de la PCR se llevó a cabo utilizando las perlas Edadntcourt AMPure XP (Beckman Coulter, Brea, CA). La secuenciación se llevó a cabo en la plataforma MiSeq de Illumina (Illumina, San Diego CA).

Los datos de secuenciación se analizaron y visualizaron utilizando QIIME 2 v. 2019.7 [339]. Las lecturas demultiplexadas single-end que contenían la región hipervariable V3 se truncaron en 212 pb (mediana del score de calidad > 30) y se desnaturalizaron utilizando el método DADA2 [340]. La riqueza y diversidad bacteriana en las muestras se calcularon mediante los parámetros Chao1, Simpson, Shannon y diversidad filogenética (Faith_pd). El análisis de componentes principales de la estructura de la comunidad (diversidad β) se llevó a cabo mediante la métrica de distancia UniFrac ponderada y no ponderada [341] la cual se analizó mediante un análisis PERMANOVA. La taxonomía se asignó a las lecturas de alta calidad utilizando el clasificador de características q2 [342] con un umbral de identidad de secuencia del 99% cuando las

secuencias se examinaron con la base de datos Greengenes 13_8 [292]. Para ser coherente con los datos obtenidos del ARNr 16S, sólo se incluyeron en el análisis estadístico los taxones del dominio bacteriano. En cada muestra, la abundancia taxonómica relativa se calculó como la proporción de lecturas asignadas a una taxonomía determinada respecto del total de lecturas. Para excluir los taxones bacterianos que no estaban presentes en la mayoría de las muestras, se estableció un límite de exclusión. Sólo se consideraron los taxones bacterianos que contenían lecturas de secuencias en al menos el 75% del total de muestras. El análisis LEfSe, (<http://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/>) se utilizó para comparar los grupos en el basal y visualizar los resultados utilizando gráficos de barras taxonómicos y cladogramas.

4. Selección de los taxones bacterianos a incluir en las escalas de clasificación numérica

La selección de variables se realizó mediante dos métodos de análisis distintos. Uno de ellos, fue el análisis de regresión “Least absolute shrinkage and selection operator” (Lasso). Los modelos de regresión Lasso penalizados se utilizaron para obtener una lista de predictores relevantes incluidos en el modelo, en estos modelos se realiza un control de sobreajuste introduciendo restricciones al tamaño de los coeficientes estimados, de forma que son contraídos hacia cero en función del coeficiente de Lasso-penalización, el cual se optimizó utilizando una validación cruzada 10-fold [343]. El segundo método empleado fue la creación de modelos “random survival forest” (RSF), el poder predictivo de las variables se evaluó usando las medidas de importancia de la variables en el modelo obtenido [344]. La selección de variables se realizó en este caso utilizando una profundidad mínima. Los modelos se ajustaron con el software R (versión 3.6.2).

5. Creación de una escala de clasificación numérica basada en la microbiota intestinal y específica de la dieta consumida para estimar el riesgo de DMT2

La escala de clasificación numérica (en inglés, “score”) se construyó multiplicando el coeficiente normalizado para cada taxón bacteriano, seleccionado por el método RSF o por el método Lasso, por 1, 0 o -1, de acuerdo con los siguientes criterios. Una abundancia elevada de un taxón perjudicial determinada por los terciles ascendentes se calificó como 1, para un taxón beneficioso como -1, y viceversa para una baja abundancia.

A este respecto, para un taxón perjudicial (coeficiente positivo en los modelos RSF o Lasso), el tercil 1 se puntuó como -1 (protector), el tercil 2 como 0 (efecto neutro) y el tercil 3 como 1 (riesgo), y lo contrario para un taxón beneficioso (coeficiente negativo en los modelos RSF o Lasso): el tercil 1 se calificó como 1 (riesgo), tercil 2 como 0 (efecto neutro) y tercil 3 como -1 (protector). El riesgo de desarrollo de DMT2 se evaluó en función de los valores generados usados como puntuación mediante regresiones de Cox, clasificando a los pacientes por terciles ascendentes de la puntuación: T1, puntuación de bajo riesgo; T2, puntuación de riesgo intermedio; T3, puntuación de riesgo alto.

6. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó con el software estadístico SPSS (IBM SPSS Statistics versión 21.0). La distribución normal de las variables se evaluó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Las diferencias estadísticas en las variables continuas del metabolismo central entre grupos se evaluaron mediante un ANOVA de un factor. El análisis Chi-cuadrado se aplicó para establecer las diferencias en la presencia/ausencia de bacterias que contenían lecturas de secuencias al menos en el 50% de las muestras totales de al menos uno de los grupos. Además, se realizó un análisis de regresión de Cox, incluyendo las siguientes covariables: edad, género, IMC, HDL, triglicéridos e intensidad del tratamiento con estatinas, según la AHA. Los valores $p < 0,05$ se consideraron significativos.

2. RESULTADOS- CAPÍTULO 3

1. Características basales de la población de estudio

No se encontraron diferencias en los pacientes no diabéticos al inicio del estudio ($n = 462$), que fueron asignados a dieta LF ($n = 216$ pacientes) y los asignados a la dieta Med ($n = 246$ pacientes) en las principales variables metabólicas, exceptuando la proteína-C reactiva y el índice MISI, cuyos niveles fueron mayores en los pacientes asignados a la dieta LF ($p = 0,005$ y $p < 0,001$, respectivamente) (**Tabla S1**, Material suplementario de la publicación nº3). Además, no observamos diferencias significativas entre los grupos de pacientes asignados a cada dieta cuando analizamos los pacientes no diabéticos al inicio del estudio con muestras fecales disponibles y sin tratamiento con antibióticos ($n = 319$, 148 pacientes asignados a la dieta LF y 171 pacientes a la dieta Med), a excepción de la presión arterial diastólica y el índice MISI, cuyos niveles eran mayores en los pacientes asignados a la dieta LF ($p = 0,042$ y $p < 0,001$, respectivamente) (**Tabla S2**, Material suplementario de la publicación nº3). Tampoco se encontraron diferencias para cada dieta entre toda la población de pacientes no diabéticos al inicio del estudio y la población de pacientes con muestras fecales disponibles y sin tratamiento con antibióticos (**Tabla S3**, Material suplementario de la publicación nº3).

Además, se analizaron las diferencias basales para cada dieta entre los pacientes que desarrollaron diabetes (Inc) y los que no la desarrollaron (NonInc) tras una mediana de seguimiento de 60 meses. Encontramos una mayor perímetro de cintura, IMC, HbA1c e índice ISI menor en los pacientes que desarrollaron DMT2 en comparación con los pacientes que no desarrollaron DMT2 cuando analizamos los pacientes asignados a cada dieta por separado (todos los valores $p < 0,05$) (Inc-LF vs. NonInc-LF y Inc-Med vs. NonInc-Med). También observamos valores disminuidos estadísticamente significativos de DI e IGI y mayores de los índices HIRI y HOMA-IR en el grupo Inc-Med en comparación con los del grupo NonInc-Med, y la misma tendencia entre los grupos Inc-LF y NonInc-LF. Aunque la diferencia entre estos últimos grupos no fue estadísticamente significativa. No se observó ninguna interacción estadísticamente significativa entre la dieta y la incidencia de DMT2, excepto en el caso de los triglicéridos ($p = 0,025$), cuyos niveles eran más elevados en Inc-Med en comparación con los de NonInc-Med, mientras que no se observaron diferencias entre los grupos Inc-LF y NonInc-LF (**Tabla S4**, Material suplementario de la publicación nº3).

2. Diferencias en el perfil de la microbiota intestinal basal asociadas a la incidencia de DMT2 en función de la dieta consumida

Exploramos las posibles diferencias al inicio del estudio entre la diversidad de la microbiota intestinal de los grupos de pacientes que desarrollaron DMT2 durante el seguimiento y aquellos que no la desarrollaron para cada dieta (**Tabla 6**). Encontramos una menor diversidad α , evaluada por los índices de Simpson y Shannon ($p = 0,024$ y $p = 0,090$, respectivamente) en el grupo Inc-LF que en el grupo NonInc-LF, mientras que no se encontraron diferencias entre Inc-Med y NonInc-Med. Además, se observó una distancia no filogenética cualitativa estadísticamente significativa entre Inc-LF y NonInc-LF (índice de Jaccard $p = 0,024$). En cambio, observamos una distancia no filogenética cualitativa (índice de Jaccard $p = 0,001$) y cuantitativa (índice de Bary-Curtis $p = 0,001$) estadísticamente significativas, además de cualitativa filogenética (índice UniFrac no ponderado $p = 0,014$) y cuantitativa (índice UniFrac ponderado $p = 0,001$) entre Inc-Med y NonInc-Med.

Tabla 6. Índices de diversidad en función de la incidencia de DMT2 en los pacientes que consumieron dietas LF o Med.

	α -diversidad				β -diversidad			
	Chao1	Simpson	Shannon	DF de Faith	Jaccard	Bray-Curtis	UniFrac no ponderado	UniFrac ponderado
Inc-LF vs NonInc-LF	0,554	0,024	0,090	0,499	0,024	0,064	0,131	0,656
Inc-Med vs NonInc-Med	0,787	0,704	0,974	0,965	0,001	0,001	0,014	0,001
	α -diversidad				β -diversidad			
	Chao1	Simpson	Shannon	DF de Faith	Jaccard	Bray-Curtis	UniFrac no ponderado	UniFrac ponderado
Inc-LF vs Inc-Med	0,990	0,107	0,974	0,965	0,001	0,001	0,014	0,001
NonInc-LF vs NonInc-Med	0,175	1,000	0,902	0,275	0,670	0,455	0,373	0,557
Pacientes LF vs Pacientes Med	0,229	0,509	0,730	0,260	0,913	0,608	0,556	0,635

DF: Distancia filogenética. Inc-LF: pacientes que consumieron la dieta LF y desarrollaron DMT2 durante el periodo de seguimiento. NonInc-LF: pacientes que consumieron la dieta LF y no desarrollaron DMT2 durante el periodo de seguimiento. Inc-Med: pacientes que consumieron la dieta Med y desarrollaron DMT2 durante el periodo de seguimiento. NonInc-Med: pacientes que consumieron la dieta Med y no desarrollaron DMT2 durante el periodo de seguimiento. Pacientes LF: total de pacientes analizados que consumieron la dieta LF. Pacientes Med: total de pacientes analizados que consumieron la dieta Med.

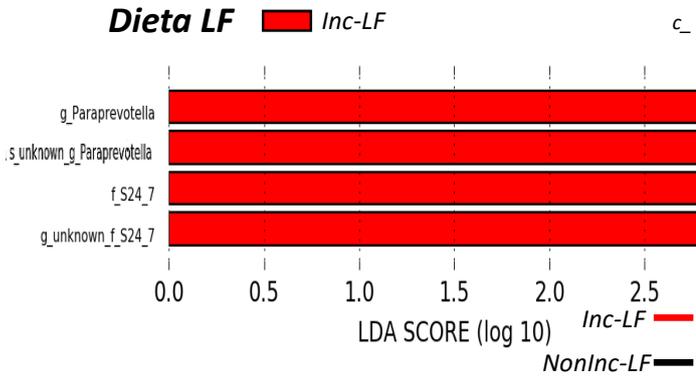
El análisis LEfSe se utilizó para identificar los filotipos y los taxones de la microbiota intestinal basal con mayor abundancia diferencial entre los grupos de pacientes que desarrollaron DMT2 en el periodo de seguimiento (Inc) y los que no la desarrollaron (NonInc) con para cada dieta (**Figura 27A**).

La microbiota intestinal al inicio del estudio en los grupos de pacientes que desarrollaron DMT2 consumiendo la dieta LF (Inc-LF) se caracterizó por la preponderancia de la familia *S24-7*, un género desconocido de esta familia, el género *Paraprevotella*, y por una especie bacteriana desconocida de este género, en comparación con el grupo de pacientes que no desarrollaron DMT2 y que consumieron también la dieta LF (NonInc-LF).

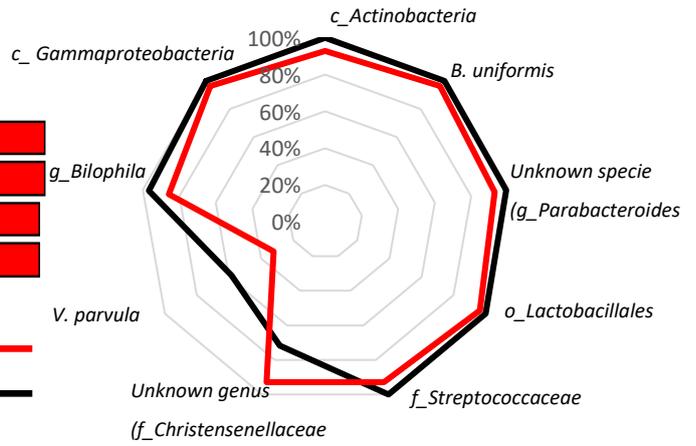
La microbiota intestinal en el estado basal del grupo de pacientes que desarrollaron DMT2 consumiendo dieta Med (Inc-Med) se caracterizó por la preponderancia del orden *Pasteurellales*, *Preotellaceae*, *Veillonellaceae* y *Pasteurellaceae*, el género *Prevotella* y una especie bacteriana desconocida de este género. En cambio, la microbiota intestinal del grupo de pacientes que no desarrollaron DMT2 y consumieron la dieta Med (NonInc-Med) se caracterizó por la preponderancia de las familias *Odoribacteraceae*, *Porphyromonadaceae*, *Christensenellaceae*, por un género desconocido de esta última familia, *Parabacteroides*, el género *Butyricimonas*, una especie bacteriana desconocida de este último género, una especie bacteriana desconocida de *Bacteroides*, y *Bacteroides uniformis*.

También analizamos la frecuencia de presencia/ausencia de taxones entre los grupos (**Figura 27B**; **Tabla S5**, Material Suplementario de la publicación n°3). Encontramos una menor presencia de las clases *Actinobacteria* y *Gammaproteobacteria*, orden *Lactobacillales*, familia *Streptococcaceae*, género *Bilophila*, *B. uniformis*, *V. parvula*, y una especie bacteriana desconocida del género *Parabacteroides*, y una mayor presencia de un género desconocido de la familia *Christensenellaceae* en el grupo Inc-LF en comparación con el grupo NonInc-LF. Además, encontramos una mayor presencia del filo *Fusobacterium*, la clase *Verrucomicrobiae*, familia *Gemellaceae*, los géneros *Megamonas*, *Megasphaera* y *Phascolarctobacterium* y *B. plebeius*, y una menor presencia de los géneros *Coprococcus* y *Holdemania* en Inc-Med que en el grupo NonInc-Med.

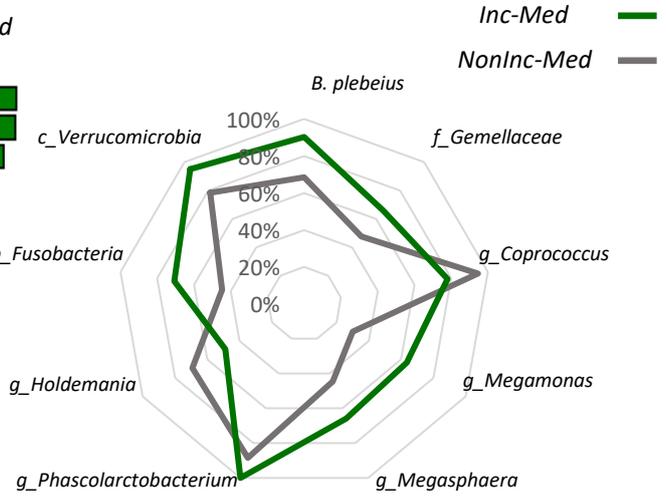
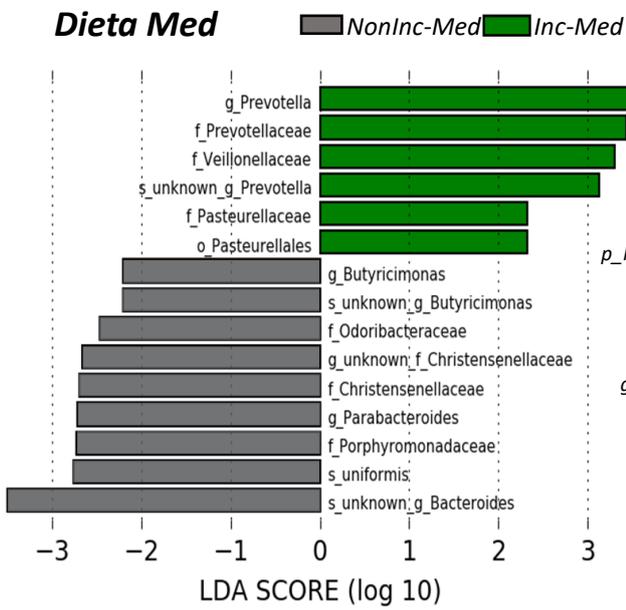
A



B



Dieta Med



Inc-LF vs Inc-Med ■ *Inc-LF* ■ *Inc-Med*

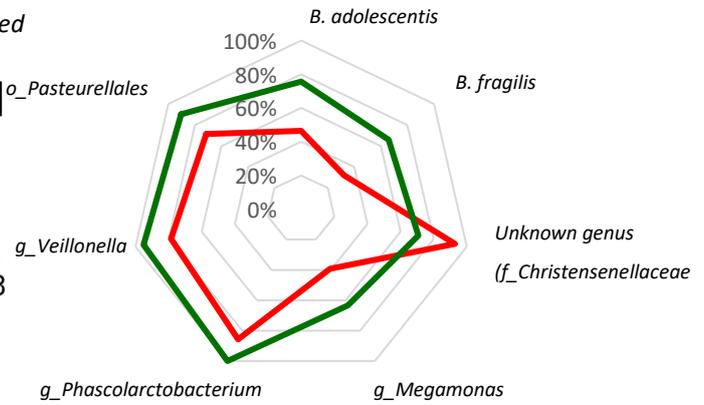
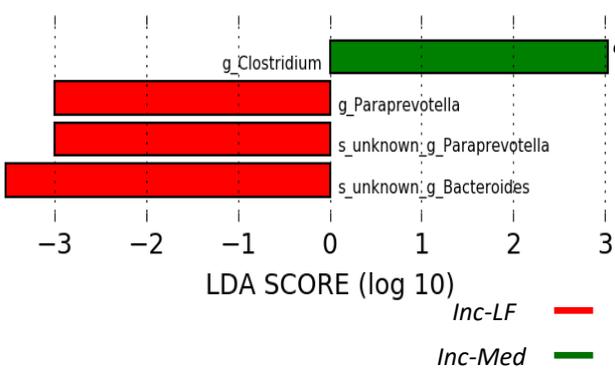


Figura 27. Diferencias en el perfil de la microbiota intestinal basal en función de la incidencia de DMT2 y de la aleatorización dietética. (A) Análisis discriminante lineal del efecto del tamaño LEfSe. (B) Análisis de presencia/ausencia de taxones bacterianos. Los colores representan el grupo en el que el taxón indicado es más abundante en comparación con el otro grupo. LDA: Análisis Discriminante Lineal. Inc-LF: pacientes que consumieron la dieta LF y desarrollaron DMT2 durante el periodo de seguimiento. NonInc-LF: pacientes que consumieron la dieta LF y no desarrollaron DMT2 durante el periodo de seguimiento. Inc-Med: pacientes que consumieron la dieta Med y desarrollaron DMT2 durante el periodo de seguimiento. NonInc-Med: pacientes que consumieron la dieta Med y no desarrollaron DMT2 durante el periodo de seguimiento.

3. El perfil de la microbiota intestinal basal de los pacientes incidentes de DMT2 es diferente entre ambos grupos dietéticos

Comparamos el perfil de la microbiota intestinal de los grupos de pacientes que desarrollaron DMT2 mientras consumían una dieta LF (Inc-LF), y los que desarrollaron DMT2 mientras consumían la dieta Med (Inc-Med). Aunque no encontramos diferencias en la α -diversidad entre los grupos de pacientes Inc-LF e Inc-Med, en el caso de la β -diversidad, sí observamos diferencias estadísticamente significativas en la distancia no filogenética cualitativa (índice de Jaccard $p = 0,001$) y cuantitativa (índice de Bary-Curtis $p = 0,001$), además de la filogenética cualitativa (índice de UniFrac no ponderado $p = 0,014$) y cuantitativa (índice UniFrac ponderado $p = 0,001$) entre los grupos de pacientes Inc-LF e Inc-Med. Sin embargo, no encontramos ninguna diferencia en la α -diversidad o en la β -diversidad entre los grupos NonInc-LF NonInc-Med, o entre todos los pacientes que consumieron la dieta LF (Inc- y NonInc-LF) en comparación con todos los pacientes que consumieron la dieta Med (Inc- y NonInc-Med) (**Tabla 6**). El análisis LEfSe mostró una preponderancia del género *Clostridium* en el grupo Inc-Med, mientras que, por el contrario, el grupo Inc-LF se caracterizó por una preponderancia del género *Paraprevotella*, por una especie bacteriana desconocida de este género y por una especie bacteriana desconocida de *Bacteroides* (**Figura 27A**).

Para comprobar si las diferencias encontradas entre Inc-LF e Inc-Med estaban asociadas con el desarrollo de la DMT2, en vez de con diferencias aleatorias entre la microbiota intestinal de los pacientes asignados a cada dieta, también exploramos las posibles diferencias en la microbiota intestinal basal de los pacientes que no desarrollaron diabetes comparando entre sí los grupos de dieta LF y Med. Así como también, analizamos las diferencias entre grupos dietéticos incluyendo todos los pacientes, los que

no desarrollaron y los que desarrollaron DMT2 (**Figura S1**, Material suplementario de la publicación nº3). Además, analizamos la frecuencia de presencia/ausencia de taxones entre los grupos Inc-LF e Inc-Med. Encontramos una menor presencia del orden *Pasteurellales*, *Megamonas*, *Phascolarctobacterium* y *Veillonellagenera*, así como de las especies *B. adolescentis* y *B. fragilis* y, una mayor presencia de un género desconocido de la familia *Christensenellaceae* en el grupo Inc-LF que en el grupo Inc-Med (**Figura 27B**; **Tabla S5**, Material suplementario de la publicación nº3).

4. Construcción de escalas de clasificación numéricas de evaluación del riesgo de desarrollo de DMT2 específicas del modelo dietético usando el modelo RSF

La selección escalonada del modelo RSF en el conjunto de datos de los pacientes que consumían dieta LF indicó que 9 de los 132 taxones bacterianos eran indicativos de la incidencia de la diabetes (**Tabla 7**). Las curvas ROC de los taxones bacterianos seleccionados arrojaron un AUC de 0,687, el cual aumentó a 0,746 cuando se incluyeron las variables clínicas (edad, género, IMC, HDL, triglicéridos e intensidad del tratamiento con estatinas) (**Tabla 8**). Por otra parte, la selección escalonada del análisis RSF en el conjunto de datos de los pacientes que consumieron la dieta Med indicó que 5 de los 132 taxones bacterianos eran informativos con respecto a la incidencia de DMT2 (**Tabla 7**). Las curvas ROC de los taxones bacterianos seleccionados mostraron un área bajo la curva AUC de 0,734, que aumentó a 0,826 cuando se incluyeron las variables clínicas (edad, género, IMC, HDL, triglicéridos e intensidad del tratamiento con estatinas) (**Tabla 8**).

Tabla 7. Taxones bacterianos con valor discriminatorio para el riesgo de DMT2 asociado a cada dieta, seleccionados por los modelos RSF y Lasso.

Selección RSF de taxones bacterianos en el conjunto de datos de pacientes que consumieron la dieta LF	Coef.	Coef. Exp.
<i>p_Proteobacteria</i>	-0,48	0,62
<i>p_Actinobacteria; c_Coriobacteriia; o_Coriobacteriales; f_Coriobacteriaceae; g_Collinsella</i>	-0,60	0,55
<i>p_Actinobacteria; c_Coriobacteriia; o_Coriobacteriales; f_Coriobacteriaceae; g_Collinsella; s_aerofaciens</i>	0,55	1,73
<i>p_Firmicutes; c_Bacilli</i>	-0,05	0,95
<i>p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Lachnospiraceae; g_Roseburia</i>	0,02	1,02
<i>p_Bacteroidetes; c_Bacteroidia; o_Bacteroidales; f_Prevotellaceae</i>	2,52	1,25
<i>p_Bacteroidetes; c_Bacteroidia; o_Bacteroidales; f_Prevotellaceae; g_Prevotella</i>	-2,40	0,09
<i>p_Bacteroidetes; c_Bacteroidia; o_Bacteroidales; f_Paraprevotellaceae; g_Paraprevotella</i>	0,50	1,65

<i>p_Bacteroidetes; c_Bacteroidia; o_Bacteroidales; f_Porphyrimonadaceae; g_Parabacteroides; s_distasonis</i>	0,02	1,02
Selección RSF de taxones bacterianos en el conjunto de datos de pacientes que consumieron la dieta Med	Coef.	Coef. Exp.
<i>p_TM7</i>	0,19	1,21
<i>p_Proteobacteria; c_Betaproteobacteria; o_Burkholderiales</i>	0,18	1,20
<i>p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Lachnospiraceae; g_Roseburia</i>	0,09	1,10
<i>p_Bacteroidetes; c_Bacteroidia; o_Bacteroidales; f_Rikenellaceae; g_unknown_f_Rikenellaceae</i>	-0,12	0,88
<i>p_Bacteroidetes; c_Bacteroidia; o_Bacteroidales; f_Prevotellaceae; g_Prevotella; s_unknown_g_Prevotella</i>	0,36	1,43
Selección Lasso de taxones bacterianos en el conjunto de datos de pacientes que consumieron la dieta LF	Coef.	Coef. Exp.
<i>p_Proteobacteria; c_Gammaproteobacteria</i>	-0,223	0,800
<i>p_Actinobacteria; c_Actinobacteria; o_Bifidobacteriales; f_Bifidobacteriaceae; g_Bifidobacterium; s_longum</i>	0,064	1,066
<i>p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Mogibacteriaceae</i>	-0,225	0,798
<i>p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Clostridiaceae; g_Clostridium</i>	-0,228	0,796
<i>p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Lachnospiraceae; g_Roseburia</i>	0,009	1,009
<i>p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Ruminococcaceae; g_Faecalibacterium</i>	-0,088	0,916
<i>p_Bacteroidetes; c_Bacteroidia; o_Bacteroidales; f_Rikenellaceae; g_Alistipes</i>	0,157	1,170
<i>p_Bacteroidetes; c_Bacteroidia; o_Bacteroidales; f_Paraprevotellaceae; g_Paraprevotella</i>	0,202	1,224
<i>p_Bacteroidetes; c_Bacteroidia; o_Bacteroidales; f_Bacteroidaceae; g_Bacteroides; s_uniformis</i>	-0,336	0,715
Selección Lasso de taxones bacterianos en el conjunto de datos de pacientes que consumieron la dieta Med	Coef.	Coef. Exp.
<i>p_TM7</i>	0,005	1,005
<i>p_Proteobacteria; c_Betaproteobacteria</i>	0,228	1,256
<i>p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Lachnospiraceae; g_Roseburia</i>	0,032	1,032
<i>p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Christensenellaceae; g_unknown_f_Christensenellaceae</i>	-0,187	0,830
<i>p_Bacteroidetes; c_Bacteroidia; o_Bacteroidales; f_Prevotellaceae; g_Prevotella; s_unknown_g_Prevotella</i>	0,121	1,128
<i>p_Bacteroidetes; c_Bacteroidia; o_Bacteroidales; f_Bacteroidaceae; g_Bacteroides; s_unknown_g_Bacteroides</i>	-0,671	0,511

p, phylum; c, clase; o, orden; f, familia; g, género; s, especie bacteriana; Coef., coeficiente; Exp., exponencial

Además, construimos una escala de clasificación numérica del riesgo basada en la selección RSF para cada dieta (puntuación RSF-LF y puntuación RSF-Med) multiplicando el coeficiente normalizado de RSF de cada taxón bacteriano por 1, 0 o -1, de acuerdo con los siguientes criterios: una alta abundancia de un taxón perjudicial determinada por terciles ascendentes se puntuó como 1, y para un taxón beneficioso como -1, y viceversa para una abundancia baja. Así pues, para un taxón perjudicial (coeficiente positivo en RSF), el tercil 1 se calificó como -1 (protector), el tercil 2 como 0 (efecto neutro) y el tercil 3 como 1 (riesgo), y lo contrario para un taxón beneficioso (coeficiente

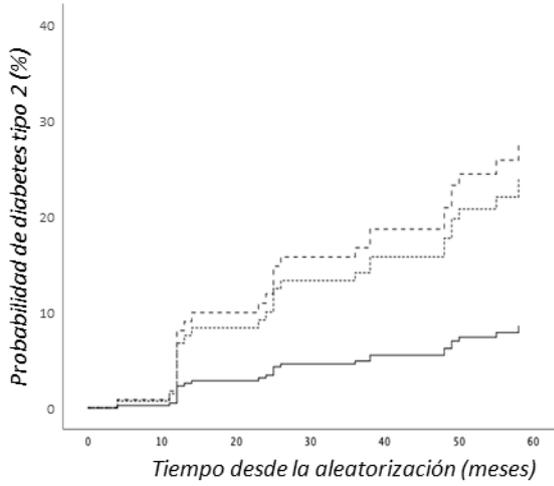
negativo en el RSF): el tercil 1 como 1 (riesgo), el tercil 2 como 0 (efecto neutro) y el tercil 3 como -1 (protector).

Tabla 8. Curvas ROC de los taxones bacterianos seleccionados por los modelos “Random Survival Forest” y “Lasso-Cox regression”.

ANÁLISIS ROC	AUC
<i>Variables Clínicas para la dieta LF</i>	0,641
<i>Variables Clínicas para la dieta Med</i>	0,725
Modelo predictivo RSF para la dieta LF	
<i>Microbioma</i>	0,687
<i>Microbioma + Variables Clínicas</i>	0,746
Modelo predictivo RSF para la dieta Med	
<i>Microbioma</i>	0,734
<i>Microbioma + Variables Clínicas</i>	0,826
Modelo predictivo “Lasso-Cox regression” para la dieta LF	
<i>Microbioma</i>	0,742
<i>Microbioma + Variables Clínicas</i>	0,808
Modelo predictivo “Lasso-Cox regression” para la dieta Med	
<i>Microbioma</i>	0,777
<i>Microbioma + Variables Clínicas</i>	0,781

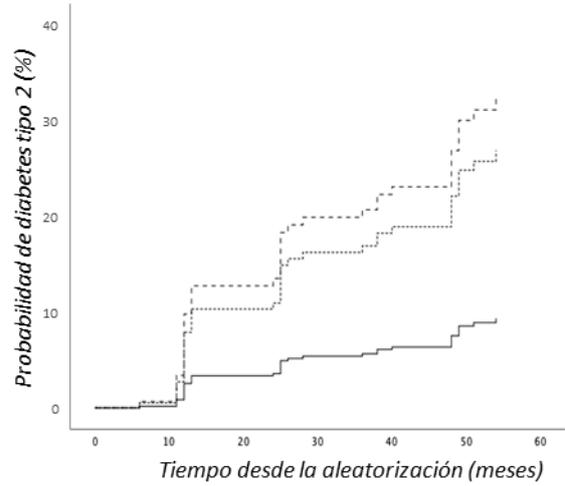
Se evaluó el papel potencial de estos valores de puntuación (en inglés “score”) basados en la microbiota intestinal para evaluar el riesgo de desarrollo de DMT2 mediante un análisis de regresión de Cox, clasificando a los pacientes que consumían una dieta LF en terciles de los valores de puntuación RSF-LF y a los pacientes que consumían la dieta Med por terciles ascendentes de la puntuación RSF-Med: T1, puntuación de bajo riesgo; T2, puntuación de riesgo intermedio; T3, puntuación de alto riesgo. Para la puntuación RSF-LF, se encontró un HR ajustado de 3,039 (IC del 95%: 0,956-9,662) entre los terciles T1 vs. T2, y de 3,656 (IC del 95%: 1,176-11,368) entre los terciles de T1 vs. T3 (**Figura 28A**). Para la puntuación RSF-Med, encontramos un HR ajustado de 3,192 (IC del 95%: 1,155-8,825) entre los terciles de T1 vs. T2, y de 3,996 (IC del 95%: 1,415-11,287) entre los terciles de T1 vs. T3 (**Figura 28B**). También clasificamos a los pacientes que consumieron la dieta LF por terciles ascendentes de la puntuación RSF-Med y a los pacientes que consumieron la dieta Med por terciles ascendentes de la puntuación RSF-LF. No encontramos ninguna asociación significativa entre la puntuación de riesgo RSF-LF y el desarrollo de DMT2 en aquellos pacientes que consumieron la dieta Med. Tampoco encontramos ninguna asociación significativa entre la puntuación de riesgo RSF-Med y el desarrollo de DMT2 en los pacientes que consumieron la dieta LF (**Figura S2**, Material suplementario de la publicación nº3).

A



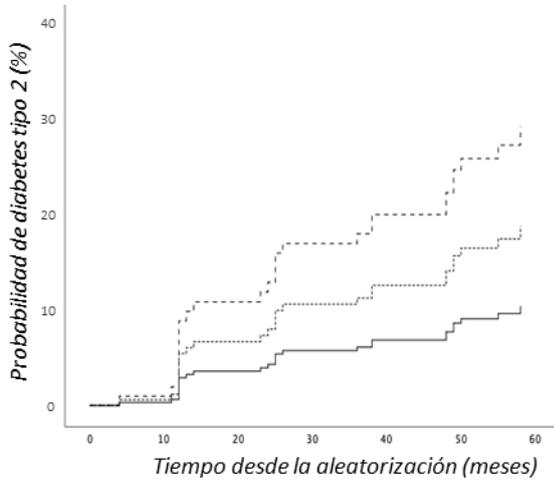
		HR	IC 95% para HR	
			Inferior	Superior
Tercil 1 (ref.)		1,00	1,00	1,00
	No ajustado	3,36	1,10	10,53
Tercil 2	Ajustado*	3,04	0,96	9,66
	No ajustado	3,55	1,14	11,01
Tercil 3	Ajustado*	3,66	1,18	11,37

B



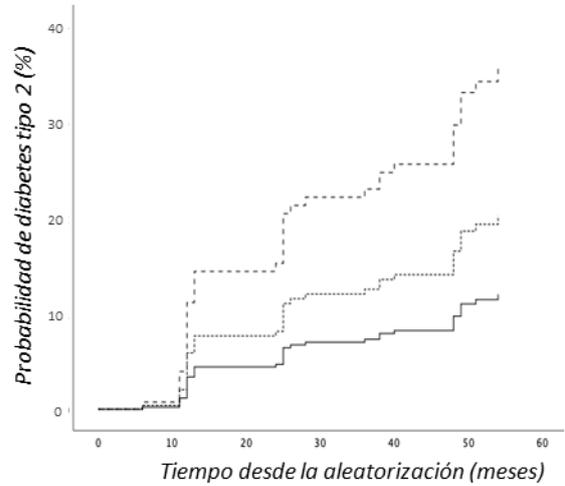
		HR	IC 95% para HR	
			Inferior	Superior
Tercil 1 (ref.)		1,00	1,00	1,00
	No ajustado	3,74	1,37	10,21
Tercil 2	Ajustado*	3,19	1,16	8,83
	No ajustado	4,29	1,61	11,42
Tercil 3	Ajustado*	4,00	1,42	11,29

C



		HR	IC 95% para HR	
			Inferior	Superior
Tercil 1 (ref.)		1,00	1,00	1,00
	No ajustado	1,83	0,61	5,46
Tercil 2	Ajustado*	1,89	0,62	5,77
	No ajustado	2,96	1,07	8,23
Tercil 3	Ajustado*	3,15	1,08	9,12

D



		HR	IC 95% para HR	
			Inferior	Superior
Tercil 1 (ref.)		1,00	1,00	1,00
	No ajustado	2,15	0,81	5,72
Tercil 2	Ajustado*	1,77	0,65	4,78
	No ajustado	4,33	1,76	10,63
Tercil 3	Ajustado*	3,45	1,38	8,65

 Tercil 1 -puntuación de bajo riesgo
  Tercil 2 -puntuación de riesgo intermedio
  Tercil 3 -puntuación de alto riesgo

Figura 28. Probabilidad de desarrollo de DMT2 mediante el análisis de regresión de Cox en función de las puntuaciones en las escalas de clasificación numéricas de evaluación del riesgo basadas en la microbiota intestinal para las dietas LF o Med. La puntuación de riesgo basada en la microbiota intestinal específica de la dieta se construyó con los taxones bacterianos seleccionados por RSF para los pacientes que consumieron una dieta LF (puntuación RSF-LF, panel A) y los que consumieron la dieta Med (puntuación RSF-Med, panel B) o por el modelo Lasso para los pacientes que consumieron una dieta LF (puntuación Lasso-LF, panel C) y para los que consumieron la dieta Med (puntuación Lasso-Med, panel D). Los datos representan los valores de las puntuaciones obtenidos en las escalas de clasificación numérica construidas por terciles ascendentes: T1, puntuación de bajo riesgo; T2, puntuación de riesgo intermedio; T3, puntuación de alto riesgo. HR: Hazard ratio. IC: intervalo de confianza. *Este modelo se ajustó por edad, género, IMC, HDL, triglicéridos e intensidad del tratamiento con estatinas.

5. Evaluación de las escalas de clasificación numéricas basadas en los modelos RSF para estimar el riesgo de DMT2 específicas del modelo dietético

A continuación, para evaluar el potencial de las escalas de clasificación numéricas específicas de cada dieta para evaluar el riesgo de DMT2 asociado de manera específica al consumo de las dietas LF o Med, clasificamos por separado los pacientes que consumían dietas LF y Med según la mediana de su puntuación o “score” RSF-LF. A continuación, para cada uno de los grupos, pacientes con una puntuación baja y pacientes con una puntuación alta de RSF-LF, se determinó el riesgo de desarrollo de DMT2 comparando ambas dietas, mediante un análisis de regresión de Cox. Encontramos un HR ajustado de 0,417 (IC del 95%: 0,190-0,915) para el consumo de la dieta LF en comparación con la dieta Med (utilizada como referencia) en pacientes con una puntuación RSF-LF baja, mientras que no se observaron diferencias en el riesgo de desarrollo de DMT2 entre las dietas en los pacientes con una puntuación RSF-LF alta (**Figura 29A; Tabla S6**, Material suplementario de la publicación nº3). También categorizamos por separado a los pacientes que consumieron una dieta LF y Med según la mediana de la puntuación RSF-Med. A continuación, del mismo modo determinamos el riesgo de desarrollo de DMT2 mediante análisis de regresión de Cox. Aunque no observamos diferencias en el riesgo de desarrollo de DMT2 entre las dietas en los pacientes con una puntuación RSF-Med baja, encontramos un HR ajustado de 2,339 (IC del 95%: 1,157-4,726) para el consumo de la dieta Med en comparación con el consumo de la dieta LF (utilizada como referencia) en pacientes con una puntuación de RSF-Med alta (**Figura 29B; Tabla S6**, Material suplementario de la publicación nº3).

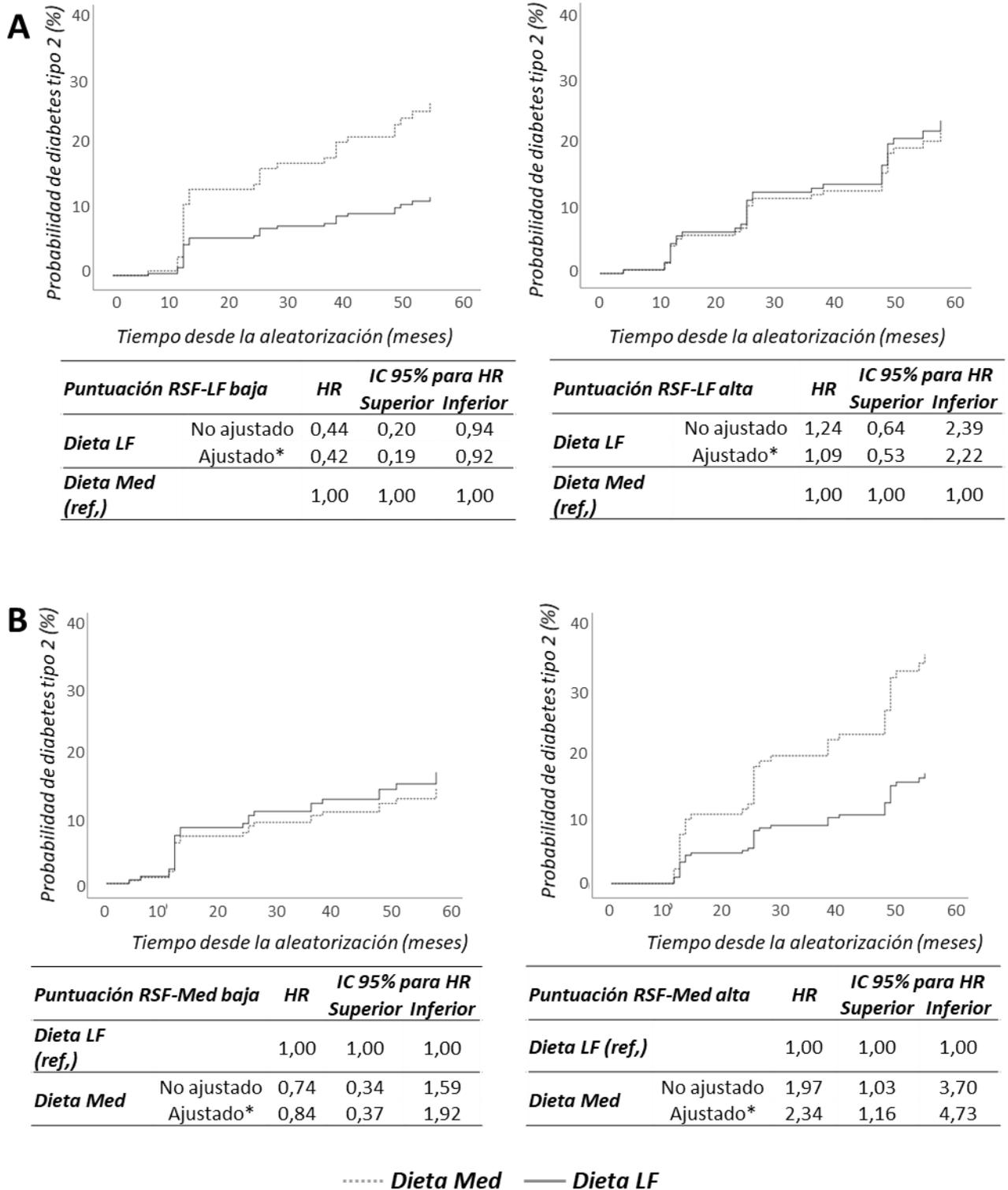


Figura 29. Probabilidad de desarrollo de DMT2 en función de la dieta evaluada por las escalas de clasificación numéricas específicas de cada dieta basadas en los modelos RSF de la microbiota intestinal mediante un análisis de regresión de Cox. Los pacientes que consumieron cada dieta se clasificaron según los valores en las escalas de clasificación construidas para cada dieta A) RSF-LF y B) RSF-Med por la mediana: puntuación de riesgo baja y puntuación de riesgo alta. HR: Hazard ratio. IC: intervalo de confianza. *Este modelo se ajustó por edad, género, IMC, HDL, triglicéridos e intensidad del

tratamiento con estatinas. Dieta baja en grasas (LF), línea continua. Dieta mediterránea (Med), línea punteada.

6. Construcción de escalas de clasificación numéricas de evaluación del riesgo de desarrollo de DMT2 específicas del modelo dietético usando el modelo “Lasso-Cox Regression”

Se realizó un modelo de regresión de Cox aplicando el método Lasso, junto con una validación cruzada de 10-fold para la selección de variables en el conjunto de datos de los pacientes que consumían la dieta LF, y se identificó un conjunto de 9 de 132 taxones bacterianos como predictores (**Tabla 7**). Las curvas ROC de los taxones bacterianos seleccionados mostraron un AUC de 0,742, que aumentó a 0,808 cuando se incluyeron las variables clínicas (edad, género, IMC, HDL, triglicéridos e intensidad del tratamiento con estatinas) (**Tabla 8**). Asimismo, el modelo realizado para analizar el conjunto de datos de los pacientes que consumieron la dieta Med seleccionó un conjunto de 6 taxones bacterianos (**Tabla 7**). Las curvas ROC de estos taxones bacterianos obtuvieron un AUC de 0,777, que se incrementó a 0,781 cuando se incluyeron las variables clínicas (**Tabla 8**).

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, cada conjunto de taxones bacterianos específicos del modelo de dieta junto con sus coeficientes se incluyó en una fórmula de puntuación (véase MATERIALES Y MÉTODOS CAPÍTULO-3) para obtener una escala de clasificación numérica con intencionalidad de evaluar el riesgo de desarrollo de DMT2 específicamente asociado al consumo de cada dieta. A continuación, se determinó el papel potencial de estas puntuaciones basadas en la microbiota intestinal para evaluar el riesgo de desarrollo de DMT2 mediante un análisis de regresión de Cox. Para ello, clasificamos a los pacientes que consumieron la dieta LF por terciles ascendentes de la puntuación Lasso-LF y a los pacientes que consumieron la dieta Med por terciles ascendentes de la puntuación Lasso-Med: T1, puntuación de riesgo baja; T2, puntuación de riesgo intermedia; T3, puntuación de riesgo alta. Para la puntuación Lasso-LF, encontramos un HR ajustado de 1,894 (IC del 95%: 0,622-5,766) entre los terciles T1 vs. T2 y de 3,145 (IC del 95%: 1,840-9,123) entre los terciles T1 vs. T3 (**Figura 28C**). En el análisis con la puntuación Lasso-Med, encontramos un HR de 1,766 (IC del 95%: 0,652-4,781) entre los terciles T1 vs. T2, y de 3,447 (IC del 95%: 1,375-8,646) entre los terciles T1 vs. T3 (**Figura 28D**). También clasificamos a los pacientes que consumieron la dieta LF por

terciles ascendentes de la puntuación Lasso-Med y los pacientes que consumieron la dieta Med por terciles ascendentes de la puntuación Lasso-LF. No se encontraron asociaciones significativas entre la puntuación Lasso-LF y el desarrollo de DMT2 en los pacientes que consumieron la dieta Med, o entre la puntuación Lasso-Med y el desarrollo de DMT2 en los pacientes que consumieron la dieta LF (**Figura S2**, Material suplementario de la publicación n°3).

7. Evaluación de las escalas de clasificación numéricas basada en los modelos “Lasso-Cox Regression” para estimar el riesgo de DMT2 específicas del modelo dietético

El siguiente paso fue determinar el potencial de las puntuaciones Lasso específicas para cada dieta en la evaluación del riesgo de DMT2 asociado específicamente al consumo de las dietas LF o Med. Para ello, clasificamos por separado los pacientes que consumieron las dietas LF y Med por la mediana de la puntuación Lasso-LF. A continuación, se analizó por separado los pacientes con puntuación de Lasso-LF alta y baja comparando el riesgo de desarrollo de DMT2 entre ambas dietas, LF y Med, mediante un análisis de regresión de Cox. Encontramos un HR de 0,502 (IC del 95%: 0,206-1,223) para el consumo de la dieta LF en comparación con el consumo de la dieta Med (utilizada como referencia) en pacientes con una puntuación Lasso-LF baja. En cambio, no se observaron diferencias en el riesgo de desarrollo de DMT2 entre las dietas en los pacientes con una puntuación Lasso-LF alta (**Figura 30A; Tabla S7**, Material suplementario de la publicación n°3). También clasificamos a los pacientes que consumieron las dietas LF y Med por la mediana de la puntuación Lasso-Med y comprobamos el riesgo de desarrollo de DMT2. A pesar de que no observamos diferencias en el riesgo de desarrollo de DMT2 entre las dietas en los pacientes con una puntuación Lasso-Med baja, encontramos un HR de 1,966 (IC del 95%: 1,003-3,853) para el consumo de la dieta Med en comparación con el consumo de la dieta LF (utilizada como referencia) en pacientes con una puntuación Lasso-Med alta (**Figura 30B; Tabla S7**, Material suplementario de la publicación n°3).

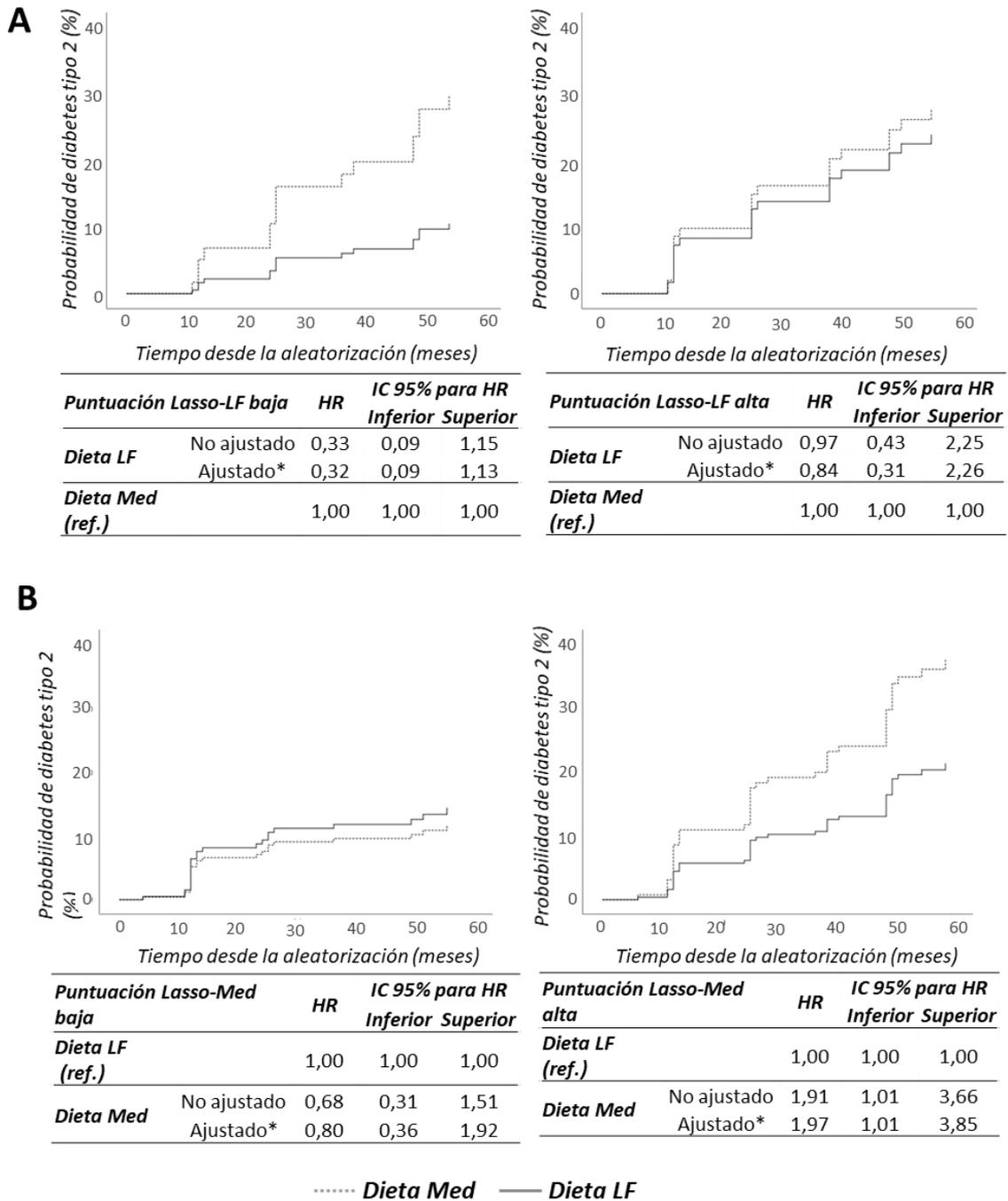


Figura 30. Probabilidad de desarrollo de DMT2 en función de la dieta evaluada por las escalas de clasificación numéricas específicas de cada dieta basadas en los modelos Lasso de la microbiota intestinal mediante un análisis de regresión de Cox. Los pacientes que consumieron cada dieta se clasificaron según los valores en las escalas de clasificación construidas para cada dieta A) Lasso-LF y B) Lasso-Med por la mediana: puntuación de riesgo baja y puntuación de riesgo alta. HR: Hazard ratio. IC: intervalo de confianza. *Este modelo se ajustó por edad, género, IMC, HDL, triglicéridos e intensidad del tratamiento con estatinas. Dieta baja en grasas (LF), línea continua. Dieta mediterránea (Med), línea punteada.

3. DISCUSIÓN-CAPÍTULO 3

Este capítulo o bloque experimental correspondiente con la publicación n°3, demostró que la composición de la microbiota intestinal basal de los pacientes que desarrollaron DMT2 consumiendo una dieta LF era diferente a la de los pacientes que desarrollaron DMT2 consumiendo una dieta Med. Estas diferencias en el perfil de la microbiota intestinal fueron el punto de partida para construir escalas de clasificación numéricas específicas de la dieta y basadas en la microbiota intestinal mediante dos enfoques (modelos RSF y Lasso) para evaluar el riesgo de DMT2, que nos permitieron determinar el riesgo individual de desarrollo de DMT2 según el consumo de las dietas LF o Med.

En los últimos años se han descubierto nuevos biomarcadores, como los miRNAs circulantes o los enfoques basados en la metabolómica para la detección precoz del riesgo de DMT2 [345], que superan el valor predictivo proporcionado por los biomarcadores clínicos tradicionales incluidos en la puntuación del test FINDRISC [346]. Si bien estos nuevos biomarcadores han mejorado la evaluación del riesgo de DMT2, no informan sobre cómo reducir el riesgo, aunque en línea con esto último, recientemente se ha demostrado que un perfil de miRNAs determina parcialmente el riesgo asociado al consumo de una dieta específica [347].

Los factores dietéticos son de suma importancia en el manejo y la prevención de la DMT2. Sin embargo, no hay consenso sobre el mejor modelo dietético, dado los diferentes efectos observados en el manejo de la DMT2 por diferentes autores, lo que sugiere que ciertos factores específicos de la población pueden determinar el éxito en la prevención de la DMT2 de una determinada terapia nutricional [54].

Estudios recientes han sugerido que la composición de la microbiota intestinal puede desempeñar un papel en las diferentes respuestas a las intervenciones dietéticas observadas [348, 349]. En este contexto, nuestro estudio sugiere que la abundancia de varios taxones bacterianos, seleccionados por los modelos RSF y Lasso, puede determinar el riesgo específico de desarrollar DMT2 en función de la dieta consumida, LF o Med. Esto también se encuentra sostenido por el hecho de que se ha sugerido que la microbiota intestinal, colabora como un órgano totalmente integrado en el metabolismo del huésped [350], actuando como un interconector entre dieta y enfermedad [351].

El análisis discriminante LEfSe ha mostrado que el perfil de la microbiota intestinal al inicio del estudio asociado con el desarrollo de la DMT2 en los pacientes que consumieron una dieta LF era diferente del observado en los pacientes que consumieron la dieta Med, lo cual apoyaría la idea de que las interacciones entre la microbiota intestinal, el metabolismo y la nutrición son importantes determinantes del estado de salud [352]. Basándonos en esto, construimos escalas de clasificación numéricas específicas de la dieta basadas en la microbiota utilizando dos enfoques (modelos RSF y Lasso), que nos permitieron determinar el riesgo individual de desarrollo de DMT2 según el consumo de una dieta LF o Med.

El análisis de regresión de Cox mostró que las puntuaciones en la escala de clasificación numérica específica para la dieta LF (puntuación RSF-LF y puntuación Lasso-LF) relacionaban el hecho de albergar un perfil de microbiota intestinal específico con el desarrollo de DMT2 cuando se consumía una dieta LF. Sin embargo, no se observó ninguna asociación entre la escala de clasificación numérica específica para la dieta LF y el desarrollo de DMT2 en aquellos pacientes que consumieron una dieta Med. Acordemente con la especificidad dietética, lo contrario se observó para la escala de clasificación numérica específica para la dieta Med (puntuación RSF-Med y puntuación Lasso-Med). Observamos una asociación con el desarrollo de DMT2 cuando se consumió una dieta Med, y ninguna asociación en pacientes que consumieron una dieta LF.

Los resultados obtenidos muestran el papel potencial del filo *Proteobacteria* en el riesgo específico de desarrollo de DMT2 asociado al consumo de una dieta LF o Med. Así, una mayor abundancia de *Proteobacteria* (o específicamente, de la clase *Gammaproteobacteria*) se asoció con un menor riesgo de desarrollo de DMT2 cuando se consumió una dieta LF. Por el contrario, una mayor abundancia de la clase *Betaproteobacteria*, perteneciente a *Proteobacteria*, se asoció con el desarrollo de DMT2 cuando se consumió una dieta Med. A diferencia de otras clases de *Proteobacteria*, como *Alfaproteobacteria* y *Deltaproteobacteria*, también presentes en nuestra población de estudio, la mayoría de los miembros de las clases *Gamma-* y *Betaproteobacteria* son quimiorganotrofos [353]. El hecho de que estas clases obtengan energía de la oxidación de compuestos orgánicos reducidos apoya su función como nexo entre la ingesta de nutrientes específicos y la fisiología del huésped, ya que estas clases pueden interactuar de manera preferente con diferentes nutrientes.

Además, el filo *Saccharibacteria* (previamente conocida como *TM7*) se ha asociado anteriormente con enfermedades infecciosas de la mucosa oral [354], lo que indica un efecto potencialmente perjudicial sobre la capa de la mucosa intestinal, el cual podría favorecer la absorción de componentes bacterianos proinflamatorios, como el LPS. Esto se encontró que era relevante cuando se consumía la dieta Med, ya que al presentar un mayor contenido en grasa que la dieta LF, y debido a que la absorción de LPS aumenta con la ingesta de grasa [355], podría explicar que una mayor abundancia del filo *Saccharibacteria* se asociara con un mayor riesgo de DMT2 cuando se consumió una dieta Med, mientras que no se observó ninguna asociación con la DMT2 cuando se consumió una dieta LF. Es conocido que la endotoxemia elevada precede al desarrollo de la DMT2 [177] e induce la resistencia hepática a la insulina [213].

Además, se observó que la abundancia de varios miembros del orden *Bacteroidales* era altamente discriminante entre el desarrollo de DMT2 y la dieta consumida. De este modo, mientras el género *Paraprevotella*, perteneciente al orden *Bacteroidales*, se asoció con el riesgo de DMT2 cuando se consumía una dieta LF, *Prevotella* (concretamente una especie bacteriana desconocida del género *Prevotella*) se asoció con el riesgo de DMT2 cuando se consumía una dieta Med. Se ha reportado previamente que la abundancia de estos dos géneros disminuye después de la cirugía de manga duodenal-endoluminal en paralelo a una mejora en la homeostasis de la glucosa [327]. En relación con estos resultados, una mayor abundancia de *Prevotella* se ha asociado tradicionalmente con el consumo de una dieta de tipo agraria, rica en frutas y verduras, mientras que la abundancia de *Bacteroides* se ha vinculado habitualmente a dietas ricas en grasas y proteínas [247, 248]. No obstante, recientemente se ha sugerido que diferentes componentes del género *Prevotella* podrían asociarse con dietas de tipo vegetal o animal [356]; pues se han observado asociaciones tanto positivas como negativas, en las que la dieta actúa como un potencial selector de los distintos miembros de *Prevotella* con funciones distintas (perjudiciales o beneficiosas) [357].

Como se ha mencionado anteriormente, diferentes miembros del género *Bacteroides* también se han asociado con dietas basadas principalmente en el consumo de alimentos derivados de plantas o animales [356]. Nuestros hallazgos muestran el posible efecto protector de dos especies bacterianas pertenecientes al género *Bacteroides*, Concretamente, *B. uniformis*, con una importante capacidad glucolítica [358], y una

especie no clasificada, cuando se consumieron las dietas LF o Med respectivamente. Teniendo en cuenta el potencial papel beneficioso de las dietas ricas en fibra y los resultados anteriores, la capacidad glucolítica para degradar carbohidratos específicos puede ser un factor determinante por el cual determinados taxones bacterianos pueden interactuar con los nutrientes ingeridos dentro de una dieta específica y ejercer un efecto beneficioso, neutro o perjudicial para el huésped.

En general, nuestros resultados apoyan la idea de que las características de la microbiota intestinal son factores determinantes que pueden estar implicados en las diferentes respuestas observadas en las intervenciones dietéticas [348, 349]. En general, nuestro estudio sugiere que cuando consideramos el perfil de la microbiota intestinal de un individuo, la capacidad de este conjunto bacteriano para interactuar con los nutrientes ingeridos tras dietas LF o Med podría determinar el desencadenamiento o no del desarrollo de la DMT2. Por lo tanto, nuestro estudio sugiere que las características de la microbiota intestinal pueden utilizarse para seleccionar un modelo dietético personalizado para prevenir la DMT2, recomendando el modelo nutricional que sea congruente con un menor riesgo.

No obstante, nuestro estudio mostró una precisión asimétrica en la evaluación del riesgo. Aunque ambos enfoques arrojaron puntuaciones para la dieta LF que discriminan con precisión un bajo riesgo asociado al consumo de la dieta LF en comparación con el consumo de la dieta Med, no se ejerce tal discriminación en los pacientes con una puntuación de alto riesgo. Lo contrario se observó para las puntuaciones de la dieta Med obtenidas por ambos enfoques, sin discriminación en los pacientes con una puntuación de bajo riesgo, pero con una discriminación precisa del alto riesgo asociado al consumo de la dieta Med en comparación con el consumo de una dieta LF. Se necesitan más estudios para mejorar el uso de la microbiota intestinal sola o combinada con otras características fisiológicas, para desarrollar una herramienta para una selección personalizada de nutrientes como terapia nutricional.

Nuestro estudio también tiene ciertas limitaciones. En primer lugar, la prevención de la DMT2 no era el objetivo principal del estudio CORDIOPREV, ya que el presente estudio es un análisis secundario realizado en el subgrupo de pacientes sin DMT2 al inicio del estudio. Además, todos los pacientes del estudio presentan CHD, lo que limita nuestros hallazgos a esta población de pacientes e impide la generalización de nuestros

resultados al conjunto de la población. Por último, el tamaño de la muestra era limitado, ya que el subgrupo de pacientes se dividió en función de la dieta y se excluyeron aquellos pacientes que habían consumido antibióticos recientemente (un mes antes de la recogida de muestra). No obstante, la prevención de la DMT2 es de vital importancia, ya que los pacientes con comorbilidad de CHD y DMT2 tienen un riesgo considerablemente mayor de desarrollar un nuevo evento cardiovascular que los que no tienen DMT2 [294]. Además, los resultados derivados de este trabajo aportan evidencias del uso potencial de las características de la microbiota intestinal, solo o en combinación con otros factores discriminantes, como herramienta para evaluar el riesgo de DMT2 asociado al consumo de una dieta específica. De esta forma, recomendar el consumo de una dieta específica asociada a un bajo riesgo de DMT2 de manera individualizada, basándonos para ello en la microbiota intestinal, podría ser una herramienta terapéutica para los pacientes de riesgo.

En resumen, los resultados de este capítulo sugieren que las diferentes interacciones de la microbiota albergada en el intestino y los nutrientes ingeridos a través de los diferentes modelos dietéticos, pueden determinar, al menos en parte, el desarrollo de la DMT2. Así lo sugieren las diferencias en la composición de la microbiota intestinal basal de los pacientes que desarrollaron DMT2 mientras consumían una dieta LF en comparación con una Med. Además, los resultados también han mostrado el uso potencial de estas diferencias en el perfil de la microbiota intestinal para construir escalas de clasificación numéricas específicas de la dieta basadas en la microbiota intestinal para evaluar el riesgo individual de DMT2 asociado a diferentes dietas, lo que podría utilizarse en la práctica clínica como una nueva herramienta para seleccionar el modelo dietético más adecuado para prevenir el desarrollo de DMT2.

IX. DISCUSIÓN GENERAL

IX. DISCUSIÓN GENERAL

La prevalencia de la DMT2 sigue creciendo abruptamente, suponiendo un problema de salud pública a nivel mundial [6, 20]. Por tanto, es crucial identificar nuevos marcadores que permitan identificar aquellos grupos de pacientes a los que se pueden aplicar con éxito recomendaciones nutricionales para prevenir o remitir la diabetes evitando con ello los tratamientos farmacológicos y las complicaciones asociadas a esta enfermedad, lo cual supondría un beneficio tanto para el paciente, como a su vez, reduciría los costes sanitarios. Además, esto es especialmente importante en pacientes con CHD, pues la DMT2 aumenta el riesgo de nuevo evento cardiovascular y de mortalidad [44, 45]. Los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que la microbiota intestinal podría ser un factor predictivo de la remisión de DMT2 inducida por el consumo de dietas saludables (como la dieta LF o Med) en pacientes con CHD, así como del desarrollo de la DMT2, mejorando la predicción cuando se adicionan a variables clínicas asociadas con el riesgo de DMT2. Además, podría determinar el riesgo asociado al consumo de distintas dietas para la elección de la dieta más recomendable para su prevención de forma individualizada.

Las evidencias actuales relacionan el desarrollo de enfermedades metabólicas, incluida la DMT2, con modificaciones en la composición de la microbiota intestinal [148, 159]. Además, la microbiota intestinal está totalmente integrada en el metabolismo del huésped, el cual modula a través de metabolitos microbianos y mediante la modificación de los ácidos biliares (formación de ácidos biliares secundarios), así como es capaz de potenciar la inflamación crónica de bajo grado y resistencia a la insulina a través de la endotoxemia metabólica [117].

La DMT2 en fases tempranas puede ser reversible. La cirugía bariátrica fue el primer hito que demostró la remisión de DMT2 [68]. La observación de una mejora metabólica de algunos pacientes solo días después de la cirugía bariátrica y antes de perder peso, indica la posible implicación del tracto gastrointestinal [54]. Los mecanismos subyacentes no están claramente elucidados, pero se ha propuesto que los cambios en la microbiota intestinal podrían estar involucrados [71] por su papel en la regulación del metabolismo, actuando colectivamente como un órgano más del huésped. Recientemente, también se ha mostrado el éxito de dietas de restricción calórica en la

remisión de DMT2 [74]. De especial interés es el hecho de que los efectos de la restricción calórica han sido asociados con la microbiota intestinal [277].

Por otro lado, la dieta es un determinante clave de la composición de la microbiota intestinal, ya que es capaz de modular la abundancia de bacterias específicas y, por tanto, afecta a las funciones individuales o colectivas de la microbiota [246]. De hecho, existe un vínculo estrecho entre dieta, microbiota intestinal, metabolismo y regulación del sistema inmunitario, todos están interconectados y se influyen mutuamente [245]. En este contexto, los efectos de una dieta determinada difieren de una persona a otra y, pueden estar influenciados por la combinación de características del huésped y de la propia estructura y composición de la microbiota intestinal, como muestran diferentes estudios que predicen con ambos datos la respuesta individual de los niveles postprandiales de glucosa tras el consumo de diferentes alimentos [280, 295].

En base a estos estudios, se ha considerado que el perfil inicial de la microbiota intestinal sería útil como factor predictivo de respuesta a intervenciones dietéticas [115]. En el primer bloque experimental de esta tesis, llevado a cabo en pacientes con CHD y con DMT2 de reciente diagnóstico, mostramos que el perfil de microbiota intestinal mejora la identificación de los pacientes que experimentan una remisión de la DMT2 mediante una intervención dietética (con dieta LF o Med) tras 5 años de seguimiento (Respondedores) y los que no respondieron a la intervención dietética (No respondedores). Además, una escala de clasificación numérica (en inglés “score”) basada en las diez géneros bacterianos con mayor poder predictivo permitió evaluar la probabilidad de remisión. Así mismo, observamos una relación inversa entre la probabilidad de remisión y el aumento postprandial de LPS, lo cual es coherente con el aumento postprandial de LPS asociado a un mayor riesgo de desarrollo DMT2 [177].

El análisis comparativo entre los pacientes Respondedores y No-Respondedores mostró que la microbiota intestinal de los Respondedores estaba caracterizado por un enriquecimiento de *Ruminococcus* (familia *Lachnospiraceae*). En línea con nuestros resultados, un estudio reciente identificó su mayor prevalencia de este género antes de la cirugía de bypass gástrico en Y de Roux en los pacientes que lograron la remisión de la DMT2, en comparación con los pacientes en los que persistió la DMT2 tras la cirugía bariátrica [302].

En el segundo bloque experimental de esta tesis, evaluamos el potencial papel que tiene la microbiota intestinal para mejorar la identificación temprana de los pacientes con CHD con alto riesgo de desarrollar DMT2. De hecho, nuestros resultados mostraron que los datos de composición de la microbiota intestinal combinados con los parámetros clínicos mejoran la predicción del desarrollo de DMT2. La relevancia de estos resultados reside en que los estudios previos transversales hasta ahora realizados no pueden demostrar de forma concluyente la causalidad de la microbiota intestinal en el desarrollo de la DMT2 [118], ya que la mayoría de ellos se realizaron en pacientes con DMT2 ya diagnosticados, cuya alteración en la microbiota intestinal podría ser causa o consecuencia de la propia enfermedad [117]. Además, la microbiota intestinal puede ser alterada por el tratamiento farmacológico antidiabético que recibían estos pacientes [150-153]. En base a esto último, los modelos obtenidos de este trabajo de tesis tienen el valor añadido de haberse realizado con muestras de microbiota años antes del diagnóstico clínico de la diabetes. Además, aunque sí que se ha descrito una alteración de la microbiota intestinal en la prediabetes y en ausencia de tratamiento hipoglucemiante para la diabetes [154, 155], no se había evaluado consistentemente el potencial de la microbiota intestinal como factor predictivo o como herramienta de evaluación del riesgo de DMT2 en estudios prospectivos.

De hecho, el rendimiento obtenido con el modelo de este trabajo de tesis mejora los modelos recientemente reportados basados en las características de la microbiota intestinal combinados con factores de riesgo tradicionales de DMT2 [154, 156], probablemente porque estos modelos predictivos se obtuvieron a partir de estudios transversales, ya que los estudios prospectivos, como el llevado a cabo en esta tesis, parecen ser más apropiados para la selección de los taxones bacterianos asociados al riesgo de diabetes y la robustez de los modelos predictivos.

En línea con los resultados de nuestro modelo, muchos estudios concuerdan en la pérdida de bacterias productoras de butirato en la microbiota intestinal de personas con prediabetes y DMT2, como por ejemplo *Faecalibacterium* [154, 159]. Esta fue una de las bacterias con mayor poder predictivo del modelo, cuya disminución se observó al inicio del estudio en el grupo de pacientes que desarrollaron DMT2 tras el periodo de seguimiento. Además, una de las bacterias de nuestro modelo que se encontró incrementada en aquellos pacientes que finalmente desarrollaron DMT2 fue *Sutterella*, la cual ha sido asociada previamente con síndrome metabólico [326] y, recientemente

también se ha observado que se encuentra incrementada en los pacientes con prediabetes [155, 359]. No obstante, otras bacterias previamente asociadas con la DMT2 no se encontraron entre las más predictivas nuestro modelo, como *Akkermansia*, *Clostridium* o *Bacteroides* [117, 157, 159].

Las bacterias con mayor poder de predicción del modelo de desarrollo de DMT2 fueron diferentes de aquellas predictivas de la remisión de DMT2 a excepción de *Faecalibacterium*, sugiriéndose coherentemente en ambas situaciones un papel beneficioso de esta bacteria. Acordemente este género se ha asociado previamente con un efecto anti-inflamatorio [360], plausiblemente mediado a través de la producción de butirato [361]. La falta de coincidencia en las bacterias de los modelos podría deberse a que realmente se están estudiando dos fenómenos clínicos diferentes. No obstante, en consonancia con nuestros resultados, un estudio reciente ha observado que existen diferencias en la microbiota intestinal entre grupos con diferentes estados glucémicos, siendo la microbiota de pacientes con DMT2 de reciente diagnóstico diferente a la microbiota de pacientes no diabéticos y prediabéticos [359].

Actualmente, la medicina y la tecnología evolucionan frenéticamente. En este contexto, en las últimas décadas la medicina personalizada se ha desarrollado en gran medida gracias a las tecnologías ómicas y la bioinformática, con el objetivo de tratar y prevenir a cada paciente de la forma más adecuada siguiendo un enfoque individualizado [59]. Basándonos en este hecho, en el tercer bloque experimental de esta tesis se han desarrollado escalas de clasificación numéricas (en inglés “scores”) que evalúan parcialmente el riesgo de desarrollar DMT2 en función del consumo de una u otra dieta. Es decir, nuestros resultados han mostrado un perfil de microbiota intestinal asociado al desarrollo de DMT2 si se consume una dieta LF, y otro perfil distinto asociado al desarrollo de DMT2 si se consume una dieta Med. Estas diferencias han servido de base para evaluar el riesgo individual de DMT2 asociado a las diferentes dietas y, podría ayudar a prevenir la DMT2 en la práctica clínica, recomendando el modelo nutricional asociado con un menor riesgo.

De hecho, dos de las bacterias inicialmente asociadas con un alto riesgo de desarrollo de DMT2 en el modelo creado conjuntamente para todos los pacientes independientemente de la dieta consumida, *Prevotella* y *Paraprevotella*, mostraron que su asociación con el riesgo de DMT2 depende de la dieta consumida. Nuestro estudio

mostró que una mayor abundancia de *Paraprevotella* se asocia con un mayor riesgo de DMT2 cuando se consume una dieta LF, mientras que una mayor abundancia de *Prevotella* se asocia con un mayor riesgo de DMT2 cuando se consume una dieta Med. Por tanto, posiblemente el efecto diferencial en términos preventivos de una determinada dieta en distintos sujetos esté influenciado por los efectos metabólicos derivados de su interacción específica con un perfil inicial de microbiota intestinal. En el caso de *Prevotella*, existen evidencias que sugieren este respecto. Ante la controversia sobre el papel beneficioso o perjudicial de esta bacteria, un reciente estudio metagenómico ha mostrado que la dieta puede seleccionar distintas cepas de *Prevotella copri* con diferentes funciones [357]. De hecho, existen cepas con mayor potencial de catabolismo de carbohidratos, sugiriéndose anteriormente su beneficio través de la producción de SCFAs, o bien cepas asociadas con la presencia del gen *leuB*, el cual interviene en la biosíntesis de BCAAs, concordante con la demostración previa de *Prevotella copri* como principal género productor de BCAAs que impulsa la asociación de estos con la resistencia a la insulina [189].

Por otro lado, estudios recientes sugieren que la composición de la microbiota inicial y su funcionalidad determinan su capacidad para metabolizar carbohidratos no digeribles específicos, lo que puede ser un factor determinante por el que las bacterias intestinales pueden interactuar específicamente con los nutrientes ingeridos a través de las diferentes dietas para ejercer un efecto metabólico beneficioso dependiente del tipo de dieta [269]. En relación con esto, se ha reportado que aquellos individuos sanos que mostraron una mejora en el metabolismo de la glucosa tras el consumo de pan a base de granos de cebada presentaron una mayor abundancia inicial de *Prevotella*, junto con una mayor representación de hidrolasas glucósidas específicas, lo que refleja la capacidad para degradar carbohidratos complejos específicos de la intervención dietética con respecto a los no respondedores [279]. Por tanto, esto apoya que los niveles de bacterias concretas podrían predecir la respuesta metabólica a un alimento o una dieta particular [281] y, por ende, el riesgo de enfermedad, de manera acorde con nuestros resultados.

No obstante, los resultados del trabajo de esta tesis tienen ciertas limitaciones, como la zona geográfica específica a la que pertenece la población, factor que influye en la variabilidad de la microbiota. También, el hecho de que el desarrollo o remisión de DMT2 no era el principal objetivo del ensayo clínico CORDIOPREV, el cual se realizó en

pacientes con CHD, lo que limita nuestros resultados a los individuos con esta enfermedad e impide la generalización de nuestros resultados al conjunto de la población.

X. CONCLUSIONES

X. CONCLUSIONES

Esta tesis doctoral ha mostrado el potencial papel de la microbiota intestinal como factor predictivo asociado al desarrollo y la remisión de la DMT2 en pacientes con CHD, mejorando la predicción cuando los datos de composición de la microbiota intestinal se combinan con las variables clínicas de riesgo clásicas. Además, la información aportada por la microbiota intestinal ha resultado ser útil para crear escalas de clasificación numéricas (en inglés “scores”) para evaluar la probabilidad de riesgo de desarrollo o remisión de DMT2, así como determinar el modelo dietético más adecuado para prevenir la DMT2 teniendo en cuenta la estructura y composición de la microbiota intestinal de cada individuo. Esta conclusión principal está respaldada por los hallazgos correspondientes a los tres capítulos o bloques experimentales de esta tesis.

1. Nuestros resultados mostraron el potencial papel de la microbiota intestinal para identificar qué pacientes con CHD y DMT2 de reciente diagnóstico se beneficiarían de una estrategia nutricional para inducir la remisión de DMT2 mediante el consumo de dietas saludables. De hecho, la combinación de los datos de composición de la microbiota intestinal a los parámetros clínicos mejoró la predicción de aquellos sujetos que experimentaron una remisión de la DMT2 mediante dos modelos dietéticos saludables. Además, una escala de clasificación numérica (en inglés “score”) basada en los diez géneros bacterianos con mayor poder predictivo permitió evaluar la probabilidad de remisión. Por lo tanto, los datos del microbioma intestinal podrían emplearse para mejorar la identificación de aquellos pacientes que con tratamiento dietético podrían remitir su diabetes. *Conclusión del Capítulo 1-publicación n°1.*
2. Nuestros resultados sugieren que existen alteraciones de la microbiota intestinal que preceden al desarrollo de la DMT2, lo que a su vez posee un gran potencial como factor predictivo ya que mejora la predicción del desarrollo de la DMT2 cuando se combina con los parámetros clínicos clásicos. Además, una escala de clasificación numérica (en inglés “score”) basada en los diez géneros bacterianos más importantes del modelo predictivo fue representativo de la probabilidad de desarrollar diabetes. Por lo tanto, el uso de los datos del microbioma podría mejorar la identificación temprana de los pacientes con riesgo de padecer DMT2. *Conclusión del Capítulo 2-publicación n°2.*

3. La microbiota intestinal es diferente entre los pacientes que desarrollaron DMT2 consumiendo una dieta LF o una dieta Med. Nuestros resultados sugieren el potencial uso de estas diferencias para construir escalas de clasificación numéricas (en inglés “scores”) específicas de una determinada dieta, lo que podría ser usado como una herramienta clínica para evaluar el riesgo individual de DMT2 asociado al consumo de diferentes dietas, y podría ayudar a seleccionar para cada paciente el mejor modelo dietético para prevenir la DMT2. *Conclusión del Capítulo 3-publicación n°3.*

XI. REFERENCIAS

XI. REFERENCIAS

1. Lakhtakia R. The history of diabetes mellitus. *Sultan Qaboos Univ Med J*. 2013;13:368-70.
2. Blaslov K, Naranda FS, Kruljac I, Renar IP. Treatment approach to type 2 diabetes: Past, present and future. *World J Diabetes*. 2018;9:209-19.
3. Barnett R. Type 1 diabetes. *The Lancet*. 2018;391:195.
4. Goldman R, Zajac J, Shrestha A, Patel P, Poretsky L. The Main Events in the History of Diabetes Mellitus. In: Poretsky L, editor. *Principles of Diabetes Mellitus*. Cham: Springer International Publishing; 2017. p. 3-19.
5. Johnson RJ, Sánchez-Lozada LG, Andrews P, Lanaspa MA. Perspective: A Historical and Scientific Perspective of Sugar and Its Relation with Obesity and Diabetes. *Adv Nutr*. 2017;8:412-22.
6. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas, 9th edn*. Brussels, Belgium 2019.
7. American Diabetes Association. *Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*. *Diabetes Care*. 2014;37(Suppl 1):S81-S90.
8. DiMeglio LA, Evans-Molina C, Oram RA. Type 1 diabetes. *The Lancet*. 2018;391:2449-62.
9. Insel RA, Dunne JL, Atkinson MA, Chiang JL, Dabelea D, Gottlieb PA, et al. Staging Presymptomatic Type 1 Diabetes: A Scientific Statement of JDRF, the Endocrine Society, and the American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 2015;38:1964-74.
10. American Diabetes Association. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2021. *Diabetes Care*. 2021;44(Suppl 1):S15-S33.
11. Chatterjee S, Khunti K, Davies MJ. Type 2 diabetes. *Lancet*. 2017;389:2239-51.
12. Johns EC, Denison FC, Norman JE, Reynolds RM. Gestational Diabetes Mellitus: Mechanisms, Treatment, and Complications. *Trends Endocrinol Metab*. 2018;29:743-54.
13. Bonora E, Tuomilehto J. The Pros and Cons of Diagnosing Diabetes With A1C. *Diabetes Care*. 2011;34:S184-S90.

14. Welsh KJ, Kirkman MS, Sacks DB. Role of Glycated Proteins in the Diagnosis and Management of Diabetes: Research Gaps and Future Directions. *Diabetes Care*. 2016;39:1299-306.
15. Kim C, Bullard KM, Herman WH, Beckles GL. Association between iron deficiency and A1C Levels among adults without diabetes in the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2006. *Diabetes Care*. 2010;33:780-5.
16. Cowie CC, Rust KF, Byrd-Holt DD, Gregg EW, Ford ES, Geiss LS, et al. Prevalence of diabetes and high risk for diabetes using A1C criteria in the U.S. population in 1988-2006. *Diabetes Care*. 2010;33:562-8.
17. Selvin E, Wang D, Matsushita K, Grams ME, Coresh J. Prognostic Implications of Single-Sample Confirmatory Testing for Undiagnosed Diabetes: A Prospective Cohort Study. *Ann Intern Med*. 2018;169:156-64.
18. Bornfeldt KE, Tabas I. Insulin resistance, hyperglycemia, and atherosclerosis. *Cell Metab*. 2011;14:575-85.
19. Kahn SE, Cooper ME, Del Prato S. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. *Lancet*. 2014;383:1068-83.
20. Zheng Y, Ley SH, Hu FB. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nat Rev Endocrinol*. 2018;14:88-98.
21. Unnikrishnan R, Pradeepa R, Joshi SR, Mohan V. Type 2 Diabetes: Demystifying the Global Epidemic. *Diabetes*. 2017;66:1432-42.
22. Hu FB. Globalization of Diabetes. The role of diet, lifestyle, and genes. 2011;34:1249-57.
23. Ruta LM, Magliano DJ, LeMesurier R, Taylor HR, Zimmet PZ, Shaw JE. Prevalence of diabetic retinopathy in Type 2 diabetes in developing and developed countries. *Diabet Med*. 2013;30:387-98.
24. Shrivastava U, Misra A. Need for ethnic-specific guidelines for prevention, diagnosis, and management of type 2 diabetes in South asians. *Diabetes Technol Ther*. 2015;17:435-9.
25. World Health Organization. *Global Health Estimates 2020: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2019*. . Geneva: World Health Organization; 2020.
26. Tancredi M, Rosengren A, Svensson A-M, Kosiborod M, Pivodic A, Gudbjörnsdóttir S, et al. Excess Mortality among Persons with Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*. 2015;373:1720-32.

27. Gregg EW, Cheng YJ, Srinivasan M, Lin J, Geiss LS, Albright AL, et al. Trends in cause-specific mortality among adults with and without diagnosed diabetes in the USA: an epidemiological analysis of linked national survey and vital statistics data. *Lancet*. 2018;391:2430-40.
28. Dal Canto E, Ceriello A, Rydén L, Ferrini M, Hansen TB, Schnell O, et al. Diabetes as a cardiovascular risk factor: An overview of global trends of macro and micro vascular complications. *Eur J Prev Cardiol*. 2019;26:25-32.
29. World Health Organization. Global report on diabetes. Geneva: World Health Organization; 2016.
30. McAllister DA, Read SH, Kerssens J, Livingstone S, McGurnaghan S, Jhund P, et al. Incidence of Hospitalization for Heart Failure and Case-Fatality Among 3.25 Million People With and Without Diabetes Mellitus. *Circulation*. 2018;138:2774-86.
31. Lee BX, Kjaerulf F, Turner S, Cohen L, Donnelly PD, Muggah R, et al. Transforming Our World: Implementing the 2030 Agenda Through Sustainable Development Goal Indicators. *J Public Health Policy*. 2016;37(Suppl 1):13-31.
32. Rojo-Martínez G, Valdés S, Soriguer F, Vendrell J, Urrutia I, Pérez V, et al. Incidence of diabetes mellitus in Spain as results of the nation-wide cohort di@bet.es study. *Sci Rep*. 2020;10:2765.
33. Reyes García R, Bernal Sobrino JL, Fernandez Pérez C, Morillas Ariño C, Azriel Mira S, Elola Somoza FJ, et al. Trends on Diabetes Mellitus's healthcare management in Spain 2007–2015. *Diabetes Res Clin Pract*. 2019;156:107824.
34. Laakso M, Kuusisto J. Insulin resistance and hyperglycaemia in cardiovascular disease development. *Nat Rev Endocrinol*. 2014;10:293-302.
35. Faselis C, Katsimardou A, Imprialos K, Deligkaris P, Kallistratos M, Dimitriadis K. Microvascular Complications of Type 2 Diabetes Mellitus. *Curr Vasc Pharmacol*. 2020;18:117-24.
36. Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of Diabetic Complications. *Physiol Rev*. 2013;93:137-88.
37. Rao Kondapally Seshasai S, Kaptoge S, Thompson A, Di Angelantonio E, Gao P, Sarwar N, et al. Diabetes mellitus, fasting glucose, and risk of cause-specific death. *N Engl J Med*. 2011;364:829-41.
38. American Diabetes Association. Economic Costs of Diabetes in the U.S. in 2017. *Diabetes Care*. 2018;41:917-28.

39. Wang CCL, Hess CN, Hiatt WR, Goldfine AB. Clinical Update: Cardiovascular Disease in Diabetes Mellitus. *Circulation*. 2016;133:2459-502.
40. Paulus WJ, Dal Canto E. Distinct Myocardial Targets for Diabetes Therapy in Heart Failure With Preserved or Reduced Ejection Fraction. *JACC: Heart Failure*. 2018;6:1-7.
41. American Diabetes Association. 10. Cardiovascular Disease and Risk Management: Standards of Medical Care in Diabetes—2021. *Diabetes Care*. 2021;44 (Suppl 1):S125-S50.
42. Lehrke M, Marx N. Diabetes Mellitus and Heart Failure. *Am J Cardiol*. 2017;120(1S):S37-s47.
43. Einarson TR, Acs A, Ludwig C, Panton UH. Prevalence of cardiovascular disease in type 2 diabetes: a systematic literature review of scientific evidence from across the world in 2007–2017. *Cardiovasc Diabetol*. 2018;17:83.
44. Cui J, Liu Y, Li Y, Xu F, Liu Y. Type 2 Diabetes and Myocardial Infarction: Recent Clinical Evidence and Perspective. *Front Cardiovasc Med*. 2021;8:644189.
45. Gholap NN, Achana FA, Davies MJ, Ray KK, Gray L, Khunti K. Long-term mortality after acute myocardial infarction among individuals with and without diabetes: A systematic review and meta-analysis of studies in the post-reperfusion era. *Diabetes Obes Metab*. 2017;19:364-74.
46. Vijan S. Type 2 Diabetes. *Ann Intern Med*. 2019;171:ITC65-ITC80.
47. Standl E, Khunti K, Hansen TB, Schnell O. The global epidemics of diabetes in the 21st century: Current situation and perspectives. *Eur J Prev Cardiol*. 2019;26:7-14.
48. de Boer IH, Rue TC, Hall YN, Heagerty PJ, Weiss NS, Himmelfarb J. Temporal trends in the prevalence of diabetic kidney disease in the United States. *JAMA*. 2011;305:2532-9.
49. Alicic RZ, Rooney MT, Tuttle KR. Diabetic Kidney Disease: Challenges, Progress, and Possibilities. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2017;12:2032-45.
50. American Diabetes Association. 11. Microvascular Complications and Foot Care: Standards of Medical Care in Diabetes—2021. *Diabetes Care*. 2021;44(Suppl 1):S151-S67.
51. Casagrande SS, Linder B, Cowie CC. Prevalence of gestational diabetes and subsequent Type 2 diabetes among U.S. women. *Diabetes Res Clin Pract*. 2018;141:200-8.

52. Lascar N, Brown J, Pattison H, Barnett AH, Bailey CJ, Bellary S. Type 2 diabetes in adolescents and young adults. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2018;6:69-80.
53. Smith AD, Crippa A, Woodcock J, Brage S. Physical activity and incident type 2 diabetes mellitus: a systematic review and dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *Diabetologia.* 2016;59:2527-45.
54. Forouhi NG, Misra A, Mohan V, Taylor R, Yancy W. Dietary and nutritional approaches for prevention and management of type 2 diabetes. *BMJ.* 2018;361:k2234.
55. Kolb H, Martin S. Environmental/lifestyle factors in the pathogenesis and prevention of type 2 diabetes. *BMC Med.* 2017;15:131.
56. Nadeau KJ, Anderson BJ, Berg EG, Chiang JL, Chou H, Copeland KC, et al. Youth-Onset Type 2 Diabetes Consensus Report: Current Status, Challenges, and Priorities. *Diabetes Care.* 2016;39:1635-42.
57. Jølle A, Midthjell K, Holmen J, Carlsen SM, Tuomilehto J, Bjørngaard JH, et al. Validity of the FINDRISC as a prediction tool for diabetes in a contemporary Norwegian population: a 10-year follow-up of the HUNT study. *BMJ Open Diabetes Res Care.* 2019;7:e000769.
58. Scirica BM. Use of Biomarkers in Predicting the Onset, Monitoring the Progression, and Risk Stratification for Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Clin Chem.* 2017;63:186-95.
59. Wang DD, Hu FB. Precision nutrition for prevention and management of type 2 diabetes. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2018;6:416-26.
60. Diabetes Prevention Program Research G. Long-term effects of lifestyle intervention or metformin on diabetes development and microvascular complications over 15-year follow-up: the Diabetes Prevention Program Outcomes Study. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2015;3:866-75.
61. American Diabetes Association. 3. Prevention or Delay of Type 2 Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2021. *Diabetes Care.* 2021;44(Suppl 1):S34-S9.
62. Leibel RL, Seeley RJ, Darsow T, Berg EG, Smith SR, Ratner R. Biologic Responses to Weight Loss and Weight Regain: Report From an American Diabetes Association Research Symposium. *Diabetes.* 2015;64:2299-309.
63. Salas-Salvadó J, Bulló M, Babio N, Martínez-González MÁ, Ibarrola-Jurado N, Basora J, et al. Reduction in the Incidence of Type 2 Diabetes With the Mediterranean Diet. *Diabetes Care.* 2011;34:14-9.

64. Ley SH, Hamdy O, Mohan V, Hu FB. Prevention and management of type 2 diabetes: dietary components and nutritional strategies. *The Lancet*. 2014;383:1999-2007.
65. Esposito K, Chiodini P, Maiorino MI, Bellastella G, Panagiotakos D, Giugliano D. Which diet for prevention of type 2 diabetes? A meta-analysis of prospective studies. *Endocrine*. 2014;47:107-16.
66. Qian F, Liu G, Hu FB, Bhupathiraju SN, Sun Q. Association Between Plant-Based Dietary Patterns and Risk of Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Intern Med*. 2019;179:1335-44.
67. Samocha-Bonet D, Debs S, Greenfield JR. Prevention and Treatment of Type 2 Diabetes: A Pathophysiological-Based Approach. *Trends Endocrinol Metab*. 2018;29:370-9.
68. Taylor R, Barnes AC. Can type 2 diabetes be reversed and how can this best be achieved? James Lind Alliance research priority number one. *Diabet Med*. 2019;36:308-15.
69. Hariri K, Guevara D, Jayaram A, Kini SU, Herron DM, Fernandez-Ranvier G. Preoperative insulin therapy as a marker for type 2 diabetes remission in obese patients after bariatric surgery. *Surg Obes Relat Dis*. 2018;14:332-7.
70. Schauer PR, Bhatt DL, Kirwan JP, Wolski K, Brethauer SA, Navaneethan SD, et al. Bariatric Surgery versus Intensive Medical Therapy for Diabetes — 3-Year Outcomes. *N Engl J Med*. 2014;370:2002-13.
71. Batterham RL, Cummings DE. Mechanisms of Diabetes Improvement Following Bariatric/Metabolic Surgery. *Diabetes Care*. 2016;39:893-901.
72. Lean ME, Leslie WS, Barnes AC, Brosnahan N, Thom G, McCombie L, et al. Primary care-led weight management for remission of type 2 diabetes (DiRECT): an open-label, cluster-randomised trial. *Lancet*. 2018;391:541-51.
73. Hallberg SJ, Gershuni VM, Hazbun TL, Athinarayanan SJ. Reversing Type 2 Diabetes: A Narrative Review of the Evidence. *Nutrients*. 2019;11:766.
74. Lean MEJ, Leslie WS, Barnes AC, Brosnahan N, Thom G, McCombie L, et al. Durability of a primary care-led weight-management intervention for remission of type 2 diabetes: 2-year results of the DiRECT open-label, cluster-randomised trial. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2019;7:344-55.
75. Abbasi J. Unveiling the “Magic” of Diabetes Remission After Weight-Loss Surgery. *JAMA*. 2017;317:571-4.

76. Jackness C, Karmally W, Febres G, Conwell IM, Ahmed L, Bessler M, et al. Very low-calorie diet mimics the early beneficial effect of Roux-en-Y gastric bypass on insulin sensitivity and β -cell Function in type 2 diabetic patients. *Diabetes*. 2013;62:3027-32.
77. Jackness C, Karmally W, Febres G, Conwell IM, Ahmed L, Bessler M, et al. Very Low-Calorie Diet Mimics the Early Beneficial Effect of Roux-en-Y Gastric Bypass on Insulin Sensitivity and β -Cell Function in Type 2 Diabetic Patients. *Diabetes*. 2013;62:3027-32.
78. Melhem S, Steven S, Taylor R, Al-Mrabeh A. Effect of Weight Loss by Low-Calorie Diet on Cardiovascular Health in Type 2 Diabetes: An Interventional Cohort Study. *Nutrients*. 2021;13:1465.
79. White MG, Shaw JAM, Taylor R. Type 2 Diabetes: The Pathologic Basis of Reversible β -Cell Dysfunction. *Diabetes Care*. 2016;39:2080-8.
80. Taylor R, Al-Mrabeh A, Zhyzhneuskaya S, Peters C, Barnes AC, Aribisala BS, et al. Remission of Human Type 2 Diabetes Requires Decrease in Liver and Pancreas Fat Content but Is Dependent upon Capacity for Beta Cell Recovery. *Cell Metab*. 2018;28:547-56.e3.
81. Al-Mrabeh A, Hollingsworth KG, Shaw JAM, McConnachie A, Sattar N, Lean MEJ, et al. 2-year remission of type 2 diabetes and pancreas morphology: a post-hoc analysis of the DiRECT open-label, cluster-randomised trial. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2020;8:939-48.
82. Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol*. 2011;11:98-107.
83. Bensellam M, Jonas J-C, Laybutt DR. Mechanisms of β -cell dedifferentiation in diabetes: recent findings and future research directions. *J Endocrinol*. 2018;236:R109-R43.
84. Lytrivi M, Castell AL, Poitout V, Cnop M. Recent Insights Into Mechanisms of β -Cell Lipo- and Glucolipototoxicity in Type 2 Diabetes. *J Mol Biol*. 2020;432:1514-34.
85. Keane KN, Cruzat VF, Carlessi R, de Bittencourt PI, Jr., Newsholme P. Molecular Events Linking Oxidative Stress and Inflammation to Insulin Resistance and β -Cell Dysfunction. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:181643.
86. Santoro A, McGraw TE, Kahn BB. Insulin action in adipocytes, adipose remodeling, and systemic effects. *Cell Metab*. 2021;33:748-57.

87. Halban PA, Polonsky KS, Bowden DW, Hawkins MA, Ling C, Mather KJ, et al. β -cell failure in type 2 diabetes: postulated mechanisms and prospects for prevention and treatment. *Diabetes Care*. 2014;37:1751-8.
88. Elsner M, Gehrman W, Lenzen S. Peroxisome-generated hydrogen peroxide as important mediator of lipotoxicity in insulin-producing cells. *Diabetes*. 2011;60:200-8.
89. Lanuza-Masdeu J, Arévalo MI, Vila C, Barberà A, Gomis R, Caelles C. In vivo JNK activation in pancreatic β -cells leads to glucose intolerance caused by insulin resistance in pancreas. *Diabetes*. 2013;62:2308-17.
90. Villalobos-Labra R, Subiabre M, Toledo F, Pardo F, Sobrevia L. Endoplasmic reticulum stress and development of insulin resistance in adipose, skeletal, liver, and foetoplacental tissue in diabetes. *Mol Aspects Med*. 2019;66:49-61.
91. Templin AT, Samarasekera T, Meier DT, Hogan MF, Mellati M, Crow MT, et al. Apoptosis Repressor With Caspase Recruitment Domain Ameliorates Amyloid-Induced β -Cell Apoptosis and JNK Pathway Activation. *Diabetes*. 2017;66:2636-45.
92. Krizhanovskii C, Fred RG, Oskarsson ME, Westermark GT, Welsh N. Addition of exogenous sodium palmitate increases the IAPP/insulin mRNA ratio via GPR40 in human EndoC- β H1 cells. *Ups J Med Sci*. 2017;122:149–59.
93. Masters SL, Dunne A, Subramanian SL, Hull RL, Tannahill GM, Sharp FA, et al. Activation of the NLRP3 inflammasome by islet amyloid polypeptide provides a mechanism for enhanced IL-1 β in type 2 diabetes. *Nat Immunol*. 2010;11:897-904.
94. Tilg H, Moschen AR. Microbiota and diabetes: an evolving relationship. *Gut*. 2014;63:1513-21.
95. Kojta I, Chacińska M, Błachnio-Zabielska A. Obesity, Bioactive Lipids, and Adipose Tissue Inflammation in Insulin Resistance. *Nutrients*. 2020;12:1305.
96. Saltiel AR, Olefsky JM. Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease. *J Clin Invest*. 2017;127:1-4.
97. Lautenbach A, Stoll F, Mann O, Busch P, Huber TB, Kielstein H, et al. Long-Term Improvement of Chronic Low-Grade Inflammation After Bariatric Surgery. *Obes Surg*. 2021;31:2913-20.
98. Lasselin J, Magne E, Beau C, Ledaguenel P, Dexpert S, Aubert A, et al. Adipose inflammation in obesity: relationship with circulating levels of inflammatory markers and association with surgery-induced weight loss. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99:E53-61.

99. Wu H, Ballantyne CM. Metabolic Inflammation and Insulin Resistance in Obesity. *Circ Res.* 2020;126:1549-64.
100. Eguchi K, Nagai R. Islet inflammation in type 2 diabetes and physiology. *J Clin Invest.* 2017;127:14-23.
101. Winer DA, Winer S, Dranse HJ, Lam TKT. Immunologic impact of the intestine in metabolic disease. *J Clin Invest.* 2017;127:33-42.
102. Mohammad S, Thiemermann C. Role of Metabolic Endotoxemia in Systemic Inflammation and Potential Interventions. *Front Immunol.* 2021;11:594150.
103. Caesar R, Tremaroli V, Kovatcheva-Datchary P, Cani PD, Bäckhed F. Crosstalk between Gut Microbiota and Dietary Lipids Aggravates WAT Inflammation through TLR Signaling. *Cell Metab.* 2015;22:658-68.
104. McLaughlin T, Ackerman SE, Shen L, Engleman E. Role of innate and adaptive immunity in obesity-associated metabolic disease. *J Clin Invest.* 2017;127:5-13.
105. Han MS, Jung DY, Morel C, Lakhani SA, Kim JK, Flavell RA, et al. JNK expression by macrophages promotes obesity-induced insulin resistance and inflammation. *Science.* 2013;339:218-22.
106. Solinas G, Becattini B. JNK at the crossroad of obesity, insulin resistance, and cell stress response. *Mol Metab.* 2016;6:174-84.
107. Odegaard JI, Chawla A. Pleiotropic Actions of Insulin Resistance and Inflammation in Metabolic Homeostasis. *Science.* 2013;339:172-7.
108. Duca FA, Bauer PV, Hamr SC, Lam TK. Glucoregulatory Relevance of Small Intestinal Nutrient Sensing in Physiology, Bariatric Surgery, and Pharmacology. *Cell Metab.* 2015;22:367-80.
109. Bauer PV, Hamr SC, Duca FA. Regulation of energy balance by a gut–brain axis and involvement of the gut microbiota. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73:737-55.
110. Drucker DJ. Mechanisms of Action and Therapeutic Application of Glucagon-like Peptide-1. *Cell Metab.* 2018;27:740-56.
111. Richards P, Parker HE, Adriaenssens AE, Hodgson JM, Cork SC, Trapp S, et al. Identification and characterization of GLP-1 receptor-expressing cells using a new transgenic mouse model. *Diabetes.* 2014;63:1224-33.
112. Mokadem M, Zechner JF, Margolskee RF, Drucker DJ, Aguirre V. Effects of Roux-en-Y gastric bypass on energy and glucose homeostasis are preserved in two mouse models of functional glucagon-like peptide-1 deficiency. *Mol Metab.* 2014;3:191-201.

113. Wilson-Pérez HE, Chambers AP, Ryan KK, Li B, Sandoval DA, Stoffers D, et al. Vertical Sleeve Gastrectomy Is Effective in Two Genetic Mouse Models of Glucagon-Like Peptide 1 Receptor Deficiency. *Diabetes*. 2013;62:2380-5.
114. Chambers AP, Kirchner H, Wilson-Perez HE, Willency JA, Hale JE, Gaylinn BD, et al. The Effects of Vertical Sleeve Gastrectomy in Rodents Are Ghrelin Independent. *Gastroenterology*. 2013;144:50-2.e5.
115. Ryan KK, Tremaroli V, Clemmensen C, Kovatcheva-Datchary P, Myronovych A, Karns R, et al. FXR is a molecular target for the effects of vertical sleeve gastrectomy. *Nature*. 2014;509:183-8.
116. Duca FA, Côté CD, Rasmussen BA, Zadeh-Tahmasebi M, Rutter GA, Filippi BM, et al. Metformin activates a duodenal Ampk-dependent pathway to lower hepatic glucose production in rats. *Nat Med*. 2015;21:506-11.
117. Fan Y, Pedersen O. Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nat Rev Microbiol*. 2021;19:55-71.
118. Meijnikman AS, Gerdes VE, Nieuwdorp M, Herrema H. Evaluating Causality of Gut Microbiota in Obesity and Diabetes in Humans. *Endocr Rev*. 2018;39:133-53.
119. Sender R, Fuchs S, Milo R. Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell*. 2016;164:337-40.
120. Li J, Jia H, Cai X, Zhong H, Feng Q, Sunagawa S, et al. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nat Biotechnol*. 2014;32:834-41.
121. Nicholson JK, Holmes E, Kinross J, Burcelin R, Gibson G, Jia W, et al. Host-Gut Microbiota Metabolic Interactions. *Science*. 2012;336:1262-7.
122. Upadhyaya S, Banerjee G. Type 2 diabetes and gut microbiome: at the intersection of known and unknown. *Gut Microbes*. 2015;6:85-92.
123. Wu J, Wang K, Wang X, Pang Y, Jiang C. The role of the gut microbiome and its metabolites in metabolic diseases. *Protein Cell*. 2021;12:360-73.
124. Brestoff JR, Artis D. Commensal bacteria at the interface of host metabolism and the immune system. *Nat Immunol*. 2013;14:676-84.
125. Chakaroun RM, Massier L, Kovacs P. Gut Microbiome, Intestinal Permeability, and Tissue Bacteria in Metabolic Disease: Perpetrators or Bystanders? *Nutrients*. 2020;12:1082.
126. Huttenhower C, Gevers D, Knight R, Abubucker S, Badger JH, Chinwalla AT, et al. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012;486:207-14.

127. Shin NR, Whon TW, Bae JW. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends Biotechnol.* 2015;33:496-503.
128. Donaldson GP, Lee SM, Mazmanian SK. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat Rev Microbiol.* 2016;14:20-32.
129. Browne HP, Forster SC, Anonye BO, Kumar N, Neville BA, Stares MD, et al. Culturing of 'unculturable' human microbiota reveals novel taxa and extensive sporulation. *Nature.* 2016;533:543-6.
130. Kakiyama G, Pandak WM, Gillevet PM, Hylemon PB, Heuman DM, Daita K, et al. Modulation of the fecal bile acid profile by gut microbiota in cirrhosis. *J Hepatol.* 2013;58:949-55.
131. Zheng D, Liwinski T, Elinav E. Interaction between microbiota and immunity in health and disease. *Cell Res.* 2020;30:492-506.
132. Saad MJ, Santos A, Prada PO. Linking Gut Microbiota and Inflammation to Obesity and Insulin Resistance. *Physiology (Bethesda).* 2016;31:283-93.
133. Tamburini S, Shen N, Wu HC, Clemente JC. The microbiome in early life: implications for health outcomes. *Nat Med.* 2016;22:713-22.
134. Stewart CJ, Ajami NJ, O'Brien JL, Hutchinson DS, Smith DP, Wong MC, et al. Temporal development of the gut microbiome in early childhood from the TEDDY study. *Nature.* 2018;562:583-8.
135. Rothschild D, Weissbrod O, Barkan E, Kurilshikov A, Korem T, Zeevi D, et al. Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota. *Nature.* 2018;555:210-5.
136. Moya A, Ferrer M. Functional Redundancy-Induced Stability of Gut Microbiota Subjected to Disturbance. *Trends Microbiol.* 2016;24:402-13.
137. Falony G, Vieira-Silva S, Raes J. Richness and ecosystem development across faecal snapshots of the gut microbiota. *Nat Microbiol.* 2018;3:526-8.
138. Quigley EMM. Gut microbiome as a clinical tool in gastrointestinal disease management: are we there yet? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017;14:315-20.
139. Hartstra AV, Bouter KE, Bäckhed F, Nieuwdorp M. Insights into the role of the microbiome in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2015;38:159-65.
140. Claesson MJ, Cusack S, O'Sullivan O, Greene-Diniz R, de Weerd H, Flannery E, et al. Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108 Suppl 1:4586-91.

141. Thingholm LB, Rühlemann MC, Koch M, Fuqua B, Laucke G, Boehm R, et al. Obese Individuals with and without Type 2 Diabetes Show Different Gut Microbial Functional Capacity and Composition. *Cell Host Microb.* 2019;26:252-64.e10.
142. McNabney SM, Henagan TM. Short Chain Fatty Acids in the Colon and Peripheral Tissues: A Focus on Butyrate, Colon Cancer, Obesity and Insulin Resistance. *Nutrients.* 2017;9:1348.
143. Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature.* 2013;500:541-6.
144. Parker BJ, Wearsch PA, Veloo ACM, Rodriguez-Palacios A. The Genus *Alistipes*: Gut Bacteria With Emerging Implications to Inflammation, Cancer, and Mental Health. *Front Immunol.* 2020;11:906.
145. Rabot S, Membrez M, Bruneau A, Gérard P, Harach T, Moser M, et al. Germ-free C57BL/6J mice are resistant to high-fat-diet-induced insulin resistance and have altered cholesterol metabolism. *FASEB J.* 2010;24:4948-59.
146. Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Cheng J, Duncan AE, Kau AL, et al. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science.* 2013;341:1241214.
147. Aron-Wisnewsky J, Clément K. The gut microbiome, diet, and links to cardiometabolic and chronic disorders. *Nat Rev Nephrol.* 2016;12:169-81.
148. Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature.* 2012;490:55-60.
149. Karlsson FH, Tremaroli V, Nookaew I, Bergström G, Behre CJ, Fagerberg B, et al. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature.* 2013;498:99-103.
150. Forslund K, Hildebrand F, Nielsen T, Falony G, Le Chatelier E, Sunagawa S, et al. Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota. *Nature.* 2015;528:262-6.
151. Wu H, Esteve E, Tremaroli V, Khan MT, Caesar R, Mannerås-Holm L, et al. Metformin alters the gut microbiome of individuals with treatment-naive type 2 diabetes, contributing to the therapeutic effects of the drug. *Nat Med.* 2017;23:850-8.
152. Olivares M, Neyrinck AM, Pötgens SA, Beaumont M, Salazar N, Cani PD, et al. The DPP-4 inhibitor vildagliptin impacts the gut microbiota and prevents disruption

- of intestinal homeostasis induced by a Western diet in mice. *Diabetologia*. 2018;61:1838-48.
153. Gu Y, Wang X, Li J, Zhang Y, Zhong H, Liu R, et al. Analyses of gut microbiota and plasma bile acids enable stratification of patients for antidiabetic treatment. *Nat Commun*. 2017;8:1785.
 154. 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 Metab*. 2020;32:379-90.e3.
 155. Allin KH, Tremaroli V, Caesar R, Jensen BAH, Damgaard MTF, Bahl MI, et al. Aberrant intestinal microbiota in individuals with prediabetes. *Diabetologia*. 2018;61:810-20.
 156. Gou W, Ling CW, He Y, Jiang Z, Fu Y, Xu F, et al. Interpretable Machine Learning Framework Reveals Robust Gut Microbiome Features Associated With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2021;44:358-66.
 157. Vrieze A, Van Nood E, Holleman F, Salojärvi J, Kootte RS, Bartelsman JF, et al. Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. *Gastroenterology*. 2012;143:913-6.e7.
 158. Kootte RS, Levin E, Salojärvi J, Smits LP, Hartstra AV, Udayappan SD, et al. Improvement of Insulin Sensitivity after Lean Donor Feces in Metabolic Syndrome Is Driven by Baseline Intestinal Microbiota Composition. *Cell Metab*. 2017;26:611-9.e6.
 159. Gurung M, Li Z, You H, Rodrigues R, Jump DB, Morgun A, et al. Role of gut microbiota in type 2 diabetes pathophysiology. *EBioMedicine*. 2020;51:102590.
 160. Depommier C, Everard A, Druart C, Plovier H, Van Hul M, Vieira-Silva S, et al. Supplementation with *Akkermansia muciniphila* in overweight and obese human volunteers: a proof-of-concept exploratory study. *Nat Med*. 2019;25:1096-103.
 161. Bordalo Tonucci L, Dos Santos KM, De Lucas Fortes Ferreira CL, Ribeiro SM, De Oliveira LL, Martino HS. Gut microbiota and probiotics: Focus on diabetes mellitus. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2017;57:2296-309.
 162. Graessler J, Qin Y, Zhong H, Zhang J, Licinio J, Wong ML, et al. Metagenomic sequencing of the human gut microbiome before and after bariatric surgery in obese patients with type 2 diabetes: correlation with inflammatory and metabolic parameters. *Pharmacogenomics J*. 2013;13:514-22.
 163. Johansson MEV, Sjövall H, Hansson GC. The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013;10:352-61.

164. 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. *Metabolism*. 2021;117:154712.
165. Thaiss CA, Levy M, Grosheva I, Zheng D, Soffer E, Blacher E, et al. Hyperglycemia drives intestinal barrier dysfunction and risk for enteric infection. *Science*. 2018;359:1376-83.
166. Mouries J, Brescia P, Silvestri A, Spadoni I, Sorribas M, Wiest R, et al. Microbiota-driven gut vascular barrier disruption is a prerequisite for non-alcoholic steatohepatitis development. *J Hepatol*. 2019;71:1216-28.
167. Trøseid M, Nestvold TK, Rudi K, Thoresen H, Nielsen EW, Lappegård KT. Plasma lipopolysaccharide is closely associated with glycemic control and abdominal obesity: evidence from bariatric surgery. *Diabetes Care*. 2013;36:3627-32.
168. Pussinen PJ, Havulinna AS, Lehto M, Sundvall J, Salomaa V. Endotoxemia is associated with an increased risk of incident diabetes. *Diabetes Care*. 2011;34:392-7.
169. Caricilli AM, Saad MJA. The Role of Gut Microbiota on Insulin Resistance. *Nutrients*. 2013;5:829-51.
170. Samuel VT, Shulman GI. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell*. 2012;148:852-71.
171. Damms-Machado A, Louis S, Schnitzer A, Volynets V, Rings A, Basrai M, et al. Gut permeability is related to body weight, fatty liver disease, and insulin resistance in obese individuals undergoing weight reduction. *Am J Clin Nutr*. 2017;105:127-35.
172. Velloso LA, Folli F, Saad MJ. TLR4 at the Crossroads of Nutrients, Gut Microbiota, and Metabolic Inflammation. *Endocr Rev*. 2015;36:245-71.
173. Ovadia H, Haim Y, Nov O, Almog O, Kovsan J, Bashan N, et al. Increased adipocyte S-nitrosylation targets anti-lipolytic action of insulin: relevance to adipose tissue dysfunction in obesity. *J Biol Chem*. 2011;286:30433-43.
174. Shinozaki S, Choi CS, Shimizu N, Yamada M, Kim M, Zhang T, et al. Liver-specific inducible nitric-oxide synthase expression is sufficient to cause hepatic insulin resistance and mild hyperglycemia in mice. *J Biol Chem*. 2011;286:34959-75.
175. Płóciennikowska A, Hromada-Judycka A, Borzęcka K, Kwiatkowska K. Cooperation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell Mol Life Sci*. 2015;72:557-81.

176. Harte AL, Varma MC, Tripathi G, McGee KC, Al-Daghri NM, Al-Attas OS, et al. High fat intake leads to acute postprandial exposure to circulating endotoxin in type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care*. 2012;35:375-82.
177. Camargo A, Jimenez-Lucena R, Alcalá-Díaz JF, Rangel-Zuñiga OA, García-Carpintero S, López-Moreno J, et al. Postprandial endotoxemia may influence the development of type 2 diabetes mellitus: From the CORDIOPREV study. *Clin Nutr*. 2019;38:529-38.
178. Hodin CM, Verdam FJ, Grootjans J, Rensen SS, Verheyen FK, Dejong CH, et al. Reduced Paneth cell antimicrobial protein levels correlate with activation of the unfolded protein response in the gut of obese individuals. *J Pathol*. 2011;225:276-84.
179. Gutzeit C, Magri G, Cerutti A. Intestinal IgA production and its role in host-microbe interaction. *Immunol Rev*. 2014;260:76-85.
180. Luck H, Khan S, Kim JH, Copeland JK, Revelo XS, Tsai S, et al. Gut-associated IgA(+) immune cells regulate obesity-related insulin resistance. *Nat Commun*. 2019;10:3650.
181. Wrzosek L, Miquel S, Noordine M-L, Bouet S, Chevalier-Curt MJ, Robert V, et al. *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Faecalibacterium prausnitzii* influence the production of mucus glycans and the development of goblet cells in the colonic epithelium of a gnotobiotic model rodent. *BMC Biology*. 2013;11:61.
182. Schroeder BO, Birchenough GMH, Ståhlman M, Arike L, Johansson MEV, Hansson GC, et al. Bifidobacteria or Fiber Protects against Diet-Induced Microbiota-Mediated Colonic Mucus Deterioration. *Cell Host Microb*. 2018;23:27-40.e7.
183. Anhe FF, Marette A. A microbial protein that alleviates metabolic syndrome. *Nat Med*. 2017;23:11-2.
184. Tannahill GM, Curtis AM, Adamik J, Palsson-McDermott EM, McGettrick AF, Goel G, et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α . *Nature*. 2013;496:238-42.
185. Jakobsdóttir G, Xu J, Molin G, Ahrné S, Nyman M. High-fat diet reduces the formation of butyrate, but increases succinate, inflammation, liver fat and cholesterol in rats, while dietary fibre counteracts these effects. *PLoS One*. 2013;8:e80476.
186. Mills EL, Pierce KA, Jedrychowski MP, Garrity R, Winther S, Vidoni S, et al. Accumulation of succinate controls activation of adipose tissue thermogenesis. *Nature*. 2018;560:102-6.

187. Koh A, Molinaro A, Ståhlman M, Khan MT, Schmidt C, Mannerås-Holm L, et al. Microbially Produced Imidazole Propionate Impairs Insulin Signaling through mTORC1. *Cell*. 2018;175:947-61.e17.
188. Wang TJ, Larson MG, Vasan RS, Cheng S, Rhee EP, McCabe E, et al. Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. *Nat Med*. 2011;17:448-53.
189. Pedersen HK, Gudmundsdottir V, Nielsen HB, Hyotylainen T, Nielsen T, Jensen BAH, et al. Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity. *Nature*. 2016;535:376-81.
190. Petersen MC, Shulman GI. Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiol Rev*. 2018;98:2133-223.
191. Sun H, Olson KC, Gao C, Prosdocimo DA, Zhou M, Wang Z, et al. Catabolic Defect of Branched-Chain Amino Acids Promotes Heart Failure. *Circulation*. 2016;133:2038-49.
192. Canfora EE, Jocken JW, Blaak EE. Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity. *Nat Rev Endocrinol*. 2015;11:577-91.
193. Tan J, McKenzie C, Potamitis M, Thorburn AN, Mackay CR, Macia L. The role of short-chain fatty acids in health and disease. *Adv Immunol*. 2014;121:91-119.
194. Morrison DJ, Preston T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes*. 2016;7:189-200.
195. Lu Y, Fan C, Li P, Lu Y, Chang X, Qi K. Short Chain Fatty Acids Prevent High-fat-diet-induced Obesity in Mice by Regulating G Protein-coupled Receptors and Gut Microbiota. *Sci Rep*. 2016;6:37589.
196. Cani PD. Human gut microbiome: hopes, threats and promises. *Gut*. 2018;67:1716-25.
197. Hu J, Lin S, Zheng B, Cheung PCK. Short-chain fatty acids in control of energy metabolism. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2018;58:1243-9.
198. Larraufie P, Martin-Gallausiaux C, Lapaque N, Dore J, Gribble FM, Reimann F, et al. SCFAs strongly stimulate PYY production in human enteroendocrine cells. *Sci Rep*. 2018;8:74.
199. Li Z, Yi CX, Katiraei S, Kooijman S, Zhou E, Chung CK, et al. Butyrate reduces appetite and activates brown adipose tissue via the gut-brain neural circuit. *Gut*. 2018;67:1269-79.

200. Freeland KR, Wolever TM. Acute effects of intravenous and rectal acetate on glucagon-like peptide-1, peptide YY, ghrelin, adiponectin and tumour necrosis factor-alpha. *Br J Nutr.* 2010;103:460-6.
201. Jiang L, Gulanski BI, De Feyter HM, Weinzimer SA, Pittman B, Guidone E, et al. Increased brain uptake and oxidation of acetate in heavy drinkers. *J Clin Invest.* 2013;123:1605-14.
202. Frost G, Sleeth ML, Sahuri-Arisoylu M, Lizarbe B, Cerdan S, Brody L, et al. The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. *Nat Commun.* 2014;5:3611.
203. Chambers ES, Viardot A, Psichas A, Morrison DJ, Murphy KG, Zac-Varghese SEK, et al. Effects of targeted delivery of propionate to the human colon on appetite regulation, body weight maintenance and adiposity in overweight adults. *Gut.* 2015;64:1744-54.
204. Tolhurst G, Heffron H, Lam YS, Parker HE, Habib AM, Diakogiannaki E, et al. Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2. *Diabetes.* 2012;61:364-71.
205. Meier JJ. GLP-1 receptor agonists for individualized treatment of type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol.* 2012;8:728-42.
206. Byndloss MX, Olsan EE, Rivera-Chávez F, Tiffany CR, Cevallos SA, Lokken KL, et al. Microbiota-activated PPAR- γ signaling inhibits dysbiotic Enterobacteriaceae expansion. *Science.* 2017;357:570-5.
207. den Besten G, Bleeker A, Gerding A, van Eunen K, Havinga R, van Dijk TH, et al. Short-Chain Fatty Acids Protect Against High-Fat Diet-Induced Obesity via a PPAR γ -Dependent Switch From Lipogenesis to Fat Oxidation. *Diabetes.* 2015;64:2398-408.
208. Sahuri-Arisoylu M, Brody LP, Parkinson JR, Parkes H, Navaratnam N, Miller AD, et al. Reprogramming of hepatic fat accumulation and 'browning' of adipose tissue by the short-chain fatty acid acetate. *Int J Obes (Lond).* 2016;40:955-63.
209. Gustafson B, Hedjazifar S, Gogg S, Hammarstedt A, Smith U. Insulin resistance and impaired adipogenesis. *Trends Endocrinol Metab.* 2015;26:193-200.
210. Tilg H, Zmora N, Adolph TE, Elinav E. The intestinal microbiota fuelling metabolic inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2020;20:40-54.
211. Yan H, Ajuwon KM. Butyrate modifies intestinal barrier function in IPEC-J2 cells through a selective upregulation of tight junction proteins and activation of the Akt signaling pathway. *PLoS One.* 2017;12:e0179586.

212. Liu B, Qian J, Wang Q, Wang F, Ma Z, Qiao Y. Butyrate protects rat liver against total hepatic ischemia reperfusion injury with bowel congestion. *PLoS One*. 2014;9:e106184.
213. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007;56:1761-72.
214. Arpaia N, Campbell C, Fan X, Dikiy S, van der Veeken J, deRoos P, et al. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature*. 2013;504:451-5.
215. Bollrath J, Powrie F. Immunology. Feed your Tregs more fiber. *Science*. 2013;341:463-4.
216. Chang PV, Hao L, Offermanns S, Medzhitov R. The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111:2247-52.
217. Ji J, Shu D, Zheng M, Wang J, Luo C, Wang Y, et al. Microbial metabolite butyrate facilitates M2 macrophage polarization and function. *Sci Rep*. 2016;6:24838.
218. Sivaprakasam S, Prasad PD, Singh N. Benefits of short-chain fatty acids and their receptors in inflammation and carcinogenesis. *Pharmacol Ther*. 2016;164:144-51.
219. Wahlström A, Sayin Sama I, Marschall H-U, Bäckhed F. Intestinal Crosstalk between Bile Acids and Microbiota and Its Impact on Host Metabolism. *Cell Metab*. 2016;24:41-50.
220. Jia W, Xie G, Jia W. Bile acid-microbiota crosstalk in gastrointestinal inflammation and carcinogenesis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018;15:111-28.
221. Zaborska K, Cummings B. Rethinking Bile Acid Metabolism and Signaling for Type 2 Diabetes Treatment. *Curr Diab Rep*. 2018;18:109.
222. Shapiro H, Kolodziejczyk AA, Halstuch D, Elinav E. Bile acids in glucose metabolism in health and disease. *The Journal of Experimental Medicine*. 2018;215:383 - 96.
223. Albaugh VL, Banan B, Ajouz H, Abumrad NN, Flynn CR. Bile acids and bariatric surgery. *Mol Aspects Med*. 2017;56:75-89.
224. Pathak P, Xie C, Nichols RG, Ferrell JM, Boehme S, Krausz KW, et al. Intestine farnesoid X receptor agonist and the gut microbiota activate G-protein bile acid receptor-1 signaling to improve metabolism. *Hepatology*. 2018;68:1574-88.

225. Izaguirre M, Gil M, Monreal I, Montecucco F, Frühbeck G, Catalán V. The Role and Potential Therapeutic Implications of the Fibroblast Growth Factors in Energy Balance and Type 2 Diabetes. *Curr Diab Rep.* 2017;17:43.
226. Jiang C, Xie C, Li F, Zhang L, Nichols RG, Krausz KW, et al. Intestinal farnesoid X receptor signaling promotes nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest.* 2015;125:386-402.
227. Ducastel S, Touche V, Trabelsi M-S, Boulinguez A, Butruille L, Nawrot M, et al. The nuclear receptor FXR inhibits Glucagon-Like Peptide-1 secretion in response to microbiota-derived Short-Chain Fatty Acids. *Sci Rep.* 2020;10:174.
228. Trabelsi M-S, Daoudi M, Prawitt J, Ducastel S, Touche V, Sayin SI, et al. Farnesoid X receptor inhibits glucagon-like peptide-1 production by enteroendocrine L cells. *Nat Commun.* 2015;6:7629.
229. Xie C, Jiang C, Shi J, Gao X, Sun D, Sun L, et al. An Intestinal Farnesoid X Receptor-Ceramide Signaling Axis Modulates Hepatic Gluconeogenesis in Mice. *Diabetes.* 2017;66:613-26.
230. Watanabe M, Horai Y, Houten SM, Morimoto K, Sugizaki T, Arita E, et al. Lowering bile acid pool size with a synthetic farnesoid X receptor (FXR) agonist induces obesity and diabetes through reduced energy expenditure. *J Biol Chem.* 2011;286:26913-20.
231. Haeusler RA, Pratt-Hyatt M, Welch CL, Klaassen CD, Accili D. Impaired generation of 12-hydroxylated bile acids links hepatic insulin signaling with dyslipidemia. *Cell Metab.* 2012;15:65-74.
232. Liu H, Hu C, Zhang X, Jia W. Role of gut microbiota, bile acids and their cross-talk in the effects of bariatric surgery on obesity and type 2 diabetes. *J Diabetes Investig.* 2018;9:13-20.
233. Nemati R, Lu J, Dokpuang D, Booth M, Plank LD, Murphy R. Increased Bile Acids and FGF19 After Sleeve Gastrectomy and Roux-en-Y Gastric Bypass Correlate with Improvement in Type 2 Diabetes in a Randomized Trial. *Obes Surg.* 2018;28:2672-86.
234. Bertaggia E, Jensen KK, Castro-Perez J, Xu Y, Paolo GD, Chan RB, et al. Cyp8b1 ablation prevents Western diet-induced weight gain and hepatic steatosis because of impaired fat absorption. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2017;313:E121-E33.
235. Gerhard GS, Styer AM, Wood GC, Roesch SL, Petrick AT, Gabrielsen J, et al. A role for fibroblast growth factor 19 and bile acids in diabetes remission after Roux-en-Y gastric bypass. *Diabetes Care.* 2013;36:1859-64.

236. McGavigan AK, Garibay D, Henseler ZM, Chen J, Bettaieb A, Haj FG, et al. TGR5 contributes to glucoregulatory improvements after vertical sleeve gastrectomy in mice. *Gut*. 2017;66:226-34.
237. Prawitt J, Caron S, Staels B. Glucose-lowering effects of intestinal bile acid sequestration through enhancement of splanchnic glucose utilization. *Trends Endocrinol Metab*. 2014;25:235-44.
238. Jørgensen NB, Dirksen C, Bojsen-Møller KN, Kristiansen VB, Wulff BS, Rainteau D, et al. Improvements in Glucose Metabolism Early After Gastric Bypass Surgery Are Not Explained by Increases in Total Bile Acids and Fibroblast Growth Factor 19 Concentrations. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100:E396-E406.
239. Steinert RE, Peterli R, Keller S, Meyer-Gerspach AC, Drewe J, Peters T, et al. Bile acids and gut peptide secretion after bariatric surgery: a 1-year prospective randomized pilot trial. *Obesity (Silver Spring)*. 2013;21:E660-8.
240. Adrian TE, Gariballa S, Parekh KA, Thomas SA, Saadi H, Al Kaabi J, et al. Rectal taurocholate increases L cell and insulin secretion, and decreases blood glucose and food intake in obese type 2 diabetic volunteers. *Diabetologia*. 2012;55:2343-7.
241. Kusaczuk M. Tauroursodeoxycholate-Bile Acid with Chaperoning Activity: Molecular and Cellular Effects and Therapeutic Perspectives. *Cells*. 2019;8:1471.
242. Hang S, Paik D, Yao L, Kim E, Trinath J, Lu J, et al. Bile acid metabolites control TH17 and Treg cell differentiation. *Nature*. 2019;576:143-8.
243. Islam KB, Fukiya S, Hagio M, Fujii N, Ishizuka S, Ooka T, et al. Bile acid is a host factor that regulates the composition of the cecal microbiota in rats. *Gastroenterology*. 2011;141:1773-81.
244. Sun L, Xie C, Wang G, Wu Y, Wu Q, Wang X, et al. Gut microbiota and intestinal FXR mediate the clinical benefits of metformin. *Nat Med*. 2018;24:1919-29.
245. Zmora N, Suez J, Elinav E. You are what you eat: diet, health and the gut microbiota. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019;16:35-56.
246. Gentile CL, Weir TL. The gut microbiota at the intersection of diet and human health. *Science*. 2018;362:776-80.
247. David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*. 2014;505:559-63.

248. Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen YY, Keilbaugh SA, et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*. 2011;334:105-8.
249. Sonnenburg JL, Bäckhed F. Diet–microbiota interactions as moderators of human metabolism. *Nature*. 2016;535:56-64.
250. Yatsunenکو T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*. 2012;486:222-7.
251. Schnorr SL, Candela M, Rampelli S, Centanni M, Consolandi C, Basaglia G, et al. Gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers. *Nat Commun*. 2014;5:3654.
252. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:14691-6.
253. Smits SA, Leach J, Sonnenburg ED, Gonzalez CG, Lichtman JS, Reid G, et al. Seasonal cycling in the gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers of Tanzania. *Science*. 2017;357:802-6.
254. Rampelli S, Schnorr SL, Consolandi C, Turróni S, Severgnini M, Peano C, et al. Metagenome Sequencing of the Hadza Hunter-Gatherer Gut Microbiota. *Curr Biol*. 2015;25:1682-93.
255. De Filippo C, Di Paola M, Ramazzotti M, Albanese D, Pieraccini G, Banci E, et al. Diet, Environments, and Gut Microbiota. A Preliminary Investigation in Children Living in Rural and Urban Burkina Faso and Italy. *Front Microbiol*. 2017;8:1979.
256. Sonnenburg ED, Smits SA, Tikhonov M, Higginbottom SK, Wingreen NS, Sonnenburg JL. Diet-induced extinctions in the gut microbiota compound over generations. *Nature*. 2016;529:212-5.
257. Anhê FF, Jensen BAH, Varin TV, Servant F, Van Blerk S, Richard D, et al. Type 2 diabetes influences bacterial tissue compartmentalisation in human obesity. *Nat Metab*. 2020;2:233-42.
258. Puértolas-Balint F, Schroeder BO. Does an Apple a Day Also Keep the Microbes Away? The Interplay Between Diet, Microbiota, and Host Defense Peptides at the Intestinal Mucosal Barrier. *Front Immunol*. 2020;11:1164.
259. Russell WR, Gratz SW, Duncan SH, Holtrop G, Ince J, Scobbie L, et al. High-protein, reduced-carbohydrate weight-loss diets promote metabolite profiles likely to be detrimental to colonic health. *Am J Clin Nutr*. 2011;93:1062-72.

260. Fava F, Gitau R, Griffin BA, Gibson GR, Tuohy KM, Lovegrove JA. The type and quantity of dietary fat and carbohydrate alter faecal microbiome and short-chain fatty acid excretion in a metabolic syndrome 'at-risk' population. *Int J Obes (Lond)*. 2013;37:216-23.
261. Haro C, Montes-Borrego M, Rangel-Zúñiga OA, Alcalá-Díaz JF, Gómez-Delgado F, Pérez-Martínez P, et al. Two Healthy Diets Modulate Gut Microbial Community Improving Insulin Sensitivity in a Human Obese Population. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101:233-42.
262. Rios-Covian D, Gueimonde M, Duncan SH, Flint HJ, de los Reyes-Gavilan CG. Enhanced butyrate formation by cross-feeding between *Faecalibacterium prausnitzii* and *Bifidobacterium adolescentis*. *FEMS Microbiol Lett*. 2015;362:fmv176.
263. Eid N, Enani S, Walton G, Corona G, Costabile A, Gibson G, et al. The impact of date palm fruits and their component polyphenols, on gut microbial ecology, bacterial metabolites and colon cancer cell proliferation. *J Nutr Sci*. 2014;3:e46.
264. Jeffery IB, O'Toole PW. Diet-microbiota interactions and their implications for healthy living. *Nutrients*. 2013;5:234-52.
265. Martínez I, Lattimer JM, Hubach KL, Case JA, Yang J, Weber CG, et al. Gut microbiome composition is linked to whole grain-induced immunological improvements. *ISME J*. 2013;7:269-80.
266. Zhong Y, Marungruang N, Fåk F, Nyman M. Effects of two whole-grain barley varieties on caecal SCFA, gut microbiota and plasma inflammatory markers in rats consuming low- and high-fat diets. *Br J Nutr*. 2015;113:1558-70.
267. Mastrocola R, Ferrocino I, Liberto E, Chiazza F, Cento AS, Collotta D, et al. Fructose liquid and solid formulations differently affect gut integrity, microbiota composition and related liver toxicity: a comparative in vivo study. *J Nutr Biochem*. 2018;55:185-99.
268. Collins KH, Paul HA, Hart DA, Reimer RA, Smith IC, Rios JL, et al. A High-Fat High-Sucrose Diet Rapidly Alters Muscle Integrity, Inflammation and Gut Microbiota in Male Rats. *Sci Rep*. 2016;6:37278.
269. Makki K, Deehan EC, Walter J, Bäckhed F. The Impact of Dietary Fiber on Gut Microbiota in Host Health and Disease. *Cell Host Microb*. 2018;23:705-15.
270. Desai MS, Seekatz AM, Koropatkin NM, Kamada N, Hickey CA, Wolter M, et al. A Dietary Fiber-Deprived Gut Microbiota Degrades the Colonic Mucus Barrier and Enhances Pathogen Susceptibility. *Cell*. 2016;167:1339-53.e21.

271. Anhê FF, Roy D, Pilon G, Dudonné S, Matamoros S, Varin TV, et al. A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased *Akkermansia* spp. population in the gut microbiota of mice. *Gut*. 2015;64:872-83.
272. Roopchand DE, Carmody RN, Kuhn P, Moskal K, Rojas-Silva P, Turnbaugh PJ, et al. Dietary Polyphenols Promote Growth of the Gut Bacterium *Akkermansia muciniphila* and Attenuate High-Fat Diet-Induced Metabolic Syndrome. *Diabetes*. 2015;64:2847-58.
273. La Rosa SL, Leth ML, Michalak L, Hansen ME, Pudlo NA, Glowacki R, et al. The human gut Firmicute *Roseburia intestinalis* is a primary degrader of dietary β -mannans. *Nat Commun*. 2019;10:905.
274. Garcia-Mantrana I, Selma-Royo M, Alcantara C, Collado MC. Shifts on Gut Microbiota Associated to Mediterranean Diet Adherence and Specific Dietary Intakes on General Adult Population. *Front Microbiol*. 2018;9:890.
275. Ruiz A, Cerdó T, Jáuregui R, Pieper DH, Marcos A, Clemente A, et al. One-year calorie restriction impacts gut microbial composition but not its metabolic performance in obese adolescents. *Environ Microbiol*. 2017;19:1536-51.
276. Wang S, Huang M, You X, Zhao J, Chen L, Wang L, et al. Gut microbiota mediates the anti-obesity effect of calorie restriction in mice. *Sci Rep*. 2018;8:13037.
277. Fabbiano S, Suárez-Zamorano N, Chevalier C, Lazarević V, Kieser S, Rigo D, et al. Functional Gut Microbiota Remodeling Contributes to the Caloric Restriction-Induced Metabolic Improvements. *Cell Metab*. 2018;28:907-21.e7.
278. Walker AW, Ince J, Duncan SH, Webster LM, Holtrop G, Ze X, et al. Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *ISME J*. 2011;5:220-30.
279. Kovatcheva-Datchary P, Nilsson A, Akrami R, Lee YS, De Vadder F, Arora T, et al. Dietary Fiber-Induced Improvement in Glucose Metabolism Is Associated with Increased Abundance of *Prevotella*. *Cell Metab*. 2015;22:971-82.
280. Zeevi D, Korem T, Zmora N, Israeli D, Rothschild D, Weinberger A, et al. Personalized Nutrition by Prediction of Glycemic Responses. *Cell*. 2015;163:1079-94.
281. Kolodziejczyk AA, Zheng D, Elinav E. Diet–microbiota interactions and personalized nutrition. *Nat Rev Microbiol*. 2019;17:742-53.

282. Avogaro A, Bonora E, Consoli A, Del Prato S, Genovese S, Giorgino F. Glucose-lowering therapy and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus and acute coronary syndrome. *Diab Vasc Dis Res.* 2019;16:399-414.
283. Delgado-Lista J, Perez-Martinez P, Garcia-Rios A, Alcala-Diaz JF, Perez-Caballero AI, Gomez-Delgado F, et al. CORonary Diet Intervention with Olive oil and cardiovascular PREVention study (the CORDIOPREV study): Rationale, methods, and baseline characteristics: A clinical trial comparing the efficacy of a Mediterranean diet rich in olive oil versus a low-fat diet on cardiovascular disease in coronary patients. *Am Heart J.* 2016;177:42-50.
284. Quintana-Navarro GM, Alcala-Diaz JF, Lopez-Moreno J, Perez-Corral I, Leon-Acuña A, Torres-Peña JD, et al. Long-term dietary adherence and changes in dietary intake in coronary patients after intervention with a Mediterranean diet or a low-fat diet: the CORDIOPREV randomized trial. *Eur J Nutr.* 2020;59:2099-110.
285. Fernández-Ballart JD, Piñol JL, Zazpe I, Corella D, Carrasco P, Toledo E, et al. Relative validity of a semi-quantitative food-frequency questionnaire in an elderly Mediterranean population of Spain. *British Journal of Nutrition.* 2010;103:1808-16.
286. Martinez-Gonzalez MA, Fernandez-Jarne E, Serrano-Martinez M, Wright M, Gomez-Gracia E. Development of a short dietary intake questionnaire for the quantitative estimation of adherence to a cardioprotective Mediterranean diet. *Eur J Clin Nutr.* 2004;58:1550-2.
287. Buse JB, Caprio S, Cefalu WT, Ceriello A, Del Prato S, Inzucchi SE, et al. How Do We Define Cure of Diabetes? *Diabetes Care.* 2009;32:2133-5.
288. Blanco-Rojo R, Alcala-Diaz JF, Wopereis S, Perez-Martinez P, Quintana-Navarro GM, Marin C, et al. The insulin resistance phenotype (muscle or liver) interacts with the type of diet to determine changes in disposition index after 2 years of intervention: the CORDIOPREV-DIAB randomised clinical trial. *Diabetologia.* 2016;59:67-76.
289. Mihos C, D. Kolovou G, P. Mikhailidis D, Kovar J, Lairon D, G. Nordestgaard B, et al. Diagnostic Value of Postprandial Triglyceride Testing in Healthy Subjects: A Meta-Analysis. *Curr Vasc Pharmacol.* 2011;9:271-80.
290. Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 2013;41:e1.
291. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods.* 2010;7:335-336.

292. McDonald D, Price MN, Goodrich J, Nawrocki EP, DeSantis TZ, Probst A, et al. An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *ISME J.* 2012;6:610-8.
293. Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* 2011;12:R60.
294. Stone NJ, Robinson JG, Lichtenstein AH, Bairey Merz CN, Blum CB, Eckel RH, et al. 2013 ACC/AHA Guideline on the Treatment of Blood Cholesterol to Reduce Atherosclerotic Cardiovascular Risk in Adults: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation.* 2014;129(Suppl 2):S1-S45.
295. Berry SE, Valdes AM, Drew DA, Asnicar F, Mazidi M, Wolf J, et al. Human postprandial responses to food and potential for precision nutrition. *Nat Med.* 2020;26:964-73.
296. Hoffmann TW, Pham H-P, Bridonneau C, Aubry C, Lamas B, Martin-Gallausiaux C, et al. Microorganisms linked to inflammatory bowel disease-associated dysbiosis differentially impact host physiology in gnotobiotic mice. *ISME J.* 2016;10:460-77.
297. Hall AB, Yassour M, Sauk J, Garner A, Jiang X, Arthur T, et al. A novel *Ruminococcus gnavus* clade enriched in inflammatory bowel disease patients. *Genome Med.* 2017;9:103.
298. Landray MJ, Haynes R, Hopewell JC, Parish S, Aung T, Tomson J, et al. Effects of extended-release niacin with laropiprant in high-risk patients. *N Engl J Med.* 2014;371:203-12.
299. Henke MT, Kenny DJ, Cassilly CD, Vlamakis H, Xavier RJ, Clardy J. *Ruminococcus gnavus*, a member of the human gut microbiome associated with Crohn's disease, produces an inflammatory polysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116:12672-7.
300. Esser N, Legrand-Poels S, Piette J, Scheen AJ, Paquot N. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2014;105:141-50.
301. Candela M, Biagi E, Soverini M, Consolandi C, Quercia S, Severgnini M, et al. Modulation of gut microbiota dysbioses in type 2 diabetic patients by macrobiotic Ma-Pi 2 diet. *Br J Nutr.* 2016;116:80-93.
302. Murphy R, Tsai P, Jüllig M, Liu A, Plank L, Booth M. Differential Changes in Gut Microbiota After Gastric Bypass and Sleeve Gastrectomy Bariatric Surgery Vary According to Diabetes Remission. *Obes Surg.* 2017;27:917-25.

303. 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;10:688-95.
304. Song JX, Ren H, Gao YF, Lee CY, Li SF, Zhang F, et al. Dietary Capsaicin Improves Glucose Homeostasis and Alters the Gut Microbiota in Obese Diabetic ob/ob Mice. *Front Physiol*. 2017;8:602.
305. Han L, Zhao L-H, Zhang M-L, Li H-T, Gao Z-Z, Zheng X-J, et al. A Novel Antidiabetic Monomers Combination Alleviates Insulin Resistance Through Bacteria-Cometabolism-Inflammation Responses. *Front Microbiol*. 2020;11:173.
306. Hasain Z, Mokhtar NM, Kamaruddin NA, Mohamed Ismail NA, Razalli NH, Gnanou JV, et al. Gut Microbiota and Gestational Diabetes Mellitus: A Review of Host-Gut Microbiota Interactions and Their Therapeutic Potential. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10:188.
307. Lim T-K, Lee HS, Lee Y-J. Triglyceride to HDL-cholesterol ratio and the incidence risk of type 2 diabetes in community dwelling adults: A longitudinal 12-year analysis of the Korean Genome and Epidemiology Study. *Diabetes Res Clin Pract*. 2020;163:108150.
308. Utzschneider KM, Kratz M, Damman CJ, Hullarg M. Mechanisms Linking the Gut Microbiome and Glucose Metabolism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101:1445-54.
309. Sato J, Kanazawa A, Ikeda F, Yoshihara T, Goto H, Abe H, et al. Gut dysbiosis and detection of "live gut bacteria" in blood of Japanese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2014;37:2343-50.
310. Long J, Cai Q, Steinwandel M, Hargreaves MK, Bordenstein SR, Blot WJ, et al. Association of oral microbiome with type 2 diabetes risk. *J Periodontal Res*. 2017;52:636-43.
311. Moreno-Indias I, Sánchez-Alcoholado L, García-Fuentes E, Cardona F, Queipo-Ortuño MI, Tinahones FJ. Insulin resistance is associated with specific gut microbiota in appendix samples from morbidly obese patients. *Am J Transl Res*. 2016;8:5672-84.
312. Xu P, Wang J, Hong F, Wang S, Jin X, Xue T, et al. Melatonin prevents obesity through modulation of gut microbiota in mice. *J Pineal Res*. 2017;62:e12399.
313. Kong C, Gao R, Yan X, Huang L, Qin H. Probiotics improve gut microbiota dysbiosis in obese mice fed a high-fat or high-sucrose diet. *Nutrition*. 2019;60:175-84.

314. Kashtanova DA, Tkacheva ON, Doudinskaya EN, Strazhesko ID, Kotovskaya YV, Popenko AS, et al. Gut Microbiota in Patients with Different Metabolic Statuses: Moscow Study. *Microorganisms*. 2018;6:98.
315. Konikoff T, Gophna U. Oscillospira: a Central, Enigmatic Component of the Human Gut Microbiota. *Trends Microbiol*. 2016;24:523-4.
316. Gophna U, Konikoff T, Nielsen HB. Oscillospira and related bacteria - From metagenomic species to metabolic features. *Environ Microbiol*. 2017;19:835-41.
317. Ishii C, Nakanishi Y, Murakami S, Nozu R, Ueno M, Hioki K, et al. A Metabologenomic Approach Reveals Changes in the Intestinal Environment of Mice Fed on American Diet. *Int J Mol Sci*. 2018;19:4079.
318. Everard A, Cani PD. Gut microbiota and GLP-1. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. 2014;15:189-96.
319. Liu G, Bei J, Liang L, Yu G, Li L, Li Q. Stachyose Improves Inflammation through Modulating Gut Microbiota of High-Fat Diet/Streptozotocin-Induced Type 2 Diabetes in Rats. *Mol Nutr Food Res*. 2018;62:e1700954.
320. Huang X, Liu G, Guo J, Su Z. The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes. *Int J Biol Sci*. 2018;14:1483-96.
321. Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, Highlander SK, Schloss PD. Development of a Dual-Index Sequencing Strategy and Curation Pipeline for Analyzing Amplicon Sequence Data on the MiSeq Illumina Sequencing Platform. *Appl Environ Microbiol*. 2013;79:5112-20.
322. Zhang Z, Kattan MW. Drawing Nomograms with R: applications to categorical outcome and survival data. *Ann Transl Med*. 2017;5:211.
323. Bennet L, Groop L, Lindblad U, Agardh CD, Franks PW. Ethnicity is an independent risk indicator when estimating diabetes risk with FINDRISC scores: A cross sectional study comparing immigrants from the Middle East and native Swedes. *Prim Care Diabetes*. 2014;8:231-8.
324. Si J, Lee C, Ko G. Oral Microbiota: Microbial Biomarkers of Metabolic Syndrome Independent of Host Genetic Factors. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7:516.
325. Kaakoush NO, Lecomte V, Maloney CA, Morris MJ. Cross-talk among metabolic parameters, esophageal microbiota, and host gene expression following chronic exposure to an obesogenic diet. *Sci Rep*. 2017;7:45753.

326. Lim MY, You HJ, Yoon HS, Kwon B, Lee JY, Lee S, et al. The effect of heritability and host genetics on the gut microbiota and metabolic syndrome. *Gut*. 2017;66:1031-8.
327. Kim T, Holleman CL, Ptacek T, Morrow CD, Habegger KM. Duodenal endoluminal barrier sleeve alters gut microbiota of ZDF rats. *Int J Obes*. 2017;41:381-9.
328. Zhang X, Zhao Y, Xu J, Xue Z, Zhang M, Pang X, et al. Modulation of gut microbiota by berberine and metformin during the treatment of high-fat diet-induced obesity in rats. *Sci Rep*. 2015;5:14405.
329. Watanabe Y, Nagai F, Morotomi M. Characterization of *Phascolarctobacterium succinatutens* sp. nov., an asaccharolytic, succinate-utilizing bacterium isolated from human feces. *Appl Environ Microbiol*. 2012;78:511-8.
330. Duncan SH, Holtrop G, Lobley GE, Calder AG, Stewart CS, Flint HJ. Contribution of acetate to butyrate formation by human faecal bacteria. *Br J Nutr*. 2007;91:915-23.
331. Derrien M, Belzer C, de Vos WM. *Akkermansia muciniphila* and its role in regulating host functions. *Microb Pathog*. 2017;106:171-81.
332. Razquin C, Toledo E, Clish CB, Ruiz-Canela M, Dennis C, Corella D, et al. Plasma Lipidomic Profiling and Risk of Type 2 Diabetes in the PREDIMED Trial. *Diabetes Care*. 2018;41:2617-24.
333. Jumas-Bilak E, Jean-Pierre H, Carlier J-P, Teyssier C, Bernard K, Gay B, et al. *Dialister micraerophilus* sp. nov. and *Dialister propionicifaciens* sp. nov., isolated from human clinical samples. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2005;55:2471-8.
334. Louis P, Flint HJ. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environ Microbiol*. 2017;19:29-41.
335. Barengolts E, Green SJ, Eisenberg Y, Akbar A, Reddivari B, Layden BT, et al. Gut microbiota varies by opioid use, circulating leptin and oxytocin in African American men with diabetes and high burden of chronic disease. *PLoS One*. 2018;13:e0194171.
336. Kaakoush NO. Insights into the Role of Erysipelotrichaceae in the Human Host. *Front Cell Infect Microbiol*. 2015;5:84.
337. Martínez I, Perdicaro DJ, Brown AW, Hammons S, Carden TJ, Carr TP, et al. Diet-induced alterations of host cholesterol metabolism are likely to affect the gut microbiota composition in hamsters. *Appl Environ Microbiol*. 2013;79:516-24.

338. Plöger S, Stumpff F, Penner GB, Schulzke J-D, Gäbel G, Martens H, et al. Microbial butyrate and its role for barrier function in the gastrointestinal tract. *Ann N Y Acad Sci.* 2012;1258:52-9.
339. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol.* 2019;37:852-7.
340. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJ, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods.* 2016;13:581-3.
341. Lozupone C, Knight R. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71:8228-35.
342. Bokulich NA, Kaehler BD, Rideout JR, Dillon M, Bolyen E, Knight R, et al. Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome.* 2018;6:90.
343. Simon N, Friedman J, Hastie T, Tibshirani R. Regularization Paths for Cox's Proportional Hazards Model via Coordinate Descent. *J Stat Softw.* 2011;39:1-13.
344. Breiman L. Random Forests. *Mach Learn.* 2001;45:5-32.
345. Jiménez-Lucena R, Rangel-Zúñiga OA, Alcalá-Díaz JF, López-Moreno J, Roncero-Ramos I, Molina-Abril H, et al. Circulating miRNAs as Predictive Biomarkers of Type 2 Diabetes Mellitus Development in Coronary Heart Disease Patients from the CORDIOPREV Study. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2018;12:146-57.
346. Schwarz P, Reimann M, Schutte A, Bergmann A, Hanefeld M, Bornstein S, et al. The Finnish Diabetes Risk Score Is Associated with Insulin Resistance and Progression towards Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;94:920-6.
347. Jimenez-Lucena R, Alcala-Diaz JF, Roncero-Ramos I, Lopez-Moreno J, Camargo A, Gomez-Delgado F, et al. MiRNAs profile as biomarkers of nutritional therapy for the prevention of type 2 diabetes mellitus: From the CORDIOPREV study. *Clin Nutr.* 2021;40:1028-38.
348. Zmora N, Zeevi D, Korem T, Segal E, Elinav E. Taking it Personally: Personalized Utilization of the Human Microbiome in Health and Disease. *Cell Host Microb.* 2016;19:12-20.
349. De Filippis F, Vitaglione P, Cuomo R, Berni Canani R, Ercolini D. Dietary Interventions to Modulate the Gut Microbiome—How Far Away Are We From Precision Medicine. *Inflamm Bowel Dis.* 2018;24:2142-54.

350. Tremaroli V, Backhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*. 2012;489:242-9.
351. Furet J-P, Kong L-C, Tap J, Poitou C, Basdevant A, Bouillot J-L, et al. Differential Adaptation of Human Gut Microbiota to Bariatric Surgery–Induced Weight Loss. *Diabetes*. 2010;59:3049.
352. Verma M, Hontecillas R, Abedi V, Leber A, Tubau-Juni N, Philipson C, et al. Modeling-Enabled Systems Nutritional Immunology. *Front Nutr*. 2016;3:5.
353. Gargaud M, Amils R, Quintanilla JC, Cleaves HJ, Irvine WM, Pinti DL, et al. *Encyclopedia of Astrobiology*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg 2015, p. 1.
354. Bor B, Bedree JK, Shi W, McLean JS, He X. Saccharibacteria (TM7) in the Human Oral Microbiome. *J Dent Res*. 2019;98:500-9.
355. Ghanim H, Abuaysheh S, Sia CL, Korzeniewski K, Chaudhuri A, Fernandez-Real JM, et al. Increase in plasma endotoxin concentrations and the expression of Toll-like receptors and suppressor of cytokine signaling-3 in mononuclear cells after a high-fat, high-carbohydrate meal: implications for insulin resistance. *Diabetes Care*. 2009;32:2281-7.
356. De Filippis F, Pellegrini N, Laghi L, Gobbetti M, Ercolini D. Unusual sub-genus associations of faecal *Prevotella* and *Bacteroides* with specific dietary patterns. *Microbiome*. 2016;4:57.
357. De Filippis F, Pasolli E, Tett A, Tarallo S, Naccarati A, De Angelis M, et al. Distinct Genetic and Functional Traits of Human Intestinal *Prevotella copri* Strains Are Associated with Different Habitual Diets. *Cell Host Microb*. 2019;25:444-53.e3.
358. Tasse L, Bercovici J, Pizzut-Serin S, Robe P, Tap J, Klopp C, et al. Functional metagenomics to mine the human gut microbiome for dietary fiber catabolic enzymes. *Genome Res*. 2010;20:1605-12.
359. Gaike AH, Paul D, Bhute S, Dhotre DP, Pande P, Upadhyaya S, et al. The Gut Microbial Diversity of Newly Diagnosed Diabetics but Not of Prediabetics Is Significantly Different from That of Healthy Nondiabetics. *mSystems*. 2020;5:e00578-19.
360. Ganesan K, Chung SK, Vanamala J, Xu B. Causal Relationship between Diet-Induced Gut Microbiota Changes and Diabetes: A Novel Strategy to Transplant *Faecalibacterium prausnitzii* in Preventing Diabetes. *Int J Mol Sci*. 2018;19:3720.
361. Bach Knudsen KE, Lærke HN, Hedemann MS, Nielsen TS, Ingerslev AK, Gundelund Nielsen DS, et al. Impact of Diet-Modulated Butyrate Production on Intestinal Barrier Function and Inflammation. *Nutrients*. 2018;10:1499.

XII. PUBLICACIONES

LETTER TO EDITOR

A microbiota-based predictive model for type 2 diabetes remission induced by dietary intervention: From the CORDIOPREV study

Dear Editor,

Type 2 diabetes is widely considered as a chronic, progressive disease that is a consequence of the seemingly inexorable decline in β -cell function.¹ However, recent studies have demonstrated that in the early stages of development, it may be reversible. Indeed, in this regard, primary support derived from patients undergoing bariatric surgery has provided the earliest evidence of type 2 diabetes remission. In fact, the normalization of plasma glucose levels can occur in some patients just days after bariatric surgical intervention, and even before achieving significant weight loss.² This observation points to a relevant glucoregulatory role of the gastrointestinal tract. It has been proposed that a number of different, but not mutually exclusive, potential mechanisms may contribute toward this effect, including changes in bile acid metabolism, gastrointestinal tract nutrient sensing and glucose utilization, incretins, and gut microbiota.³

Recent studies have shown that it is possible to induce type 2 diabetes remission by weight loss with calorie restriction interventions.⁴ Depletion of the gut microbiota with antibiotic treatment and fecal microbiota transplantation suggest that the gut microbiota plays a causal role in the beneficial effects of calorie restriction, especially by lowering body weight and hepatic lipid accumulation.⁵ Furthermore, it has been observed that calorie restriction and diabetes remission are associated with an improvement of gut permeability and a reduction in inflammatory and endotoxemia biomarkers.^{6,7}

Thus, it is noteworthy that the two approaches that, to date, are known to enable type 2 diabetes remission have plausibly suggested that a role is played by the gut microbiota. This idea is further strengthened by the reported association between this disease and the gut microbiota. Alterations in the gut microbiota of patients with type 2 diabetes have been described,⁸ which adds to the potential causal relationship between the gut microbiome and

impaired glucose metabolism, a notion which is supported by studies based on fecal transfer in patients with metabolic syndrome.⁹

Lifestyle modifications, including the implementation of healthy diets, have been shown to have a beneficial effect on type 2 diabetes prevention.¹⁰ In particular, it has been suggested that the impact of dietary intervention on metabolism is associated with baseline gut microbiota composition. Hence, microbiome biomarkers could potentially be used to identify subjects who might benefit from specific dietary interventions.¹¹

Our study, conducted in 110 newly diagnosed type 2 diabetes patients with coronary heart disease (CHD) within the Coronary Diet Intervention with Olive Oil and Cardiovascular Prevention (CORDIOPREV) study, evaluated whether baseline gut microbiota composition, in addition to the classic type 2 diabetes risk-associated variables, improves the identification of patients who underwent type 2 diabetes remission achieved by two dietary models (low-fat or Mediterranean diet) after a 5-year follow-up (responders, $n = 44$) and those who did not respond to the dietary intervention (nonresponders, $n = 66$), with both groups presenting the same adherence to both diets, and without promoting changes in lifestyle such as weight loss or medication. We observed a higher weight, body mass index, waist circumference and glucose levels, and a lower disposition index at baseline in the nonresponders than in the responders ($p < 0.05$) (Tables 1 and 2).

First of all, Linear discriminant analysis Effect Size (LEfSe) (Figure 1) showed that gut microbiota in the responders group was characterized by the *Ruminococcus* genus of the *Lachnospiraceae* family. In contrast, the baseline gut microbiota in the nonresponders group was enriched in the *Porphyromonadaceae* family and *Parabacteroides* genus. However, the bacterial richness and diversity assessed by the main α diversity indexes were similar between groups, and no significant differences were found.

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2021 The Authors. *Clinical and Translational Medicine* published by John Wiley & Sons Australia, Ltd on behalf of Shanghai Institute of Clinical Bioinformatics

TABLE 1 Baseline characteristics of the newly diagnosed type 2 diabetes population for type 2 diabetes mellitus remission study and of the population with analyzed gut microbiota

	Responders (n = 73)	Nonresponders (n = 110)	p value	Responders[†] (n = 44)	Nonresponders[†] (n = 66)	p value
Men/women	60/13	92/18	0.799	36/8	56/10	0.674
Age (years)	60.8 ± 1.0	59.3 ± 0.9	0.252	60.1 ± 1.3	57.7 ± 1.2	0.198
Weight (kg)	80.2 ± 1.3	88.4 ± 1.4	<0.001	78.2 ± 1.7	88.0 ± 1.8	<0.001
Body mass index (kg/m ²)	29.9 ± 0.4	32.1 ± 0.4	0.001	29.2 ± 0.6	31.7 ± 0.5	0.002
Waist circumference (cm)	101 ± 1	108 ± 1	<0.001	99 ± 1.3	108 ± 1.3	<0.001
Systolic blood pressure (mm Hg)	137 ± 3	138 ± 2	0.717	137 ± 3	135 ± 2	0.518
Diastolic blood pressure (mm Hg)	76.6 ± 1.6	77.1 ± 1.0	0.755	76.4 ± 2.1	76.5 ± 1.4	0.945
Triglycerides (mmol/L)	1.48 ± 0.10	1.69 ± 0.07	0.090	1.60 ± 0.15	1.71 ± 0.09	0.478
Total cholesterol (mmol/L)	4.16 ± 0.08	4.31 ± 0.08	0.203	4.24 ± 0.11	4.29 ± 0.11	0.726
HDL-cholesterol (mmol/L)	1.11 ± 0.03	1.06 ± 0.02	0.141	1.12 ± 0.05	1.04 ± 0.03	0.116
LDL cholesterol (mmol/L)	2.31 ± 0.07	2.42 ± 0.07	0.302	2.32 ± 0.10	2.35 ± 0.09	0.828
C-reactive protein (nmol/L)	37.1 ± 5.3	33.5 ± 3.6	0.558	37.8 ± 6.8	32.2 ± 4.5	0.480
HbA1c (mmol/mol)	47.8 ± 0.9	50.7 ± 0.9	0.032	48.1 ± 1.2	50.7 ± 1.3	0.176
HbA1c (%)	6.53 ± 0.08	6.79 ± 0.08	0.032	6.55 ± 0.11	6.79 ± 0.12	0.176
Glucose (mmol/L)	5.50 ± 0.09	6.58 ± 0.14	<0.001	5.59 ± 0.12	6.47 ± 0.20	0.001
Insulin (nmol/L)	64.4 ± 5.5	93.3 ± 7.8	0.007	64.8 ± 7.1	94.8 ± 11.9	0.058
HOMA-IR	3.49 ± 0.42	4.84 ± 0.32	0.010	3.93 ± 0.65	4.76 ± 0.45	0.281
Insulin sensitivity index	3.16 ± 0.20	2.37 ± 0.12	<0.001	3.02 ± 0.26	2.47 ± 0.16	0.063
Insulinogenic index	0.70 ± 0.19	0.68 ± 0.14	0.921	0.89 ± 0.26	0.80 ± 0.22	0.795
Hepatic insulin resistance index	1421 ± 168	1970 ± 129	0.009	1616 ± 263	1943 ± 182	0.293
Muscle insulin sensitivity index (×10 ²)	1.93 ± 0.22	2.20 ± 0.25	0.452	1.74 ± 0.29	2.23 ± 0.35	0.313
Disposition index	0.68 ± 0.06	0.43 ± 0.02	<0.001	0.65 ± 0.05	0.46 ± 0.03	0.002
Smoking (%)	11.4	16.7	0.440	12.3	11.8	0.917
Hypertension (%)	57.5	65.5	0.279	61.4	60.6	0.936
History of peripheral vascular disease (%)	0.0	4.5	0.065	0.0	6.1	0.096
History of stroke or TIA (%)	4.1	4.5	0.888	4.5	4.5	1.000
History of myocardial infarction (%)	53.4	55.5	0.787	56.8	57.6	0.937
History of angina (%)	40.0	39.7	0.970	38.6	36.4	0.809
History of PCI (%)	93.2	98.2	0.082	90.9	98.5	0.062
History of CABG (%)	5.5	2.7	0.342	6.8	1.5	0.146
Baseline medication (%)						
Anti-aggregates	94.5	96.4	0.550	95.5	100	0.080
Beta-blockers	57.5	65.5	0.279	56.8	68.2	0.225
ACE inhibitors	13.7	17.3	0.517	13.6	12.1	0.815
Diuretics	39.7	41.8	0.778	29.5	37.9	0.368
Angiotensin-II receptor blockers (ARBs)	20.5	23.6	0.624	22.7	19.7	0.702
Calcium antagonists	11.0	19.1	0.140	13.6	19.7	0.410
Nitrates	15.1	7.3	0.090	11.4	9.1	0.697

(Continues)

TABLE 1 (Continued)

	Responders (n = 73)	Nonresponders (n = 110)	p value	Responders[†] (n = 44)	Nonresponders[‡] (n = 66)	p value
Anti-arrhythmics	2.7	0.9	0.340	2.3	1.5	0.771
Oral anticoagulants	1.4	0.9	0.769	0.0	1.5	0.412
Statins	86.3	88.2	0.707	95.5	95.5	1.000
Other hypolipidemics	6.8	7.3	0.913	6.8	6.1	0.873
Proton pump inhibitors	83.6	82.7	0.883	86.4	89.4	0.630
Tranquilizers	6.8	8.2	0.740	9.1	10.6	0.795

Abbreviations: CABG, coronary artery bypass grafting; PCI, percutaneous coronary intervention; TIA, transient ischemic attack.

Our study was conducted in 183 newly diagnosed type 2 diabetes patients, 110 from which had available feces samples and had not received antibiotic treatment within 3 months before sample collection. Data are mean \pm SEM. Responders group: patients who reverted from type 2 diabetes after 5 years of dietary intervention follow-up. Nonresponders group: patients who remained with type 2 diabetes after 5 years of follow-up. Responders[†]: patients who reverted from type 2 diabetes after 5 years of dietary intervention follow-up to which we have the availability of fecal sample. Nonresponders[‡]: patients who remained with type 2 diabetes after 5 years of follow-up to which we have the availability of fecal sample. *p*-values were calculated by one-way ANOVA. Gender *p*-value by chi-square analysis.

TABLE 2 Baseline characteristics of the newly diagnosed type 2 diabetes population for type 2 diabetes mellitus remission study compared with the population with analyzed gut microbiota

	Responders (n = 73)	Responders[†] (n = 44)	p value	Nonresponders (n = 110)	Nonresponders[‡] (n = 66)	p value
Men/women	60/13	36/8	0.959	92/18	56/10	0.831
Age (years)	60.8 \pm 1.0	60.1 \pm 1.3	0.649	59.3 \pm 0.9	57.7 \pm 1.2	0.304
Weight (kg)	80.2 \pm 1.3	78.2 \pm 1.7	0.341	88.4 \pm 1.4	88.0 \pm 1.8	0.835
Body mass index (kg/m ²)	29.9 \pm 0.4	29.2 \pm 0.6	0.361	32.1 \pm 0.4	31.7 \pm 0.5	0.639
Waist circumference (cm)	101 \pm 1	99 \pm 1	0.304	108 \pm 1	108 \pm 1	0.725
Triglycerides (mmol/L)	1.48 \pm 0.10	1.60 \pm 0.15	0.515	1.69 \pm 0.07	1.71 \pm 0.09	0.868
Total cholesterol (mmol/L)	4.16 \pm 0.08	4.24 \pm 0.11	0.543	4.31 \pm 0.08	4.29 \pm 0.11	0.895
HDL cholesterol (mmol/L)	1.11 \pm 0.03	1.12 \pm 0.05	0.838	1.06 \pm 0.2	1.04 \pm 0.03	0.667
LDL cholesterol (mmol/L)	2.31 \pm 0.07	2.32 \pm 0.10	0.916	2.42 \pm 0.07	2.35 \pm 0.09	0.570
C-reactive protein (nmol/L)	37.1 \pm 5.3	37.8 \pm 6.8	0.938	33.5 \pm 3.6	32.2 \pm 4.5	0.832
HbA1c (mmol/mol)	47.8 \pm 0.9	48.1 \pm 1.2	0.870	50.7 \pm 0.9	50.7 \pm 1.3	0.992
HbA1c (%)	6.53 \pm 0.08	6.55 \pm 0.11	0.870	6.79 \pm 0.08	6.79 \pm 0.12	0.992
Glucose (mmol/L)	5.50 \pm 0.09	5.59 \pm 0.12	0.561	6.58 \pm 0.14	6.47 \pm 0.20	0.649
Insulin (nmol/L)	64.4 \pm 5.5	64.8 \pm 7.1	0.968	93.3 \pm 7.8	94.8 \pm 11.9	0.912
HOMA-IR	3.49 \pm 0.42	3.93 \pm 0.65	0.555	4.84 \pm 0.32	4.76 \pm 0.45	0.886
Insulin sensitivity index	3.16 \pm 0.20	3.02 \pm 0.26	0.666	2.37 \pm 0.12	2.47 \pm 0.16	0.594
Insulinogenic index	0.70 \pm 0.19	0.89 \pm 0.26	0.549	0.68 \pm 0.14	0.80 \pm 0.22	0.621
Hepatic insulin resistance index	1421 \pm 168	1616 \pm 263	0.512	1970 \pm 129	1943 \pm 182	0.904
Muscle insulin sensitivity index ($\times 10^2$)	1.93 \pm 0.22	1.74 \pm 0.29	0.583	2.20 \pm 0.25	2.23 \pm 0.35	0.920
Disposition index	0.68 \pm 0.06	0.65 \pm 0.05	0.713	0.43 \pm 0.02	0.46 \pm 0.03	0.940

Our study was conducted in 183 newly diagnosed type 2 diabetes patients, 110 from which had available feces samples and had not received antibiotic treatment within 3 months before sample collection. Data are mean \pm SEM. Responders: patients who reverted from type 2 diabetes after 5 years of dietary intervention follow-up. Responders[†]: patients who reverted from type 2 diabetes after 5 years of dietary intervention follow-up to which we have availability of fecal sample. Nonresponders: patients who remained with type 2 diabetes after 5 years of follow-up. Nonresponders[‡]: patients who remained with type 2 diabetes after 5 years of follow-up to which we have availability of fecal sample. *p*-Values were calculated by one-way ANOVA. Gender *p* value by chi-square analysis. Significant differences (*p* < 0.05).

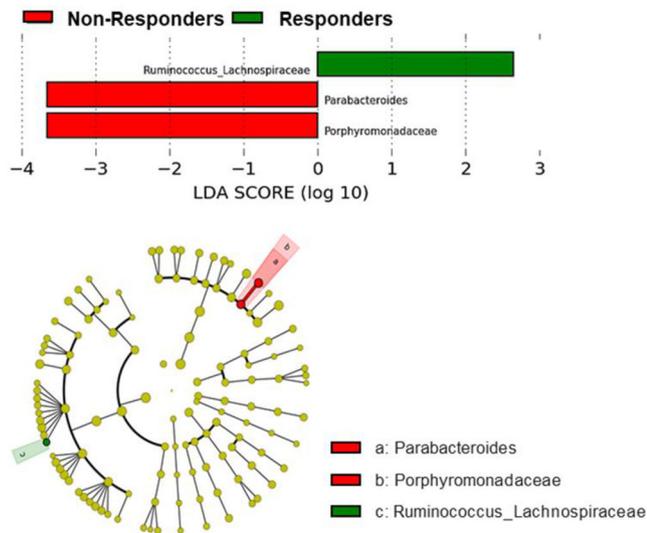


FIGURE 1 Differently abundant taxa identified using Linear discriminant analysis Effect Size (LEfSe) analysis. The most differently abundant taxa between the groups of study are represented in a bar graph according to the LDA score (log 10) and in a taxonomic cladogram. Only taxa with $p < 0.05$ and an LDA score significant threshold $| > 2|$ are shown. The responders group (green color) was characterized by the *Ruminococcus* genus of the *Lachnospiraceae* family. Nonresponders group was enriched in the *Porphyromonadaceae* family and *Parabacteroides* genus (red color). In the taxonomic cladogram, each successive circle represents a different phylogenetic level. The order (from the center outwards) is phylum, class, family, and genus levels. Differing taxa are listed on the right-hand side of the cladogram

Emerging evidence suggests that the host's metabolic response to a nutritional or dietary intervention depends on microbiome composition. In fact, a recent study showed that the gut microbiota, together with clinical, anthropometric and lifestyle data, enables us to make an accurate prediction of the postprandial glucose individual response to different foods.¹¹ Moreover, this prediction was demonstrated to be useful for designing personalized dietary interventions aimed at reducing postprandial glucose.¹¹ In order to evaluate the potential of gut microbiota composition as a predictive factor of type 2 diabetes remission, we built several random forest classifier models, which were evaluated using 10-fold cross-validation method. These analyses showed that the addition of the microbiome to the classic variables associated with diabetes risk improved our ability to differentiate between those responder individuals who would benefit from the consumption of two dietary models (low-fat or Mediterranean diet) and those whose diabetes would remain despite the dietary intervention. These models had a sensitivity of 83% and specificity of 66% (Figure 2A) and a sensitivity of 78% and specificity of 68% (Figure S1), respectively.

We also evaluated the putative role of the microbiome in evaluating the probability of dietary consumption-induced type 2 diabetes remission by COX regressions analysis. To do this, we built a response prediction score for patients based on their microbiome profile, using the 10 bacterial taxa with the highest importance in the predictive microbiome-based model, as assessed by mean decrease accuracy (MDA, Figure 2B). We evaluated the probability of type 2 diabetes remission by COX regressions of the score generated by categorizing patients into (ascending) tertiles of the microbiome-based response prediction score value (Figure 3A).

A large number of trials have demonstrated the effectiveness of weight loss or carbohydrate restriction diets, based on a change in macronutrients, to induce diabetes remission,¹² in which the ability of β -cells to recover glucose-stimulated insulin secretion seems to be crucial.⁴ This suggests that the microbiota profile is associated with β -cell functionality, as evidenced by the lack of baseline differences between responders and nonresponders when patients were classified by ascending tertiles, with the exception of the disposition index (Table S4).

In addition, we evaluated the relationship between the groups defined according to their microbiome-based response prediction score by ascending tertiles, with the tertiles of the postprandial fold-change of endotoxin lipopolysaccharide (LPS) plasma levels using the chi-square test. An inverse relationship was observed between the response prediction score and the postprandial increase of LPS. Thus, in the group of patients categorized as high-response prediction score, we found a higher percentage of patients with a low postprandial increase in LPS. The intermediate-response prediction score group was characterized by a higher percentage of patients with an intermediate postprandial increase in LPS and the low-response prediction score group was composed of a higher percentage of patients with a high postprandial increase in LPS ($\chi^2 = 0.015$) (Figure 3B).

Our study has certain limitations, such as the specific geographical area to which the population belongs, and the fact that type 2 diabetes remission was not the primary endpoint of the CORDIOPREV trial, which includes patients with CHD, thus limiting our findings to individuals with this comorbidity.

In conclusion, our results suggest that there is a gut microbiota profile associated with type 2 diabetes remission and provide compelling evidence of a potential role of the microbiome as a predictive factor for responders to diet-induced type 2 diabetes remission in newly diagnosed patients with CHD. Further studies are needed to assess gut microbiota–diet interaction in the host metabolism response and to understand the exact impact of this relationship on type 2 diabetes remission.

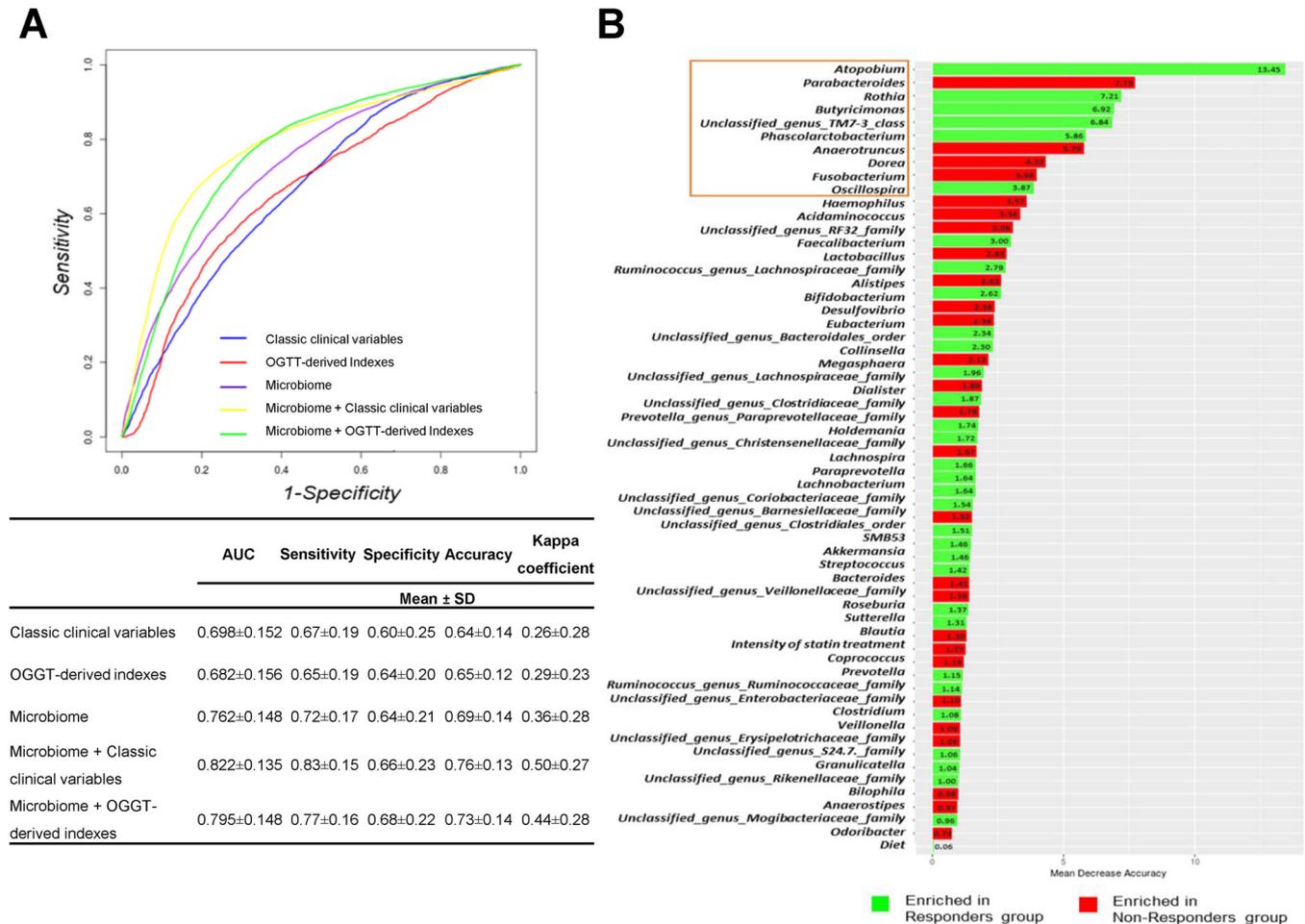


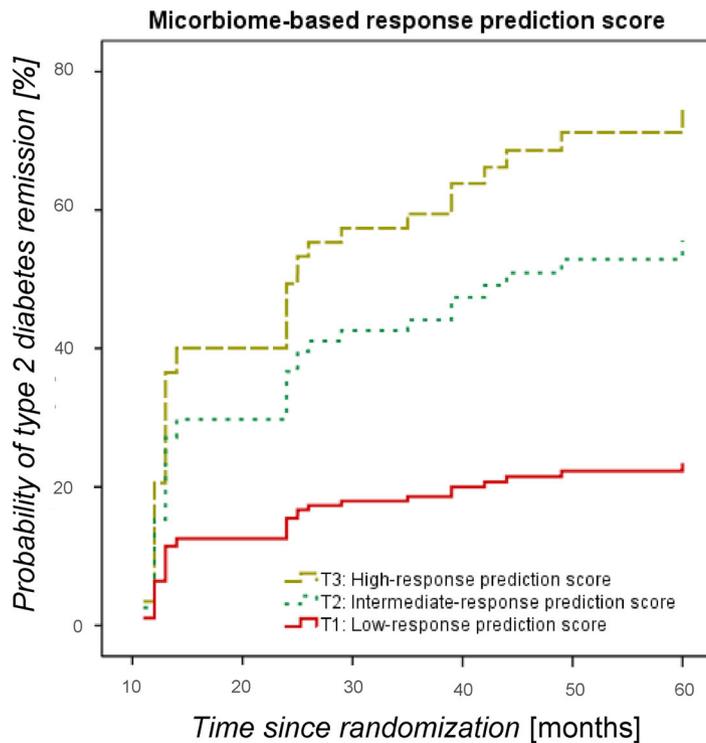
FIGURE 2 Random forest predictive models for diet consumption-induced type 2 diabetes remission. (A) Multivariate Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis based on the random forest classification models built. Data are mean \pm standard deviation (SD) and ROC curves are an average of the predictive models using a cross-validation method. The classic variables were the clinical parameters known to be risk factors for type 2 diabetes development: gender, age, body mass index, high-density lipoprotein (HDL), triglycerides, glycosylated hemoglobin, type A1C (HbA1c), physical activity, dietary consumption of fruit and vegetables, use of antihypertensive medication, and family history of diabetes; oral glucose tolerance test (OGTT)-derived indexes: homeostatic model assessment of insulin resistance, disposition index, hepatic insulin resistance index, insulin sensitivity index, muscle insulin sensitivity index, and insulinogenic index. The models were adjusted by the diet consumed (low-fat or Mediterranean diet) and intensity of statin treatment including these variables in all the models. AUC, the area under the ROC curve. (B) Variable importance values of the microbiome model, which included all the genera present in the patients' gut microbiota. The variable importance values are represented by the mean of the decrease in accuracy of the models when these taxa are removed. A higher mean decrease in accuracy or bar lengths indicates the greater importance of the variable. The top 10 most discriminant genera are highlighted with a square

ACKNOWLEDGMENTS

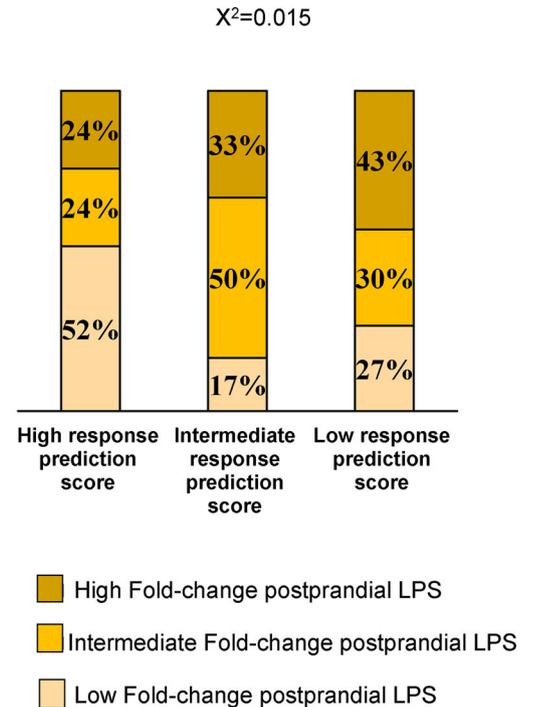
The CIBEROBN is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain. The CORDIOPREV study is supported by Ministerio de Economía y Competitividad, Spain, under grants AGL2012/39615, PIE14/00005, and PIE14/00031 to J.L.-M.; AGL2015-67896-P to J.L.-M. and A.C.; CP14/00114 to A.C.; PI19/00299 to A.C.; DTS19/00007 to A.C.; FIS PI13/00023 to J.D.-L., PI16/01777 to F.P.-J. and P.P.-M.; Fundación Patrimonio Comunal Olivarero, Junta de Andalucía (Consejería de Salud, Consejería de Agricultura y Pesca, Consejería de Innovación, Ciencia

y Empresa), Diputaciones de Jaen y Cordoba, Centro de Excelencia en Investigación sobre Aceite de Oliva y Salud and Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino, Gobierno de España; Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, Proyectos de Investigación de Excelencia, Junta de Andalucía under grant CVI-7450 to J.L.-M.; and by the Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). Antonio Camargo is supported by an ISCIII research contract (Programa Miguel-Servet CP14/00114 and CPII19/00007). J.M.O. is supported by the US Department of Agriculture, under agreement no. 8050-51000-098-00D. We want

A



B



		HR	95.0% CI	
			Lower	Upper
T1: Low response prediction score (ref.)		1.00	----	----
T2: Intermediate response prediction score	<i>Unadjusted</i>	2.195	0.986	4.888
	<i>Adjusted*</i>	2.372	1.039	5.415
	<i>Adjusted†</i>	2.604	1.069	6.344
T3: High response prediction score	<i>Unadjusted</i>	2.089	0.931	4.688
	<i>Adjusted*</i>	3.195	1.365	7.481
	<i>Adjusted†</i>	2.734	1.137	6.576

FIGURE 3 Type 2 diabetes remission according to the microbiome score. (A) Probability of type 2 diabetes remission by the dietary intervention (consumption of low-fat or Mediterranean diet) by COX regression according to the microbiome-based response prediction score. The microbiome-based response prediction score was built by adding up the mean decrease accuracy for the 10 most discriminant bacterial taxa, with a positive or negative value, according to the above protective or risk tertiles and disregarding the tertiles with neutral effect (added as 0). The detrimental or beneficial role was determined by observing a higher mean baseline abundance in nonresponders or responders, respectively. In this way, for a detrimental genus: tertile 1 was scored as 1 (protective), tertile 2 as 0 (neutral effect), and tertile 3 as -1 (risk), and the opposite for a beneficial genus: tertile 1 as -1 (risk), tertile 2 as 0 (neutral effect), and tertile 3 as 1 (protective). The data represent the response prediction score values by tertiles (ascending), T1: low-response prediction score (solid line); T2: intermediate-response prediction score (short dash); T3: high-response prediction score (long dash). *The model was adjusted by age, body mass index, gender, diet, high-density lipoprotein (HDL), triglycerides, and intensity of statin treatment. †This model was adjusted by the above variables as well as by smoking, history of myocardial infarction, history of stroke or transient ischemic attack, history of peripheral vascular disease, hypertension, history of coronary artery bypass grafting, history of percutaneous coronary intervention. (B) Relationship between microbiome-based response prediction score and postprandial increase of lipopolysaccharide (LPS) plasma levels. The relationship between the groups defined according to the microbiome-based response prediction score by ascending tertiles and the tertiles of the postprandial fold change of LPS plasma levels was analyzed using chi-square analysis

to thank the Córdoba branch of the Biobank of the Sistema Sanitario Público de Andalucía (Andalusia, Spain) for providing the human biological samples. We would also like to thank Jose Andrés Morales Martínez for his technical assistance, as well as the EASP (Escuela Andaluza de Salud Publica), Granada, Spain, which performed the randomization process for this study.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

The trial protocol and all amendments were approved by the Reina Sofia University Hospital Ethics Committee, following the Helsinki declaration and good clinical practices. All patients signed an informed consent to participate in the study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Cristina Vals-Delgado and Antonio Camargo wrote the draft manuscript. Juan F. Alcalá-Díaz and Irene Roncero-Ramos collected data and performed the classification of participants. Cristina Vals-Delgado, Irene Roncero-Ramos, Francisco M. Gutierrez-Mariscal, Silvia de la Cruz-Ares performed the experiments. Juan F. Alcalá-Díaz, Ana Leon-Acuña, and Juan L. Romero-Cabrera performed the medical revisions of participants and clinical databases. Cristina Vals-Delgado and Helena Molina-Abril performed the statistical analysis. Cristina Vals-Delgado, Antonio Camargo, and Jose Lopez-Miranda interpreted the data and contributed to the discussion. Antonio Camargo, Irene Roncero-Ramos, Ben van Ommen, Justo P. Castaño, Jose M. Ordovas, Pablo Perez-Martinez, Javier Delgado-Lista, and Jose Lopez-Miranda contributed to the writing of the manuscript and revised it critically for important intellectual content. Antonio Camargo and Jose Lopez-Miranda are the guarantors of this work and, as such, had full access to all the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The sequences obtained in this study are open available in the NCBI Sequence Read Archive (SRA) repository at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/PRJNA612599>, reference number PRJNA612599. The clinical datasets from the CORDIOPREV study used during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding authors upon reasonable request.

Cristina Vals-Delgado^{1,2,3,4,#} 

Juan F. Alcalá-Díaz^{1,2,3,4,#} 

Irene Roncero-Ramos^{1,2,3,4} 

Ana Leon-Acuña^{1,2,3,4} 

Helena Molina-Abril⁵ 

Francisco M. Gutierrez-Mariscal^{1,2,3,4} 

Juan L. Romero-Cabrera^{1,2,3,4} 

Silvia de la Cruz-Ares^{1,2,3,4} 

Ben van Ommen⁶ 

Justo P. Castaño^{4,7} 

Jose M. Ordovas^{8,9} 

Pablo Perez-Martinez^{1,2,3,4} 

Javier Delgado-Lista^{1,2,3,4} 

Antonio Camargo^{1,2,3,4,*} 

Jose Lopez-Miranda^{1,2,3,4,*} 

¹ *Lipids and Atherosclerosis Unit, Internal Medicine Unit, Reina Sofia University Hospital, Cordoba, Spain*

² *Department of Medicine, University of Cordoba, Cordoba, Spain*

³ *Maimonides Biomedical Research Institute of Cordoba (IMIBIC), Cordoba, Spain*

⁴ *CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III, Cordoba, Spain*

⁵ *Department of Applied Mathematics I, University of Seville, Seville, Spain*

⁶ *Netherlands Institute for Applied Science (TNO), Research Group Microbiology & Systems Biology, Zeist, The Netherlands*

⁷ *Department of Cell Biology, Physiology and Immunology University of Cordoba, Córdoba, Spain*

⁸ *Nutrition and Genomics Laboratory, J.M.-US Department of Agriculture Human Nutrition Research Center on Aging at Tufts University, Boston, Massachusetts, USA*

⁹ *IMDEA Alimentacion, Madrid, Spain. CNIC, Madrid, Spain*

Correspondence

Jose López-Miranda and Antonio Camargo, Department of Medicine, Lipids and Atherosclerosis Unit, GC9 Nutrigenomics, Maimonides Biomedical Research Institute of Cordoba (IMIBIC), Reina Sofia University Hospital, University of Cordoba, Av. Menendez Pidal, s/n. 14004 Córdoba, Spain.

Email: jlopezmir@uco.es; antonio.camargo@imibic.org

[#] Cristina Vals-Delgado and Juan F. Alcalá-Díaz contributed equally to this work.

^{*} Antonio Camargo and Jose Lopez-Miranda contributed equally to this work.

Clinical Trials.gov Identifier: NCT00924937; Date of registration June 19, 2009; <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00924937>.

ORCID

Cristina Vals-Delgado  <https://orcid.org/0000-0002-7564-5941>

Juan F. Alcalá-Díaz  <https://orcid.org/0000-0002-4572-3611>

Irene Roncero-Ramos  <https://orcid.org/0000-0002-3098-7788>

Ana Leon-Acuña  <https://orcid.org/0000-0003-1396-2631>

Helena Molina-Abril  <https://orcid.org/0000-0001-5595-132X>

Francisco M. Gutiérrez-Mariscal  <https://orcid.org/0000-0003-3353-2188>

Juan L. Romero-Cabrera  <https://orcid.org/0000-0001-6459-3536>

Silvia de la Cruz-Ares  <https://orcid.org/0000-0002-9013-228X>

Ben van Ommen  <https://orcid.org/0000-0002-0124-9428>

Justo P. Castaño  <https://orcid.org/0000-0002-3145-7287>

Jose M. Ordovas  <https://orcid.org/0000-0002-7581-5680>

Pablo Perez-Martinez  <https://orcid.org/0000-0001-7716-8117>

Javier Delgado-Lista  <https://orcid.org/0000-0002-2982-2716>

Antonio Camargo  <https://orcid.org/0000-0002-0415-4184>

Jose Lopez-Miranda  <https://orcid.org/0000-0002-8844-0718>

REFERENCES

1. Steven S, Hollingsworth KG, Al-Mrabeh A, et al. Very low-calorie diet and 6 months of weight stability in type 2 diabetes: pathophysiological changes in responders and nonresponders. *Diabetes Care*. 2016;39:808-815.
2. Kirwan JP, Münzberg H, Berthoud H-R. Mechanisms responsible for metabolic improvements of bariatric surgeries. *Diabetes*. 2018;67:1043-1044.

3. Batterham RL, Cummings DE. Mechanisms of diabetes improvement following bariatric/metabolic surgery. *Diabetes Care*. 2016;39:893-901.
4. Taylor R, Al-Mrabeh A, Zhyzhneuskaya S, Peters C, Barnes AC, Aribisala BS, et al. Remission of human type 2 diabetes requires decrease in liver and pancreas fat content but is dependent upon capacity for β cell recovery. *Cell Metab*. 2018;28:547-556.e3.
5. Wang S, Huang M, You X, et al. Gut microbiota mediates the anti-obesity effect of calorie restriction in mice. *Sci Rep*. 2018;8:13037.
6. Zhang L, Xue X, Zhai R, et al. Timing of calorie restriction in mice impacts host metabolic phenotype with correlative changes in gut microbiota. *mSystems*. 2019;4:e00348-19.
7. Clemente-Postigo M, Roca-Rodriguez MdM, Camargo A, Ocaña-Wilhelmi L, Cardona F, Tinahones FJ. Lipopolysaccharide and lipopolysaccharide-binding protein levels and their relationship to early metabolic improvement after bariatric surgery. *Surg Obes Relat Dis*. 2015;11:933-939.
8. Brunkwall L, Orho-Melander M. The gut microbiome as a target for prevention and treatment of hyperglycaemia in type 2 diabetes: from current human evidence to future possibilities. *Diabetologia*. 2017;60:943-951.
9. Kootte RS, Levin E, Salojärvi J, et al. Improvement of insulin sensitivity after lean donor feces in metabolic syndrome is driven by baseline intestinal microbiota composition. *Cell Metab*. 2017;26:611-619.e6.
10. American Diabetes Association. 4. Lifestyle management: standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care*. 2018;41(Suppl 1):S38-S50.
11. Zeevi D, Korem T, Zmora N, et al. Personalized nutrition by prediction of glycemic responses. *Cell*. 2015;163:1079-1094.
12. Lean MEJ, Leslie WS, Barnes AC, et al. Primary care-led weight management for remission of type 2 diabetes (DiRECT): an open-label, cluster-randomised trial. *Lancet*. 2018;391:541-551.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Journal of Advanced Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jare

An altered microbiota pattern precedes Type 2 diabetes mellitus development: From the CORDIOPREV study

Cristina Vals-Delgado ^{a,b,c,1}, Juan F. Alcala-Diaz ^{a,b,c,1}, Helena Molina-Abril ^d, Irene Roncero-Ramos ^{a,b,c}, Martien P.M. Caspers ^e, Frank H.J. Schuren ^e, Tim J. Van den Broek ^e, Raul Luque ^f, Pablo Perez-Martinez ^{a,b,c}, Niki Katsiki ^g, Javier Delgado-Lista ^{a,b,c}, Jose M. Ordovas ^{h,i}, Ben van Ommen ^e, Antonio Camargo ^{a,b,c,1,*}, Jose Lopez-Miranda ^{a,b,c,1,*}

^a Lipids and Atherosclerosis Unit, Internal Medicine Unit, Reina Sofia University Hospital, Córdoba 14004, Spain

^b Maimonides Biomedical Research Institute of Cordoba (IMIBIC)/University of Cordoba/Reina Sofia University Hospital, Córdoba 14004, Spain

^c CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III, Madrid 28029, Spain

^d Department of Applied Mathematics I, University of Seville, Seville 41012, Spain

^e Netherlands Institute for Applied Science (TNO), Research Group Microbiology & Systems Biology, Zeist NL-3704 HE, the Netherlands

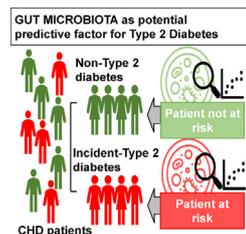
^f Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, University of Cordoba, Córdoba 14004, Spain

^g First Department of Internal Medicine, Division of Endocrinology-Metabolism, Diabetes Center, AHEPA University Hospital, Thessaloniki 546 21, Greece

^h Nutrition and Genomics Laboratory, J.M.-US Department of Agriculture Human Nutrition Research Center on Aging at Tufts University, Boston, MA 02111, United States

ⁱ IMDEA Alimentacion, Madrid, Spain

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 March 2021

Revised 7 May 2021

Accepted 9 May 2021

Available online xxxx

Keywords:

Intestinal microbiota
Type 2 diabetes mellitus
Predictive model
Coronary heart disease
CORDIOPREV

ABSTRACT

Introduction: A distinctive gut microbiome have been linked to type 2 diabetes mellitus (T2DM). We aimed to evaluate whether gut microbiota composition, in addition to clinical biomarkers, could improve the prediction of new incident cases of diabetes in patients with coronary heart disease.

Methods: All the patients from the CORDIOPREV (Clinical Trials.gov Identifier: NCT00924937) study without T2DM at baseline were included (n = 462). Overall, 107 patients developed it after a median of 60 months. The gut microbiota composition was determined by 16S rRNA gene sequencing and predictive models were created using hold-out method.

Results: A gut microbiota profile associated with T2DM development was determined through a microbiome-based predictive model. The addition of microbiome data to clinical parameters (variables included in FINDRISC risk score and the diabetes risk score of the American Diabetes Association, HDL, triglycerides and HbA1c) improved the prediction increasing the area under the curve from 0.632 to 0.946. Furthermore, a microbiome-based risk score including the ten most discriminant genera, was

Peer review under responsibility of Cairo University.

* Corresponding authors at: Lipids and Atherosclerosis Unit, Department of Medicine, Reina Sofia University Hospital, University of Cordoba, Av. Menendez Pidal, s/n, 14004 Córdoba, Spain. Tel.: 34 - 957012830, Fax: +34 - 957218250.

E-mail addresses: antonio.camargo@imibic.org (A. Camargo), jlopezmir@uco.es (J. Lopez-Miranda).

¹ Contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.jare.2021.05.001>

2090-1232/© 2021 The Authors. Published by Elsevier B.V. on behalf of Cairo University.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

associated with the probability of develop T2DM.

Conclusion: These results suggest that a microbiota profile is associated to the T2DM development. An integrate predictive model of microbiome and clinical data that can improve the prediction of T2DM is also proposed, if is validated in independent populations to prevent this disease.

© 2021 The Authors. Published by Elsevier B.V. on behalf of Cairo University. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introduction

One of the metabolic disorders with a higher incidence which has a strong public health impact worldwide is Type 2 diabetes mellitus (T2DM). Insulin resistance (IR) along with impaired beta-cell function are critical determinants of this disease [1]. Moreover, obesity has been associated with the chronic activation of inflammatory pathways causally linked to IR [2].

The concurrent presence of coronary heart disease (CHD) and T2DM significantly raises the risk of macrovascular complications and mortality [3]. It is therefore especially important to design strategies to prevent the development of this disease in patients with CHD. The current standard approaches for identifying patients at higher risk of T2DM include risk scores such as that provided by the American Diabetes Association (ADA) [4] or Finnish Diabetes Risk Score (FINDRISC) [5]. However, these tools are not always able to accurately predict the development of the disease, which varies in different ethnic and population groups [5–7]. There is therefore an urgent need to improve the early detection of T2DM risk in such patients. In this context, we recently reported that postprandial endotoxemia has a considerable potential to assess diabetes risk [6].

Our intestines harbor a vast microbial community, which interacts with the host exerting major metabolic functions. Human studies have shown that the microbiome composition determines the functionality of the gut microbiota associated with obesity and T2DM [8,9].

A growing number of cross-sectional case-control studies have appeared in past few years showing that the intestinal microbiota of diabetic patients, differs from non-diabetic individuals [8]. However, although most of the studies did not assign a causal role to the gut microbiota, and they might have also been influenced by an anti-diabetic drug, such as metformin, that has been demonstrated to modify gut microbiota composition [10], it has been recently reported that microbiota of T2DM patients is also altered in absence of diabetes treatment [11]. Furthermore, several studies showed a transitory improvement in IR following fecal transplantation from healthy individuals to patients with the metabolic syndrome (MetS) suggesting a causal function of the microbiota in T2DM [9,12].

Recently, it has been suggested the potential use of the microbiome to evaluate the risk of T2DM [13]. However, the predictive value of a microbiota profile derived from cross-sectional analysis in already diagnosed T2DM patients is limited. Nevertheless, prospective studies might improve the selection of the bacterial taxa associated with T2DM development and the robustness of the predictive models. In fact, to the best of our knowledge, no prospective studies have been conducted so far in order to identify a microbiota associated to T2DM development.

In consideration of the possible implication of the gut microbiota in the disease development, we hypothesized that an alteration of its composition might precede the development of this disease and could therefore be used as a predictive associated factor. Therefore, we aimed to evaluate whether gut microbiota composition, in addition to clinical biomarkers, could improve the prediction of new incident cases of T2DM in patients with CHD, within the CORDIOPREV study.

Patients and methods

Study patients

This study was accomplished in the context of the CORDIOPREV study (Clinicaltrials.gov NTC00924937), a prospective randomized controlled and ongoing clinical trial which included 1002 patients with CHD. Patients were randomized to receive during a period of 7 years, in addition to their pharmacological prescription for CHD, the Mediterranean (MED) or a low-fat (LF). The inclusion criteria, methodology and rationale of the trial have been previously described [14].

From the non-diabetic patients at the beginning of the CORDIOPREV study (N = 462), 107 patients were diagnosed with T2DM after a median of 60 months of follow-up. The diagnosis was assessed according to the ADA criteria [4]. From the patients included in this study during the follow-up, 17 patients died, and 7 patients dropped out without being diagnosed with diabetes. Fecal samples were available at baseline for a total of 273 patients who had not received treatment with antibiotics within 3 months before baseline sample collection; among them, 64 patients developed T2DM during the follow-up (Incident-DIAB group). **Suppl. Table S1** and **Suppl. Table S2** show the baseline characteristics of the patient groups.

Study design

The methods of the study has been previously detailed elsewhere [14]. Briefly, participants were randomized to consume two dietary patterns: a MED diet or an LF diet. The LF diet consisted of a minimum of 55% carbohydrates, 15% protein, and < 30% total fat, specifically < 10% saturated fat, 6–8% PUFA fat and 12%–14% MUFA fat. The MED diet comprised a minimum 35% of calories as fat, specifically 22% of MUFA fat, and the same percentage for the rest of fat types than the LF diet. The amount of cholesterol was < 300 mg per day for the two diets.

Dietary assessment

At baseline and every year of the study, patients were interviewed individually and face-to-face by a nutritionist to complete a previously validated in Spain with 137-items [15], semi-quantitative food frequency questionnaire, and also a validated MED diet adherence questionnaire [16].

The participants received personalized one-on-one interviews at the start and two-yearly and quarterly educational collectively sessions with nutritionists with the same intensive dietary counseling in both intervention groups.

Oral glucose tolerance test (OGTT)

An OGTT was conducted at baseline and every year thereafter to determine plasma glucose and insulin levels. Blood samples were taken before the test and at regular intervals of 30 min during 2 h after taken the glucose solution (A dilution of 75 g of glucose in 250 ml of water). Insulin sensitivity index (ISI), homeostatic

model assessment (HOMA-IR), and disposition index (DI), insulinogenic index (IGI), hepatic insulin resistance index (HIRI) and muscle insulin sensitivity index (MISI) were calculated as previously described. [17].

Ethics statement

All procedures followed were in conformity with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2008. The written informed consent to take part of the study was obtained from all patients. Reina Sofia University Hospital Ethics Committee, regional the responsible committee on human experimentation, approved the trial protocol and all amendments (No. 1496/27/03/2009).

Microbiota analysis

We used the QIAamp DNASTool Mini Kit Handbook (QIAGEN, Hilden, Germany) for the DNA extraction of fecal samples, which were collected at baseline, following the manufacturer's instructions. The 16S rRNA gene sequencing performed use the V4 hypervariable region that were amplified using the primers F515 (5'- TAT GGT AAT TGT GTG CCA GCM GCC GCG GTA A -3') and R806 (5'- AGT CAG TCA GCC GGA CTA CHV GGG TWT CTA AT -3') primers [18] to generate an amplification library. The composite of the above specific primers included Illumina adapters and a unique 8-nucleotide sample index sequence key [18]. The PCR amplification was performed using the Phusion High-Fidelity PCR Master mix (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) with 100 pg template DNA. The amplification program conducted was initial denaturation during 30 s at 98 °C; 30 cycles of amplification (10 s at 98 °C, 30 s at 55 °C and 30 s at 72 °C); and a final elongation of 5 min at 72 °C. PCR products were examined on a Fragment Analyzer (Advanced Analytical Technologies Inc., Ankeny, IA, USA) to estimate DNA concentration. The amplicon libraries were pooled in equimolar amounts and purified utilizing in a first step with the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) and then Agencourt AMPure magnetic beads (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). DNA concentration of the pool was calculated on a fluorometer applying the Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

The purified bar-coded amplicons obtained were paired-end sequenced using the Illumina MiSeq platform (Illumina Technologies, San Diego, CA, USA) using 2 × 250 cycle paired-end settings. The sequence data was processed and analyzed using Mothur version 1.36.1. The taxonomic identification was conducted employing the Ribosomal Database Project (RDP) tool and the SILVA 16S rRNA gene database up to the level of the genera. To exclude any bacterial taxa that were not detected in most of the samples, a cut-off for exclusion was set; only bacterial taxa containing sequence readings in at least 75% of total samples were considered.

Predictive models development

A random forest classifier was performed by hold-out analysis using the script of the caret package in R, in which the model was trained on 70% of the data and the remaining 30% for testing to prevent overfitting. Other machine learning methods such as Support Vector Machine and Neural Networks were also tested, throwing worse results than the random forest classifier. To obtain more precise curves and assess the performance of the models on unseen data, we used repeated 10-fold cross-validation that consists of ten train and test splits, so that each data has been used in the test set once. The cross-validation error curves (average of ten validation sets each) and performance were averaged. The predictive value of each variable in the random forest models was calculated by Mean Decrease in Accuracy. The model's performance

was further evaluated through the AUC on the test set. pROC R package was used to calculate the confidence intervals for ROC curves.

Microbiota-based risk score development

We created a risk score based on patients' microbiome profile from the ten bacterial taxa with the highest importance on a microbiome-based predictive model. The predictive importance was assessed by Mean Decrease Accuracy values. We categorized patients according to the abundance of these bacterial taxa in ascending tertiles, and the detrimental or beneficial role was determined according to a higher mean baseline abundance in Incident-DIAB or Non-DIAB group, respectively. In this way, for a detrimental genus: tertil 1 was scored as -1 (protective), tertil 2 as 0 (neutral effect) and tertil 3 as 1 (risk), and the opposite for a beneficial genus: tertil 1 as 1 (risk), tertil 2 as 0 (neutral effect) and tertil 3 as -1 (protective). The score was calculated by adding the Mean Decrease Accuracy for each bacterial taxa, with a positive or negative value, according to the above risk or protective tertiles and disregarding the tertiles with neutral effect (added as 0).

Statistical analysis

The statistical analysis of the data was carried out with SPSS statistical software (IBM SPSS Statistics version 21.0). In all statistical analysis, p-values ≤ 0.05 were statistically significant. Kolmogorov-Smirnov test was used to assess whether variables follow a normal distribution. One-way ANOVA was performed to calculate the statistical differences of the quantitative anthropometric and metabolic variables between groups, while qualitative data were analyzed using the Chi-Square analysis. LEfSe (Linear discriminant analysis Effect Size) [19] was conducted for the identification of the most differently abundant taxa between groups. Furthermore, Cox proportional hazard regression analysis was run incorporating as covariables: age, gender, BMI, diet, HDL, triglycerides and the intensity of statin therapy defined by the American Heart Association (AHA). In addition, a nomogram was performed with R based on the results of a Weibull survival model fit with *psm* function employing survival package [20]. The relationship between the microbiome-based T2DM risk score and baseline abundance of the top ten most discriminant bacterial taxa with OGTT-derived indexes was analyzed by ANOVA for repeated measures.

Results

Baseline characteristics of the participants

Baseline body weight, waist circumference, glycosylated haemoglobin (HbA1c), fasting glucose, body mass index (BMI), insulin, HIRI and HOMA-IR were higher, whereas DI, ISI and IGI were lower in the Incident-DIAB in comparison with the Non-DIAB group ($p < 0.05$). No differences were found for age or gender between the groups (Suppl. Table S1). Furthermore, the patient population with available fecal samples at baseline and who had not received antibiotic treatment within 3 months before sample collection, was representative of the total population for the T2DM incidence study [6] (Suppl. Table S2).

Differences in gut microbiota composition between study groups

LEfSe was performed to determine the most differently abundant phylotypes and the taxa of the gut microbiota at baseline between the Incident-DIAB and the Non-DIAB group.

Baseline gut microbiota in the Incident-DIAB group was characterized by the preponderance of the *Negativicutes* and *Bacilli* classes, as well as the *Selenomonadales* and *Lactobacillales* orders. Regarding family, it was characterized by a higher abundance of *Prevotellaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Veillonellaceae*, *Streptococcaceae*, *Actinomycetaceae* and *Oxalobacteraceae*, as well as by *Prevotella*, *Granulicatella*, *Streptococcus*, *Acidaminococcaceae unclassified genus*, *Sutterella*, *Actinomyces* and *Paraprevotella*. In contrast, baseline gut microbiota in the Non-DIAB group was enriched in *Actinobacteria* at phylum and class levels, as well as characterized by a predominance of *Clostridiaceae*, *Porphyromonadaceae* and *Ruminococcaceae* families; in terms of genus, *Odoribacter*, *Butyricimonas*, *Sporobacter* and *Barnesiella*, *Parabacteroides*, as well as an unknown genus of the *Ruminococcaceae* family were predominant (Fig. 1). However, the bacterial richness and diversity assessed by the main α diversity indexes were similar between the groups (Mean \pm standard deviation (SD) in the Incident-DIAB group and the Non-DIAB group of *Chao1*: 164.6 ± 23.26 and 162.6 ± 23.86 respectively, $p = 0.94$; *Simpson*: 0.926 ± 0.01 and 0.928 ± 0.01 , respectively, $p = 0.63$; *Shannon*: 3.12 ± 0.22 and 3.14 ± 0.20 , respectively, $p = 0.71$).

Random forest predictive model for T2DM development

Several random forest classifier models were created based on the following data: (1) clinical variables (encompassed in the FINDRISC and ADA scores: BMI, waist circumference, use of antihypertensive medication, age, dietary consumption of fruit and vegetables, physical activity, family history of diabetes, history of gestational diabetes, history of high blood glucose (i.e. whether participant has ever been determined to have high blood glucose in a health test), High Density Lipoprotein (HDL), triglycerides and HbA1c), (2) The indexes calculated from the Oral Glucose Tolerance Test (OGTT) (i.e. IGI, HOMA-IR, ISI, HIRI, DI and MISI), (3) the microbiome (bacterial composition at genus level expressed as abundance), (4) clinical variables along with microbiome, and (5) OGTT-derived insulin sensitivity indexes combined with the microbiome.

Firstly, we ran all the models in a training dataset that accounted for 70% of the patients. The models were performed using a 10-fold cross-validation method to evaluate the model's predictive accuracy and generalization performance. Diet and intensity of statin treatment were included in the analyses (Table 1a and Fig. 2a). Validation of the models was then performed to confirm the results and rule out the possibility of over-fitting models. This validation was performed in the 30% of the patients not included in the training set ($N = 82$; 19 incident cases) (Table 1b and Fig. 2b).

Clinical variables produced an area under the curve (AUC) of 0.632, i.e. lower than the AUC obtained for OGTT-derived insulin sensitivity indexes (AUC = 0.729), and the microbiome (AUC = 0.913). In addition, the combination of clinical variables with the microbiome yielded an AUC of 0.946. The AUC reached 0.961 when the OGTT-derived insulin sensitivity indexes were combined with the microbiome. The increase in the AUC observed by the addition of the microbiome to the clinical variables was evaluated using Venkatrama's permutation test and DeLong's test with a significant AUC difference observed ($p < 0.001$). We also observed that the model combining clinical variables and microbiome obtained a 95% sensitivity and a 79% specificity on the test dataset, whereas the model exclusively based on clinical variables a 95% sensitivity and a 26% specificity.

When models included the patients with available fecal samples without removing those who had any antibiotic prescription in the three months before the baseline sampling, the results were consistent with those obtained previously (Suppl. Table S3).

Microbiome-based risk assessment of T2DM development

We also analyzed the potential usefulness of the microbiome to evaluate the risk of T2DM development by COX regression analysis. The ten most discriminant bacterial taxa by the Mean Decrease Accuracy were selected (Fig. 3). Furthermore, we classified patients by ascending tertiles according to the abundance for each genus: T1, low abundance; T2, intermediate abundance; T3, high abundance. When we calculated the Cox proportional hazards regression analysis for each of the ten genera, we observed that higher abundance of *Granulicatella* and *Prevotella* was linked with a greater risk of diabetes development [Hazard Ratio (HR) unadjusted T1 vs. T3: 2.310 and 1.844, 95% Confidence Interval (CI): 1.278–4.175 and 1.001–3.395, respectively; HR adjusted T1 vs. T3: 1.963 and 2.147, 95% CI: 1.073–3.593 and 1.134–4.064, respectively] (Suppl. Fig. S1).

A risk score was then created based on the ten most discriminant bacterial taxa (Fig. 3). We then evaluated T2DM development risk according to the score generated by COX regressions, categorizing patients by ascending tertiles of the score: T1, low risk score; T2, intermediate risk score; T3, high risk score. We found an unadjusted HR of 2.402 (95% CI 1.137–5.072) between the tertiles of T1 vs. T2, and 3.489 (95% CI 1.715–7.098) between the tertiles of T1 vs. T3. Moreover, we obtained an adjusted HR of 2.092 (95% CI 0.980–4.462) between the tertiles of T1 vs. T2, and 3.301 (95% CI 1.600–6.811) between the tertiles of T1 vs. T3 (Fig. 4). Moreover, we also built a nomogram based on the microbiome-based risk score and the clinical variables included in the adjusted COX model. The nomogram showed the contribution of the value of each variable to a total T2DM risk points that assess probability of T2DM development at 30 months and 60 months (Suppl. Fig. S2).

The relationship between microbiome-based T2DM risk score, insulin sensitivity and beta-cell function indexes

We also evaluated whether a microbiota profile, based on the highly discriminant bacterial taxa identified by the predictive model, may affect the pathophysiological mechanisms underlying T2DM development. For this purpose, we examined the relationship between the risk score, created from the ten most discriminant bacterial taxa, and the OGTT-derived indexes. Patients with a high score risk for T2DM development had a significantly lower DI ($p = 0.048$) and a significantly higher HIRI than patients with a low-risk score ($p = 0.046$). Furthermore, we found that a lower ISI was related to a high richness of *Sutterella* ($p = 0.038$), and a low abundance of *Phascolarctobacterium* ($p = 0.040$) and *Faecalibacterium* ($p = 0.007$). In addition, a lower DI was linked to a high abundance of *Dialister* and *Erysipelotrichaceae unclassified genus* ($p = 0.032$ and $p = 0.021$, respectively), whereas a higher HIRI was associated with a high abundance of *Prevotella* ($p = 0.029$) and low abundances of *Phascolarctobacterium* and *Faecalibacterium* ($p = 0.010$ and $p = 0.019$) (Suppl. Fig. S3).

Discussion

The present study conducted on CHD patients showed a different baseline gut microbiota profile between groups. These results therefore suggest that a preceding gut microbiota profile is associated with T2DM development several years before its clinical diagnosis. Moreover, the addition of the baseline microbiome data to the traditional clinical risk parameters included in the ADA and the FINDRISC risk scores, significantly improved the prediction of diabetes development. A microbiome-based score, including the ten most relevant bacterial taxa in the microbiome model, showed

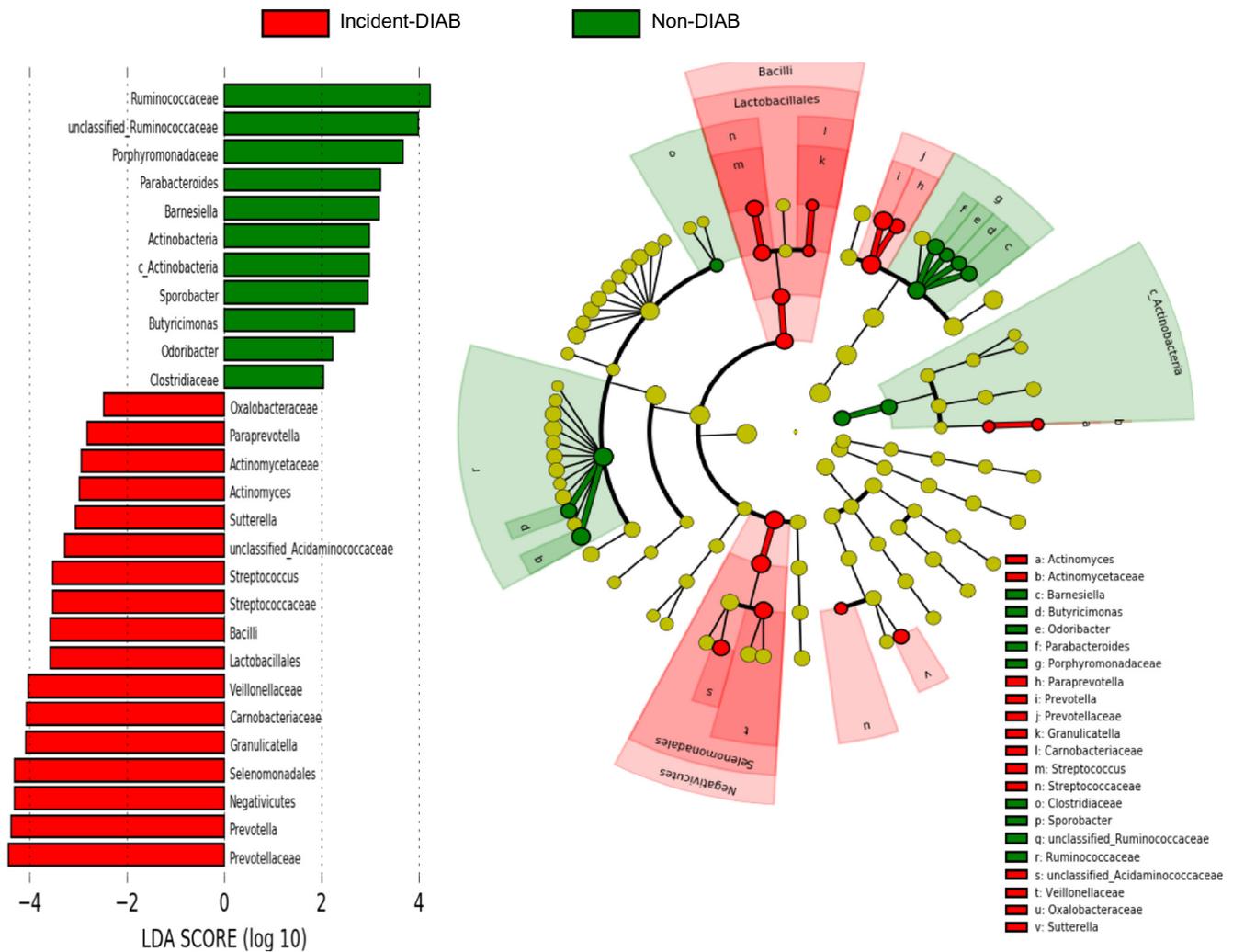


Fig. 1. Differently abundant taxa identified using LEfSe analysis. The most differently abundant taxa between the groups of study are represented in a bar graph according to the LDA score (log 10), an estimation of the effect size and in a taxonomic cladogram. Only taxa meeting a $p < 0.05$ and LDA score significant threshold >2 are shown. The colors represent the group in which the indicated taxa is more abundant compared to the other group. In a taxonomic cladogram, each successive circle represents a different phylogenetic level. The order from the center to the outside is phylum, class, family and genus levels. Differing taxa are listed on the right side of the cladogram. c_Actinobacteria: Actinobacteria class.

Table 1

ROC analysis of the Random Forest classification models. (a) ROC performed using cross-validation method. (b) ROC performed on testing dataset.

a						
	AUC	Sensitivity	Specificity	Accuracy	Kappa coefficient	
Clinical variables	0.614 (0.139)	0.92 (0.07)	0.24 (0.19)	0.758 (0.068)	0.178 (0.225)	
OGTT-derived indexes	0.511 (0.151)	0.67 (0.13)	0.30 (0.22)	0.586 (0.114)	-0.021 (0.224)	
Microbiome	0.952 (0.048)	0.94 (0.07)	0.77 (0.18)	0.896 (0.064)	0.707 (0.178)	
Microbiome + Clinical variables	0.925 (0.075)	0.92 (0.07)	0.72 (0.24)	0.874 (0.078)	0.637 (0.238)	
Microbiome + OGTT-derived indexes	0.958 (0.038)	0.91 (0.07)	0.89 (0.15)	0.905 (0.060)	0.753 (0.154)	
b						
	AUC	95% CI	Sensitivity	Specificity	Accuracy	Kappa coefficient
Clinical variables	0.632	0.467–0.797	0.95	0.26	0.790	0.269
OGTT-derived indexes	0.729	0.593–0.866	0.81	0.63	0.765	0.401
Microbiome	0.913	0.850–0.976	0.92	0.58	0.840	0.527
Microbiome + Clinical variables	0.946	0.895–0.997	0.95	0.79	0.914	0.755
Microbiome + OGTT-derived indexes	0.961	0.924–0.997	0.92	0.79	0.889	0.696

Data are mean (SD). The models were adjusted by diet and intensity of statin treatment. Clinical variables (variables included in the FINDRISC and ADA scores: body mass index, waist circumference, dietary consumption of fruit and vegetables, age, use of antihypertensive medication, family history of diabetes, history of high blood glucose, physical activity in addition to gestational diabetes, high density lipoprotein, triglycerides and HbA1c); OGTT-derived indexes: HOMA-IR, Homeostasis model assessment-insulin resistance; HIRI, Hepatic insulin resistance index; ISI, Insulin sensitivity index; MISI, Muscle insulin sensitivity index; IGI, Insulinogenic index; DI, Disposition index; AUC: area under the curve in the ROC analysis; CI: confidence interval.

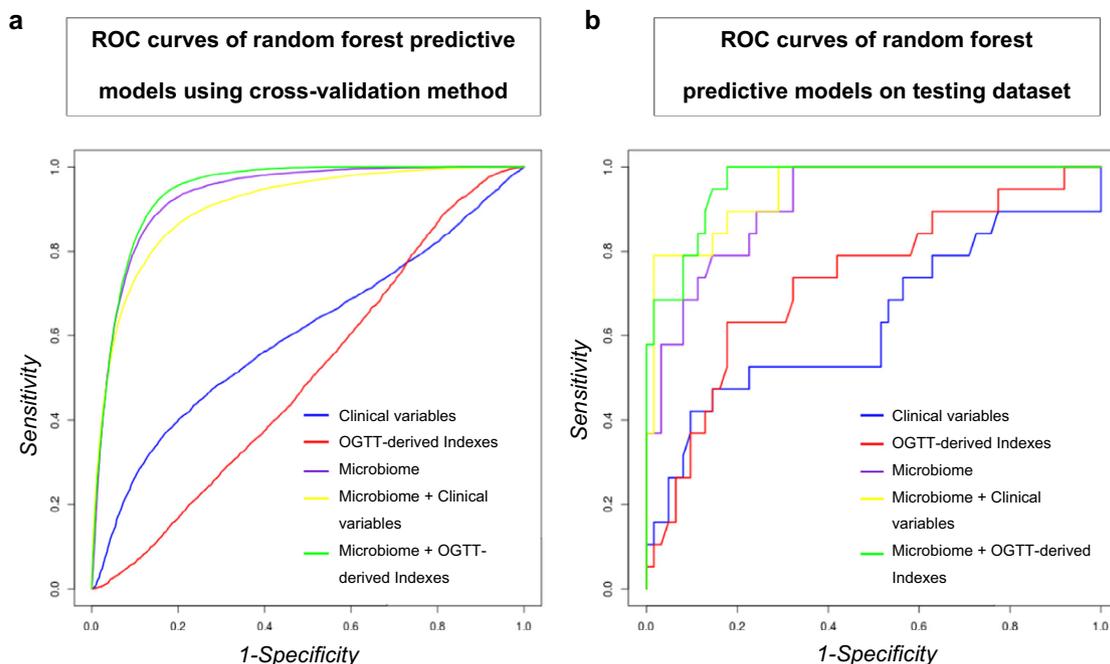


Fig. 2. Multivariate ROC models built based on the Random Forest Algorithm. (a) ROC curves of the models built using a cross-validation method in a training dataset that accounted for 70% of the total patients. (b) ROC curves of the models obtained in the validation performed on a testing dataset composed of patients not used to build the models (30% remaining patients not included in the training dataset). Clinical: clinical variables included in the FINDRISC and ADA scores: age, BMI, waist circumference, physical activity, dietary consumption of fruit and vegetables, use of antihypertensive medication, history of high blood glucose, family history of diabetes in addition to gestational diabetes, HDL, triglycerides and HbA1c; Indexes: OGTT-derived indexes (HOMA-IR, Homeostasis model assessment- insulin resistance; ISI, Insulin sensitivity index; IGI, Insulinogenic index; HIRI, Hepatic insulin resistance index; MISI, Muscle insulin sensitivity index; DI, Disposition index). The models were adjusted by diet and intensity of the statin treatment including these variables in all the models.

that patients with a certain “harmful” gut microbiota profile had a significantly increased risk of incident T2DM.

The clinical biomarkers used to identify patients at T2DM risk, such as those contained in the FINDRISC score, are not able to accurately predict disease development in every population [5–7]. Given the need to identify new biomarkers for the early detection diabetes risk, we previously showed that the curves of probability of disease-free status based on the plasma lipopolysaccharides (LPS) postprandial fold change, enhanced diabetes risk assessment compared with the previously cited FINDRISC score [6]. Current evidence links the development of metabolic diseases, including T2DM, to modifications in the composition of the gut microbiota [8,9]. In the same context, the gut microbiota have potential to distinguish T2DM patients from non-diabetic individuals supported by the results of several studies [8]. However, these studies cannot conclusively prove the causality of the gut microbiota in T2DM development, since they were performed in already diagnosed T2DM patients whose gut microbiota could also be altered by several confounding factors, including the disease duration and antidiabetic drug treatment [10]. In contrast, our study has the added value of have being performed years before diabetes clinical diagnosis, supporting a stronger evidence of an association between a microbiota profile and T2DM development.

We developed a predictive model combining the baseline microbiome data and the traditional clinical risk parameters of ADA and FINDRISC scores for T2DM. This model was able to predict accurately with a 95% sensitivity and a 79% specificity T2DM development on the test dataset.

In fact, our study applied the traditional clinical risk parameters of ADA and FINDRISC scores for T2DM to patients with CHD and high T2DM risk. The analysis results indicated that the addition of baseline microbiome to the traditional clinical risk parameters significantly improve the prediction in CHD patients.

The performance obtained with the model of this study improve the recently reported models based on microbiome features combined with traditional risk factors to identify type 2 diabetes patients [11,13]. It is noteworthy that, all the above reported models were obtained from cross-sectional studies. A prospective clinical investigation of gut microbiota as predictive factor of T2DM development had not been previously conducted. Therefore, in view of these findings, prospective studies might be more appropriate for the selection of the bacterial taxa associated, the robustness of predictive models and microbiome risk score construction.

Several of the bacterial taxa showing a high predictive power according to our model have previously been associated with metabolic diseases. For example, an abundance of *Granulicatella* has been positively related to MetS [21], body fat percentage and fasting glucose levels [22]. *Prevotella* has recently been related to IR [23]. The Incident-DIAB group was characterized by the preponderance of these two genera, and a high abundance of these was associated with a greater risk of diabetes development. The *Sutterella* genus has also been positively associated with MetS [24] and prediabetes [25]. Furthermore, the abundance of *Prevotella* and *Paraprevotella*, both highly discriminant in our model and more abundant in the Incident-DIAB group, has been reported to decrease after duodenal-endoluminal sleeve surgery in parallel with an improvement in glucose homeostasis [26]. The abundance of the *Faecalibacterium* [9] and *Phascolarctobacterium* [27], previously associated with beneficial effects in terms of Short-Chain Fatty Acid (SCFA) production, were also identified as significant in our model; the Incident-DIAB group had a significantly lower concentration of these bacteria. This is supported by the fact that *Faecalibacterium* is a butyrate-producing genus reduced in diabetic patients [8]. Of note, butyrate exerts anti-inflammatory properties [28]. *Phascolarctobacterium* is an acetate and propionate producer [29]; acetate is essential for butyrate synthesis via the butyryl

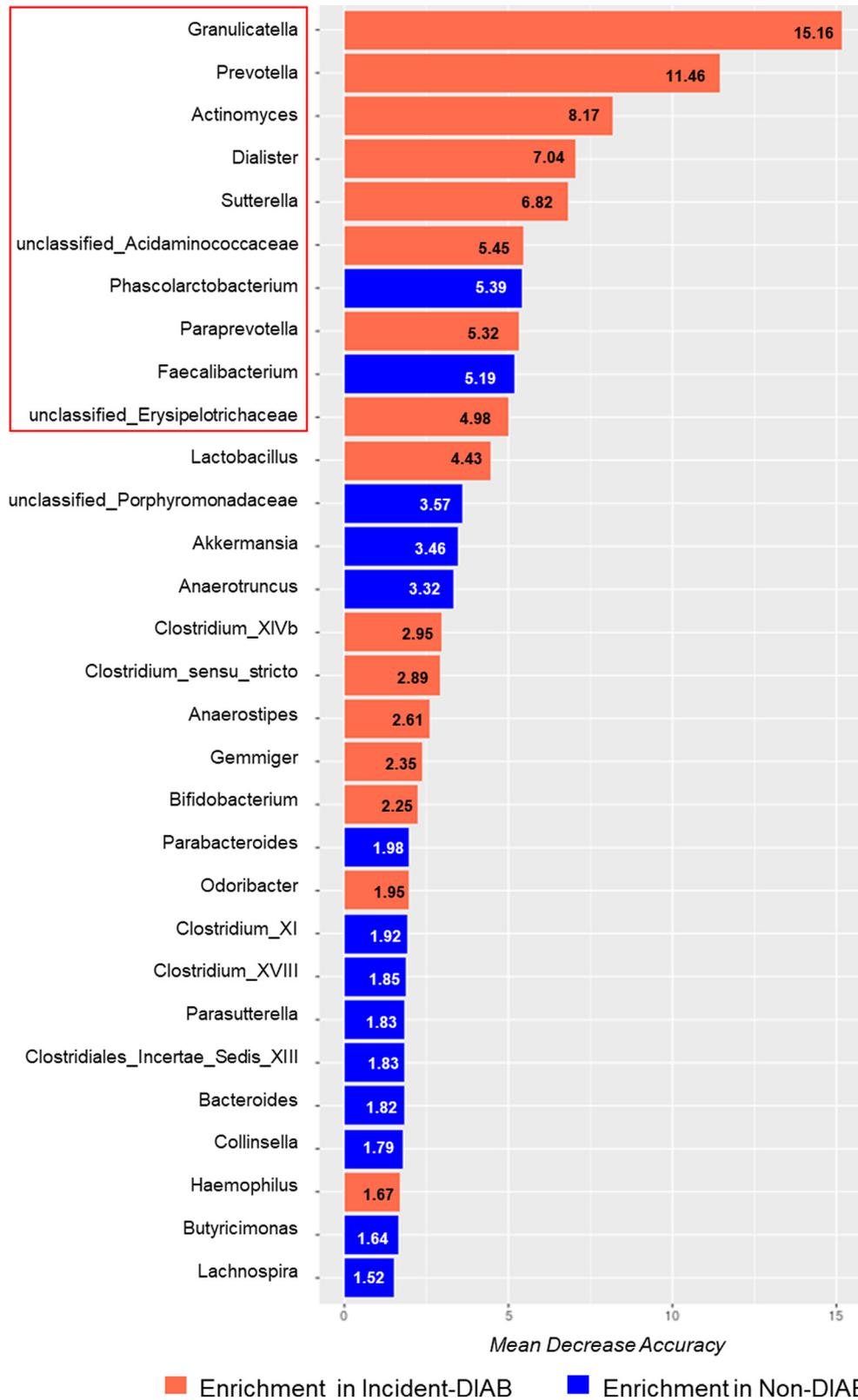


Fig. 3. Variable Importance values of microbiome model. Variable Importance is represented by the mean decrease in accuracy of the models when these taxa are removed. The higher the mean decrease in accuracy or bar length, the greater the importance of the variable. The ten most discriminant genera were highlighted.

CoA:acetate CoA transferase pathway, used by the *Faecalibacterium* genus [30].

Even though some of the highly predictive bacteria in our model differ from previous studies comparing microbiome from diag-

nosed diabetic patients with controls [8]. However, these differences can be attributed to the fact that, unlike the previous studies, the predictive models used in this study involved microbiome composition data that preceding the clinical diagnosis of

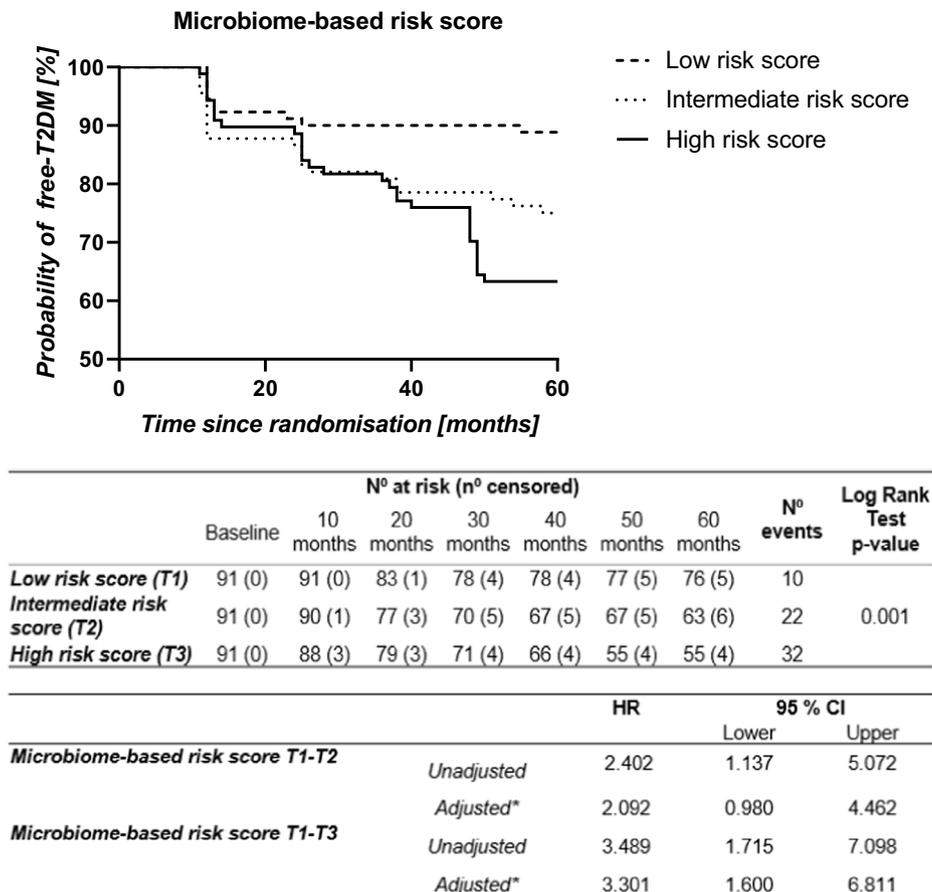


Fig. 4. Probability of T2DM development by COX regression analysis according to the microbiome-based risk score. The microbiome-based risk score was built with the top ten most discriminant bacterial taxa. The data represent risk score values by ascending terciles: T1, low risk score; T2, intermediate risk score; T3, high risk score. N° at risk: number of patients remaining non-diabetic. N° censored: cumulative number of censored patients because not completing the follow-up period (dropout or death). N° events: number of patients who were diagnosed as diabetic during the follow-up. CI: confidence interval. HR: Hazard ratio. *This model was adjusted by age, gender, diet, BMI, HDL, triglycerides and intensity of statin treatment.

T2DM. Overall, the microbiota profile related to T2DM incidence in our study is in agreement with the functionality previously proposed for these bacterial taxa.

In this context, *Akkermansia* has been reported by several studies to act beneficially through its involvement in intestinal barrier integrity and immune response [31]. However, in another study, diabetic patients exhibited a high abundance of *Akkermansia*, probably due to the effects of metformin which can increase these bacteria [8]. Notably, a major strength of our study is that microbiome was analyzed years before the clinical diagnosis, thus avoiding any effect produced by antidiabetic drug treatment. Despite the potential role of this bacterial genus in gut barrier integrity, *Akkermansia* appeared in the fifteenth position in our predictive model.

Moreover, we created a microbiome-based risk score with the ten most important bacterial taxa of the microbiome-based model. A high risk score, implying a harmful effect of these bacteria, was related with a greater risk of becoming diabetic, highlighting the potentiality of certain gut microbiota to identify high risk patients in a CHD population. To explore the underlying pathophysiological mechanisms that might support these results, we analyzed the relationship between the microbiome-based risk score and the OGTT-derived indexes. Our results suggested that patients with a high risk microbiome-based score had increased beta-cell dysfunction and IR throughout the study, as evidenced by a lower DI and a higher HIRI, respectively. However, despite these observations and the elevated incidence of T2DM in our CHD population, higher than the observed in the whole population [32], we observed a higher

AUC in the ROC analysis of the models including microbiome data-set than those including OGTT-derived indexes, suggesting gut microbiome as a major associated factor of T2DM development.

We also found that a lower DI was related to a high baseline abundance of *Dialister*. *Dialister invisus* is a non-SCFA producer species, whose growth is enhanced by succinate [33]. It is plausible that a higher abundance of *Dialister* genus, as observed at baseline in Incident-DIAB group, may represent a higher abundance of this succinate-consuming species, a precursor of propionate and butyrate production [34]. Consequently, the production of these SCFAs may be decreased, leading to a depletion of glucagon-like peptide 1 (GLP-1) and insulin production, since these SCFAs can lead to the secretion of GLP-1 by binding to G-protein coupled receptors (GPCRs) from L-cells; GLP-1 promotes insulin secretion and beta-cell proliferation [9]. This suggestion is supported by the reduction of *D. invisus* abundance in post-bariatric surgery diabetic patients, together with an improvement in their metabolic status [35]. Furthermore, the abundance of *Dialister* was positively correlated with a high HbA1c in prediabetic patients [36]. Besides an increased abundance of this genus was also observed in diabetic patients without metformin treatment compared with controls [36].

Intestinal microbiota may regulate beta-cell functionality through bile acid metabolism. Certain secondary bile acids synthesized by the gut microbiota have been recognized as ligands for the membrane-bound GPCR TGR5 in the lumen, whose activation leads to GLP-1 production [37]. We also observed a lower DI in patients with a high baseline abundance of an unidentified genus belonging

to the *Erysipelotrichaceae* family, that has been linked to host lipid and cholesterol metabolism [38]. Actually, the abundance of this bacterial family is negatively related to fecal cholesterol excretion [39]. Given this association, a higher abundance of the *Erysipelotrichaceae unclassified* genus may reflect reduced bile acid fecal excretion, therefore, bile acid levels in the colon and, consequently, lower secondary bile acid production. This, in turn, may downregulate TGR5 and decrease the secretion of GLP-1 and glucose-stimulated insulin. This suggested pathway has been supported by the fact that bile acid sequestrants (enhancing fecal excretion of bile acids) produces a glucose-lowering effect and increase GLP-1 levels in diabetes [40].

Apart from other potential mechanisms by which a specific microbiota pattern may trigger T2DM development, metabolic endotoxemia may play a crucial role. In this context, gut microbiota can influence intestinal permeability, hence, affect the absorption of pro-inflammatory bacterial components, such as LPS, which have been shown to induce hepatic IR [41]. We have previously shown in the same population that higher postprandial endotoxemia precedes the development of T2DM [6]. The increased LPS levels may be partially responsible for the higher HIRI observed in this study in patients with a high risk score, because the liver is known to be the first target of LPS-induced IR [41]. Furthermore, the baseline abundance of *Phascolarctobacterium* and *Faecalibacterium* had a positive effect on HIRI progression, presumably through the butyrate-induced reduction in inflammation and the improved intestinal barrier integrity [28,42]. Another potential mechanism linking the gut microbiota profile to hepatic IR may involve the modulation of serum Branched-Chain Amino Acids (BCAA) levels. Our study showed that HIRI could also be negatively affected by the baseline abundance of *Prevotella*, which has been reported as a potential biosynthetic genus for BCAAs, driving the positive association between elevated BCAAs levels and IR [23].

This study has limitations. Really, it was a secondary study conducted in the non-diabetic subgroup at baseline, as T2DM prevention was not the main objective of the CORDIOPREV study. Therefore, it limits our findings to individuals with this comorbidity. Nevertheless, T2DM prediction is essential, since patients with concurrent CHD and diabetes have a considerably greater risk of having a new cardiovascular event than those without diabetes [3]. It would be ideal to validate it in a cohort without CHD in order to unequivocally confirm and extend our findings to the general population.

Conclusion

In conclusion, the current study supports a potential role of the intestinal microbiota as an associated factor of T2DM development. The results showed a microbiota profile associated to the T2DM that improved the prediction of diabetes development when added to traditional clinical parameters. Moreover, we built a risk score based on the ten most important bacteria of the predictive model representative of the likelihood of developing diabetes. In fact, patients with high risk score values had higher the hepatic insulin resistance and beta-cell disruption. Therefore, the use of microbiome data combined with clinical parameters may improve the early identification of patients at risk for T2DM in clinical practice.

Ethical statement

All procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional and national) and with the Helsinki Declaration

of 1975, as revised in 2008 (5). Informed consent was obtained from all patients for being included in the study.

CRedit authorship contribution statement

Cristina Vals-Delgado: Investigation, Writing - original draft, Investigation, Data curation, Writing - review & editing, Conceptualization. **Juan F. Alcalá-Díaz:** Investigation, Conceptualization. **Helena Molina-Abril:** Writing - original draft. **Irene Roncero-Ramos:** Investigation. **Martien P.M. Caspers:** Data curation, Formal analysis. **Frank H.J. Schuren:** Data curation, Formal analysis. **Tim J. Van den Broek:** Data curation, Formal analysis. **Raul Luque:** Methodology. **Pablo Perez-Martinez:** Methodology. **Niki Katsiki:** Methodology. **Javier Delgado-Lista:** Methodology. **Jose M. Ordoñas:** Methodology. **Ben van Ommen:** Writing - review & editing. **Antonio Camargo:** Investigation, Investigation, Data curation, Methodology, Writing - review & editing. **Jose Lopez-Miranda:** Investigation, Data curation, Writing - review & editing, Writing - review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

The CIBEROBN is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain. We want to acknowledge the Biobank of the Sistema Sanitario Público de Andalucía (Andalusia, Spain) (Córdoba branch), for the human biological samples provided. We also thank the performed the randomization process by the EASP (Escuela Andaluza de Salud Pública), Granada, Spain. The CORDIOPREV study is supported by Ministerio de Economía y Competitividad (PIE14/00005, 14/00031, and AGL2012/39615, to J. L.-M.; AGL2015-67896-P to J.L.-M. and A.C.; FIS PI13/00023 to J.D.-L., PI16/01777 to P.P.-M. FIS PI19/00299 to A.C.; DTS19/00007 to A. C., CP14/00114 to A.C.); Fundación Patrimonio Comunal Olivarero, Diputaciones de Jaén y Córdoba, Junta de Andalucía (Consejería de Salud, Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa Consejería de Agricultura y Pesca,), Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino, Gobierno de España; Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, and Centro de Excelencia en Investigación sobre Aceite de Oliva y Salud, , Junta de Andalucía (Proyectos de Investigación de Excelencia CVI-7450 to J.L.-M.); J.M.O. is supported by the US Department of Agriculture, under agreement no. 8050-51000-098-00D. We also thank the European Regional Development Fond. We also thank Jose Andrés Morales Martínez for his technical support.

Data availability

The sequences obtained for this study are open available in the NCBI Sequence Read Archive (SRA) repository at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/PRJNA675744>, reference number PRJNA675744.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jare.2021.05.001>.

References

- [1] Halban PA, Polonsky KS, Bowden DW, Hawkins MA, Ling C, Mather KJ, et al. B-cell failure in type 2 diabetes: Postulated mechanisms and prospects for prevention and treatment. *Diab Care* 2014;37:1751–8.
- [2] Samuel Varman T, Shulman Gerald I. Mechanisms for insulin resistance: Common threads and missing links. *Cell* 2012;148:852–71.
- [3] DeFronzo RA. Insulin resistance, lipotoxicity, type 2 diabetes and atherosclerosis: The missing links. The Claude Bernard Lecture 2009. *Diabetologia* 2010;53:1270–1287.
- [4] American Diabetes Association. 2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in diabetes—2019. *Diab Care* 2019;42 (Suppl 1):S13–S28.
- [5] Jølle A, Midtjell K, Holmen J, Carlsen SM, Tuomilehto J, Bjørngaard JH, et al. Validity of the FINDRISC as a prediction tool for diabetes in a contemporary Norwegian population: A 10-year follow-up of the HUNT study. *BMJ Open Diab Res Care* 2019;7:e000769.
- [6] Camargo A, Jimenez-Lucena R, Alcalá-Díaz JF, Rangel-Zuñiga OA, Garcia-Carpintero S, Lopez-Moreno J, et al. Postprandial endotoxemia may influence the development of type 2 diabetes mellitus: From the CORDIOPREV study. *Clin Nutr* 2019;38:529–38.
- [7] Bennet L, Groop L, Lindblad U, Agardh CD, Franks PW. Ethnicity is an independent risk indicator when estimating diabetes risk with FINDRISC scores: A cross sectional study comparing immigrants from the Middle East and native Swedes. *Prim Care Diabetes* 2014;8:231–8.
- [8] Tilg H, Moschen AR. Microbiota and diabetes: An evolving relationship. *Gut* 2014;63:1513–21.
- [9] Tremaroli V, Backhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature* 2012;489:242–9.
- [10] Forslund K, Hildebrand F, Nielsen T, Falony G, Le Chatelier E, Sunagawa S, et al. Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota. *Nature* 2015;528:262–6.
- [11] 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 Metab* 2020;32(379–90):e3.
- [12] Vrieze A, Van Nood E, Holleman F, Salojarvi J, Kootte RS, Bartelsman JFWM, et al. Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. *Gastroenterology* 2012;143(913–6):e7.
- [13] Gou W, Ling C-w, He Y, Jiang Z, Fu Y, Xu F, et al. Interpretable machine learning framework reveals robust gut microbiome features associated with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2021;44:358–66.
- [14] Delgado-Lista J, Perez-Martinez P, Garcia-Rios A, Alcalá-Díaz JF, Perez-Caballero AI, Gomez-Delgado F, et al. CORONARY Diet Intervention with Olive oil and cardiovascular PREvention study (the CORDIOPREV Study): Rationale, methods, and baseline characteristics: A clinical trial comparing the efficacy of a Mediterranean diet rich in olive oil versus a low-fat diet on cardiovascular disease in coronary patients. *Am Heart J* 2016;177:42–50.
- [15] Fernández-Ballart JD, Piñol JL, Zazpe I, Corella D, Carrasco P, Toledo E, et al. Relative validity of a semi-quantitative food-frequency questionnaire in an elderly Mediterranean population of Spain. *Br J Nutr* 2010;103:1808–16.
- [16] Martínez-González MA, Fernández-Jarne E, Serrano-Martínez M, Wright M, Gomez-Gracia E. Development of a short dietary intake questionnaire for the quantitative estimation of adherence to a cardioprotective Mediterranean diet. *Eur J Clin Nutr* 2004;58:1550–2.
- [17] Blanco-Rojo R, Alcalá-Díaz JF, Wopereis S, Perez-Martínez P, Quintana-Navarro GM, Marin C, et al. The insulin resistance phenotype (muscle or liver) interacts with the type of diet to determine changes in disposition index after 2 years of intervention: The CORDIOPREV-DIAB randomised clinical trial. *Diabetologia* 2016;59:67–76.
- [18] Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, Highlander SK, Schloss PD. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the Miseq Illumina sequencing platform. *Appl Environ Microbiol* 2013;79:5112–20.
- [19] Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol* 2011;12:R60.
- [20] Zhang Z, Kattan MW. Drawing nomograms with R: Applications to categorical outcome and survival data. *Ann Transl Med* 2017;5:211.
- [21] Si J, Lee C, Ko G. Oral microbiota: Microbial biomarkers of metabolic syndrome independent of host genetic factors. *Front Cell Infect Microbiol* 2017;7:516.
- [22] Kaakoush NO, Lecomte V, Maloney CA, Morris MJ. Cross-talk among metabolic parameters, esophageal microbiota, and host gene expression following chronic exposure to an obesogenic diet. *Sci Rep* 2017;7:45753.
- [23] Pedersen HK, Gudmundsdottir V, Nielsen HB, Hyötyläinen T, Nielsen T, Jensen BAH, et al. Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity. *Nature* 2016;535:376–81.
- [24] Lim MY, You HJ, Yoon HS, Kwon B, Lee JY, Lee S, et al. The effect of heritability and host genetics on the gut microbiota and metabolic syndrome. *Gut* 2017;66:1031–8.
- [25] Allin KH, Tremaroli V, Caesar R, Jensen BAH, Damgaard MTF, Bahl MI, et al. Aberrant intestinal microbiota in individuals with prediabetes. *Diabetologia* 2018;61:810–20.
- [26] Kim T, Holleman CL, Ptacek T, Morrow CD, Habegger KM. Duodenal endoluminal barrier sleeve alters gut microbiota of ZDF rats. *Int J Obes* 2017;41:381–9.
- [27] Zhang X, Zhao Y, Xu J, Xue Z, Zhang M, Pang X, et al. Modulation of gut microbiota by berberine and metformin during the treatment of high-fat diet-induced obesity in rats. *Sci Rep* 2015;5:14405.
- [28] Yan H, Ajuwon KM. Butyrate modifies intestinal barrier function in IPEC-J2 cells through a selective upregulation of tight junction proteins and activation of the Akt signaling pathway. *PLoS ONE* 2017;12:e0179586.
- [29] Watanabe Y, Nagai F, Morotomi M. Characterization of *Phascolarctobacterium succinatutens* sp. nov., an asaccharolytic, succinate-utilizing bacterium isolated from human feces. *Appl Environ Microbiol* 2012;78:511–8.
- [30] Duncan SH, Holtrop G, Lohley GE, Calder AG, Stewart CS, Flint HJ. Contribution of acetate to butyrate formation by human faecal bacteria. *Br J Nutr* 2007;91:915–23.
- [31] Derrien M, Belzer C, de Vos WM. *Akkermansia muciniphila* and its role in regulating host functions. *Microb Pathog* 2017;106:171–81.
- [32] Razquin C, Toledo E, Clish CB, Ruiz-Canela M, Dennis C, Corella D, et al. Plasma lipidomic profiling and risk of type 2 diabetes in the PREDIMED trial. *Diabetes Care* 2018;41:2617–24.
- [33] Jumas-Bilak E, Jean-Pierre H, Carlier J-P, Teyssier C, Bernard K, Gay B, et al. *Dialister micraeophilus* sp. nov. and *Dialister propionificiens* sp. nov., isolated from human clinical samples. *Int J Syst Evol Microbiol* 2005;55:2471–8.
- [34] Louis P, Flint HJ. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environ Microbiol* 2017;19:29–41.
- [35] Graessler J, Qin Y, Zhong H, Zhang J, Licinio J, Wong ML, et al. Metagenomic sequencing of the human gut microbiome before and after bariatric surgery in obese patients with type 2 diabetes: Correlation with inflammatory and metabolic parameters. *Pharmacogenomics J* 2013;13:514–22.
- [36] Barends E, Green SJ, Eisenberg Y, Akbar A, Reddivari B, Layden BT, et al. Gut microbiota varies by opioid use, circulating leptin and oxytocin in African American men with diabetes and high burden of chronic disease. *PLoS ONE* 2018;13:e0194171.
- [37] Wahlström A, Sayin Sama I, Marschall H-U, Bäckhed F. Intestinal crosstalk between bile acids and microbiota and its impact on host metabolism. *Cell Metab* 2016;24:41–50.
- [38] Kaakoush NO. Insights into the role of *Erysipelotrichaceae* in the human host. *Front Cell Infect Microbiol* 2015;5:84.
- [39] Martínez I, Perdicaro DJ, Brown AW, Hammons S, Carden TJ, Carr TP, et al. Diet-induced alterations of host cholesterol metabolism are likely to affect the gut microbiota composition in hamsters. *Appl Environ Microbiol* 2013;79:516–24.
- [40] Prawitt J, Caron S, Staels B. Glucose-lowering effects of intestinal bile acid sequestration through enhancement of splanchnic glucose utilization. *Trends Endocrinol Metab* 2014;25:235–44.
- [41] Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007;56:1761–72.
- [42] Plöger S, Stumpf F, Penner GB, Schulzke J-D, Gabel G, Martens H, et al. Microbial butyrate and its role for barrier function in the gastrointestinal tract. *Ann N Y Acad Sci* 2012;1258:52–9.

A Diet-Dependent Microbiota Profile Associated with Incident Type 2 Diabetes: From the CORDIOPREV Study

Antonio Camargo,* Cristina Vals-Delgado, Juan F. Alcalá-Díaz, Alejandro Villasanta-Gonzalez, Francisco Gomez-Delgado, Carmen Haro, Ana Leon-Acuña, Magdalena P. Cardelo, Jose D. Torres-Peña, Ipek Guler, Maria M. Malagon, Jose M. Ordovas, Pablo Perez-Martinez, Javier Delgado-Lista, and Jose Lopez-Miranda*

Scope: The differences between the baseline gut microbiota of patients who developed type 2 diabetes (T2D) consuming a low-fat (LF) or a Mediterranean (Med) diet are explored and risk scores are developed to predict the individual risk of developing T2D associated with the consumption of LF or Med diet.

Methods and Results: All the patients from the CORDIOPREV study without T2D at baseline ($n = 462$) whose fecal sample are available, are included. Gut microbiota is analyzed by 16S sequencing and the risk of T2D after a median follow-up of 60 months assessed by Cox analysis. Linear discriminant analysis effect size (LEfSe) analysis shows a different baseline gut microbiota in patients who developed T2D consuming LF and Med diets. A higher abundance of *Paraprevotella*, and lower *Gammaproteobacteria* and *B. uniformis* are associated with T2D risk when an LF diet is consumed. In contrast, higher abundances of *Saccharibacteria*, *Betaproteobacteria*, and *Prevotella* are associated with T2D risk when a Med diet is consumed.

Conclusion: The results suggest that different interactions between the microbiome and dietary patterns may partially determine the risk of T2D development, which may be used for selecting personalized dietary models to prevent T2D.

1. Introduction

Type 2 diabetes (T2D) is the metabolic disease with the highest incidence and public health impact worldwide.^[1] The etiology of T2D is complex, since it has been associated with non-modifiable risk factors such as age, gender, and ethnicity, as well as modifiable factors such as physical activity, smoking, and diet.^[2]

In this scenario, successful strategies for the early prediction of T2D are an essential step for its prevention. The clinical biomarkers traditionally used to identify patients at risk, such as those included in the Finnish Diabetes Risk Score (FINDRISC) score, cannot predict disease development precisely.^[3] Moreover, in addition to a better prediction of T2D risk, new strategies should also be devised to show how to reduce the risk effectively and contribute to its prevention.

Although considerable progress has been made in developing and

Dr. A. Camargo, C. Vals-Delgado, Dr. J. F. Alcalá-Díaz, A. Villasanta-Gonzalez, Dr. F. Gomez-Delgado, Dr. A. Leon-Acuña, M. P. Cardelo, Dr. J. D. Torres-Peña, Prof. P. Perez-Martinez, Dr. J. Delgado-Lista, Prof. J. Lopez-Miranda
Lipids and Atherosclerosis Research Unit
Internal Medicine Unit
Reina Sofía University Hospital
Cordoba 14004, Spain

E-mail: antonio.camargo@imibic.org; jlopezmir@uco.es

Dr. A. Camargo, C. Vals-Delgado, Dr. J. F. Alcalá-Díaz, A. Villasanta-Gonzalez, Dr. F. Gomez-Delgado, Dr. A. Leon-Acuña, M. P. Cardelo, Dr. J. D. Torres-Peña, Prof. M. M. Malagon, Prof. P. Perez-Martinez, Dr. J. Delgado-Lista, Prof. J. Lopez-Miranda
Maimonides Biomedical Research Institute of Cordoba (IMIBIC)
Cordoba, Spain

Dr. A. Camargo, C. Vals-Delgado, Dr. J. F. Alcalá-Díaz, A. Villasanta-Gonzalez, Dr. F. Gomez-Delgado, Dr. A. Leon-Acuña, M. P. Cardelo, Dr. J. D. Torres-Peña, Prof. P. Perez-Martinez, Dr. J. Delgado-Lista, Prof. J. Lopez-Miranda
Department of Medicine
University of Cordoba
Cordoba 14004, Spain

Dr. A. Camargo, C. Vals-Delgado, Dr. J. F. Alcalá-Díaz, A. Villasanta-Gonzalez, Dr. F. Gomez-Delgado, Dr. A. Leon-Acuña, M. P. Cardelo, Dr. J. D. Torres-Peña, Prof. M. M. Malagon, Prof. P. Perez-Martinez, Dr. J. Delgado-Lista, Prof. J. Lopez-Miranda
CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN)
Instituto de Salud Carlos III
Madrid 28029, Spain

C. Haro
Institute for Sustainable Agriculture (IAS)
Spanish National Research Council (CSIC)
Cordoba 14080, Spain

 The ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under <https://doi.org/10.1002/mnfr.202000730>

DOI: 10.1002/mnfr.202000730

implementing evidence-based nutrition recommendations,^[4] this is one of the most controversial and challenging aspects of T2D management, as different nutrients or dietary patterns have shown varying degrees of effectiveness, suggesting that population-specific and individual factors may determine success in preventing T2D by using nutritional strategies.^[5] Therefore, effective dietary management of T2D may be specific for each individual.

Over the last few years, a growing body of evidence points toward the potential role of the gut microbiota as an interconnector between diet and metabolic diseases such as T2D.^[6] Previous observational studies have shown that the composition and activity of the intestinal microbiota are associated with T2D,^[7–11] whereas studies based on fecal transplantation have provided more definitive evidence regarding the causal role of the microbiota in T2D onset.^[12–15]

Taking into account the fact that recent studies have suggested that gut microbiome features may be involved in the different responses observed to dietary interventions,^[16–19] we hypothesized that different gut microbiota profiles might determine the specific T2D risk associated with the consumption of different diets. It has recently been shown that the consumption of different diets may selectively favor the intestinal growth of different *Prevotella copri* strains by exerting a range of functions, which suggests that this diversity may explain subject-specific responses to dietary interventions and variations in human health.^[20]

To shed light onto this issue, we explored the differences between the baseline gut microbiota of patients who developed T2D while consuming a low-fat diet (LF diet) and those consuming the Mediterranean diet (Med diet), and based on these differences, we built microbiota-based diet-specific risk scores following two different approaches (Random Survival Forest and Lasso models), in order to assess the individual T2D risk associated with the consumption of an LF or a Med diet.

2. Results

2.1. Baseline Characteristics of the Participants

No differences were found between the group of non-diabetic patients at baseline ($n = 462$) assigned to LF ($n = 216$ patients) and

Med diets ($n = 246$ patients) at the beginning of the study in the main metabolic variables, except for C-reactive protein and MISI, whose levels were higher in patients assigned to the LF diet ($p = 0.005$ and $p < 0.001$, respectively) (Table S1, Supporting Information). Moreover, we observed no significant differences between the group of patients assigned to each diet when we analyzed only the non-diabetic patients at baseline with available fecal samples and no antibiotics treatment ($n = 319$, 148 patients assigned to LF and 171 patients to Med diets), except for diastolic blood pressure and MISI, whose levels were higher in patients assigned to the LF diet ($p = 0.042$ and $p < 0.001$, respectively) (Table S2, Supporting Information). In addition, no differences were found for each diet between the entire patient population and the patient population with available fecal samples at baseline and no antibiotics treatment (Table S3, Supporting Information).

We analyzed the differences for each diet between the patients who developed diabetes (Inc) and those who did not (NonInc) after a median follow-up of 60 months. We found higher waist circumference, BMI, HbA1c, and lower ISI index in patients who developed T2D as compared to patients who did not develop T2D when we analyzed patients assigned to each diet separately (all $p < 0.05$) (Inc-LF vs NonInc-LF, and Inc-Med vs NonInc-Med). We also observed statistically significant lower values for DI and IGI, and higher HIRI and HOMA-IR indexes in Inc-Med compared with NonInc-Med, and the same trend between Inc-LF versus NonInc-LF groups, although the difference was not statistically significant. No statistically significant interaction of diet versus T2D incidence was observed except for TG ($p = 0.025$), whose levels were higher in Inc-Med compared with NonInc-Med, while no differences were observed between Inc-LF and NonInc-LF groups (Table S4, Supporting Information).

2.2. Gut Microbiota Profile in Incident T2D is Different According to Diet Consumed

We explored the potential differences at baseline between the diversity of the gut microbiota of the incident and non-incident T2D groups of patients for each diet (Table 1). We found a lower α -diversity, as assessed by Simpson and Shannon indexes ($p = 0.024$ and $p = 0.090$, respectively) in the Inc-LF than NonInc-LF, while no differences between Inc-Med and NonInc-Med were found. Moreover, we observed statistically significant non-phylogenetic qualitative distances between Inc-LF and NonInc-LF (Jaccard index $p = 0.024$). In contrast, we observed statistically significant non-phylogenetic qualitative (Jaccard index $p = 0.001$) and quantitative distances (Bary-Curtis index $p = 0.001$), in addition to phylogenetic qualitative (Unweighted Unifrac index $p = 0.014$) and quantitative distances (Weighted Unifrac index $p = 0.001$) between Inc-Med and NonInc-Med.

Linear discriminant analysis effect size (LEfSe) was used to identify the most differently abundant phylotypes and the taxa of the gut microbiota at baseline between the incident and non-incident T2D groups of patients for each diet (Figure 1).

Baseline gut microbiota in the groups of patients who developed T2D consuming LF diet (Inc-LF) was characterized by the preponderance of the S24-7 family, an unknown genus from this family, *Paraprevotella* genus, and by an unknown bacterial species from this genus, compared with the groups of

I. Guler
Unit of Biostatistics
Maimonides Biomedical Research Institute of Cordoba (IMIBIC)
Córdoba, Cordoba 14004, Spain
Prof. M. M. Malagon
Department of Cell Biology, Physiology and Immunology
University of Cordoba
Córdoba, Cordoba 14071, Spain
Prof. J. M. Ordoñas
Nutrition and Genomics Laboratory
J.M.-US Department of Agriculture Human Nutrition Research Center on Aging at Tufts University
Boston, Massachusetts 02111, USA
Prof. J. M. Ordoñas
IMDEA Food Institute
Madrid 28049, Spain
Prof. J. M. Ordoñas
Spanish national Center for cardiovascular Research (CNIC)
Madrid 28029, Spain

Table 1. Diversity indexes according to T2D incidence in the patients who consumed LF or Med diets.

	α -diversity				β -diversity			
	Chao1	Simpson	Shannon	Faith_pd	Jaccard	Bray-Curtis	Unweighted	Weighted
Inc-LF versus NonInc-LF	0.554	0.024	0.090	0.499	0.024	0.064	0.131	0.656
Inc-Med versus NonInc-Med	0.787	0.704	0.974	0.965	0.001	0.001	0.014	0.001

	α -diversity				β -diversity			
	Chao1	Simpson	Shannon	Faith_pd	Jaccard	Bray-Curtis	Unweighted	Weighted
Inc-LF versus Inc-Med	0.990	0.107	0.974	0.965	0.001	0.001	0.014	0.001
NonInc-LF versus NonInc-Med	0.175	1.000	0.902	0.275	0.670	0.455	0.373	0.557
Patients LF versus Patients Med	0.229	0.509	0.730	0.260	0.913	0.608	0.556	0.635

patients who did not develop T2D and were consuming the LF diet (NonInc-LF).

Baseline gut microbiota in the groups of patients who developed T2D consuming Med diet (Inc-Med) was characterized by the preponderance of the *Pasteurellales* order, *Preotellaceae*, *Veillonellaceae*, and *Pasteurellaceae* families, *Prevotella* genus, and by an unknown bacterial species from this genus. In contrast, the gut microbiota of the groups of patients who did not develop T2D and were consuming Med diet (NonInc-Med) was characterized by the preponderance of the *Odoribacteraceae*, *Porphyromonadaceae*, *Christensenellaceae* families, by an unknown genus from this latter family, *Parabacteroides*, the *Butyrivimonas* genera, and by an unknown bacterial species from this latter genus, an unknown bacterial species from *Bacteroides*, and *Bacteroides uniformis*.

We also analyzed the frequency of presence/absence of taxa between groups (Figure 1; Table S5, Supporting Information). We found a lower presence of *Actinobacteria* and *Gammaproteobacteria* classes, *Lactobacillales* order, *Streptococcaceae* family, *Bilophila* genus, *B. uniformis*, *V. parvula*, and an unknown bacterial species from *Parabacteroides* genus, and a higher presence of an unknown genus from *Christensenellaceae* family in Inc-LF compared with the NonInc-LF group. Moreover, we found a higher presence of *Fusobacterium* phylum, *Verrucomicrobiae* class, *Gemellaceae* family, *Megamonas*, *Megasphaera*, and *Phascolarctobacterium* genera, and *B. plebeius* bacterial species, and a lower presence of *Coprococcus* and *Holdemania* genera in Inc-Med than in the NonInc-Med group.

2.3. Gut Microbiota Profile in Incident T2D Patients is Different between Diets

We compared the baseline gut microbiota profile of the groups of patients who developed T2D while consuming an LF diet (Inc-LF), and those who developed T2D while consuming the Med diet (Inc-Med). Although we did not find any differences in α -diversity between the Inc-LF and Inc-Med groups of patients, in term of β -diversity, we did observe statistically significant non-phylogenetic qualitative (Jaccard index $p = 0.001$) and quantitative distances (Bray-Curtis index $p = 0.001$), in addition to phylogenetic qualitative (Unweighted Unifrac index $p = 0.014$) and quantitative distances (Weighted Unifrac index $p = 0.001$) between the Inc-LF and Inc-Med groups of patients. However, we did not find

any differences in α -diversity or β -diversity between the NonInc-LF and NonInc-Med groups of patients, or between all the patients who consumed the LF diet (Inc- and NonInc-LF) and all the patients who consumed the Med diet (Inc- and NonInc-Med) (Table 1).

Linear discriminant analysis effect size (LEfSe) showed a preponderance of the *Clostridium* genus in Inc-Med, while, in contrast, Inc-LF was characterized by a preponderance of *Paraprevotella* genus, by an unknown bacterial species from this genus, and by an unknown bacterial species from *Bacteroides* (Figure 1). In order to test whether the differences found between Inc-LF and Inc-Med were associated to the fact of T2D incidence, and not to the random differences between the gut microbiota in the patients assigned to each diet, we also explored the potential differences between the gut microbiota of the non-incidence patients for each diet and the differences between all the patients assigned to each diet (Figure S1, Supporting Information).

Furthermore, we analyzed the frequency of presence/absence of taxa between the Inc-LF and Inc-Med groups. We found a lower presence of *Pasteurellales* order, *Megamonas*, *Phascolarctobacterium*, and *Veillonellagenera*, and *B. adolescentis* and *B. fragilis* bacterial species, and a higher presence of an unknown genus from the *Christensenellaceae* family in the Inc-LF than in the Inc-Med group (Figure 1; Table S5, Supporting Information).

2.4. Building of Diet-Specific T2D Development Risk Scores Using Two Approaches

2.4.1. Random Survival Forest Predictive Model for T2D Incidence by Diet

Stepwise RSF selection in the data set from patients who consumed the LF diet indicated that 9 of the 132 bacterial taxa were informative for type 2 diabetes incidence (Table 2). ROC curves of the selected bacterial taxa yielded an area under the curve (AUC) of 0.687, which increased to 0.746 when the clinical variables (age, gender, BMI, HDL, TG, and statin intensity treatment) were included (Table 3). On the other hand, stepwise RSF selection in the data set from patients who consumed the Med diet indicated that 5 out of the 132 bacterial taxa were informative with regard to T2D incidence (Table 2). ROC curves of the selected bacterial taxa yielded an area under the curve AUC of 0.734, which increased

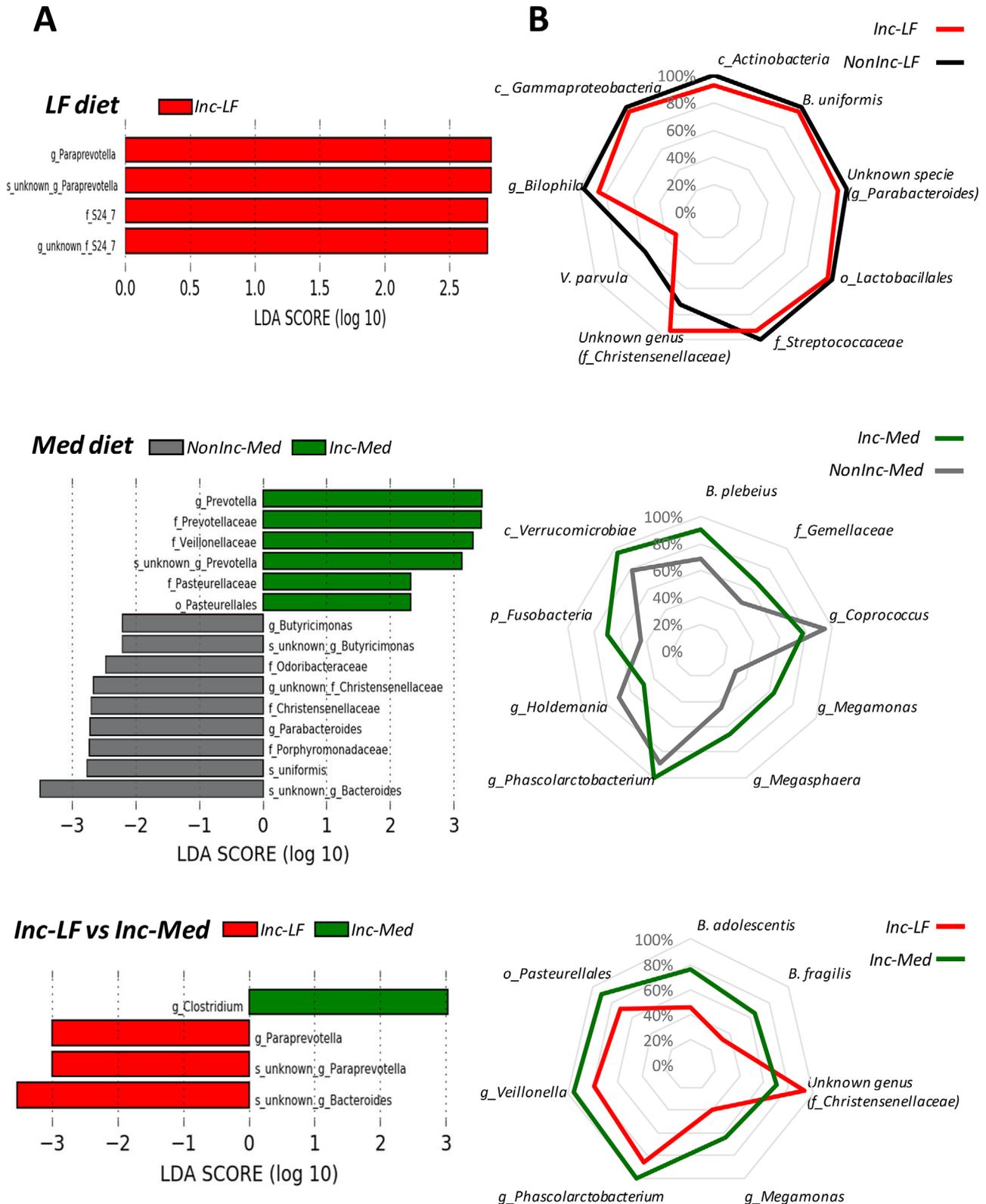


Figure 1. Differences in the microbiota profile in incident T2D according to diet. A) Linear discriminant analysis size effect. B) Analysis of presence/absence of bacterial taxa. LDA: Linear discriminant analysis. Inc-LF: patients who consumed the low-fat diet and developed T2D during the follow-up period. NonInc-LF: patients who consumed the low-fat diet and did not develop T2D during the follow-up period. Inc-Med: patients who consumed the Mediterranean diet and developed T2D during the follow-up period. NonInc-Med: patients who consumed the Mediterranean diet and did not develop T2D during the follow-up period.

Table 2. Bacterial taxa with discriminant value for diet-associated T2D risk, selected by Random Survival Forest and Lasso model.

RSF selection in the data set of the patients who consumed LF diet	Coef	exp(coef)
p ^{a)} _Proteobacteria	-0.48	0.62
p_Actinobacteria; c ^{b)} _Coriobacteriia; o ^{c)} _Coriobacteriales; f ^{d)} _Coriobacteriaceae; g ^{e)} _Collinsella	-0.60	0.55
p_Actinobacteria; c_Coriobacteriia; o_Coriobacteriales; f_Coriobacteriaceae; g_Collinsella; s ^{f)} _aerofaciens	0.55	1.73
p_Firmicutes; c_Bacilli	-0.05	0.95
p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Lachnospiraceae; g_Roseburia	0.02	1.02
p_Bacteroidetes; c_Bacteroidia; o_Bacteroidales; f_Prevotellaceae	2.52	1.25
p_Bacteroidetes; c_Bacteroidia; o_Bacteroidales; f_Prevotellaceae; g_Prevotella	-2.40	0.09
p_Bacteroidetes; c_Bacteroidia; o_Bacteroidales; f_Paraprevotellaceae; g_Paraprevotella	0.50	1.65
p_Bacteroidetes; c_Bacteroidia; o_Bacteroidales; f_Porphyrimonadaceae; g_Parabacteroides; s_distasonis	0.02	1.02
RSF selection in the data set of the patients who consumed Med diet	Coef	exp(coef)
p_TM7	0.19	1.21
p_Proteobacteria; c_Betaproteobacteria; o_Burkholderiales	0.18	1.20
p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Lachnospiraceae; g_Roseburia	0.09	1.10
p_Bacteroidetes; c_Bacteroidia; o_Bacteroidales; f_Rikenellaceae; g_unknown_f_Rikenellaceae	-0.12	0.88
p_Bacteroidetes; c_Bacteroidia; o_Bacteroidales; f_Prevotellaceae; g_Prevotella; s_unknown_g_Prevotella	0.36	1.43
Lasso selection in the data set of the patients who consumed LF diet	Coef	exp(coef)
p_Proteobacteria; c_Gammaproteobacteria	-0.223	0.800
p_Actinobacteria; c_Actinobacteria; o_Bifidobacteriales; f_Bifidobacteriaceae; g_Bifidobacterium; s_longum	0.064	1.066
p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Mogibacteriaceae	-0.225	0.798
p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Clostridiaceae; g_Clostridium	-0.228	0.796
p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Lachnospiraceae; g_Roseburia	0.009	1.009
p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Ruminococcaceae; g_Faecalibacterium	-0.088	0.916
p_Bacteroidetes; c_Bacteroidia; o_Bacteroidales; f_Rikenellaceae; g_Alistipes	0.157	1.170
p_Bacteroidetes; c_Bacteroidia; o_Bacteroidales; f_Paraprevotellaceae; g_Paraprevotella	0.202	1.224
p_Bacteroidetes; c_Bacteroidia; o_Bacteroidales; f_Bacteroidaceae; g_Bacteroides; s_uniformis	-0.336	0.715

(Continued)

Table 2. Continued.

Lasso selection in the data set of the patients who consumed Med diet	Coef	exp(coef)
p_TM7	0.005	1.005
p_Proteobacteria; c_Betaproteobacteria	0.228	1.256
p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Lachnospiraceae; g_Roseburia	0.032	1.032
p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Christensenellaceae; g_unknown_f_Christensenellaceae	-0.187	0.830
p_Bacteroidetes; c_Bacteroidia; o_Bacteroidales; f_Prevotellaceae; g_Prevotella; s_unknown_g_Prevotella	0.121	1.128
p_Bacteroidetes; c_Bacteroidia; o_Bacteroidales; f_Bacteroidaceae; g_Bacteroides; s_unknown_g_Bacteroides	-0.671	0.511

a) p, phylum; b) c, class; c) o, order; d) f, family; e) g, genus; f) s, bacterial specie.

Table 3. Receiving operating curves of the selected bacterial taxa by Random Survival Forest and Lasso models.

ROC analysis	AUC
Clinical variables for LF diet	0.641
Clinical variables for Med diet	0.725
Random Survival Forest predictive model for LF diet	
Microbiome	0.687
Microbiome + clinical variables	0.746
Random Survival Forest predictive model for Med diet	
Microbiome	0.734
Microbiome + clinical variables	0.826
Lasso Cox regression predictive model for LF diet	
Microbiome	0.742
Microbiome + clinical variables	0.808
Lasso Cox regression predictive model for Med diet	
Microbiome	0.777
Microbiome + clinical variables	0.781

to 0.826 when the clinical variables (age, gender, BMI, HDL, TG, and statin intensity treatment) were included (Table 3).

Furthermore, we built an RSF-based risk score for each diet (RSF-LF-score and RSF-Med-score) by multiplying the RSF normalized coefficient for each bacterial taxon by 1, 0, or -1, according to the following criteria: a high abundance for a detrimental taxon determined by ascending tertiles was scored as 1, and for a beneficial taxon as -1, and vice-versa for a low abundance. Thus, for a detrimental taxon (positive coefficient on RSF), tertile 1 was scored as -1 (protective), tertile 2 as 0 (neutral effect) and tertile 3 as 1 (risk), and the opposite for a beneficial taxon (negative coefficient on RSF): tertile 1 as 1 (risk), tertile 2 as 0 (neutral effect) and tertile 3 as -1 (protective).

We evaluated the potential role of these microbiome-based scores to assess the risk of T2D development by Cox regression analysis, categorizing patients who consumed an LF diet by ascending tertiles of the LF-score and patients who consumed the Med diet by ascending tertiles of the Med-score: T1, low-risk

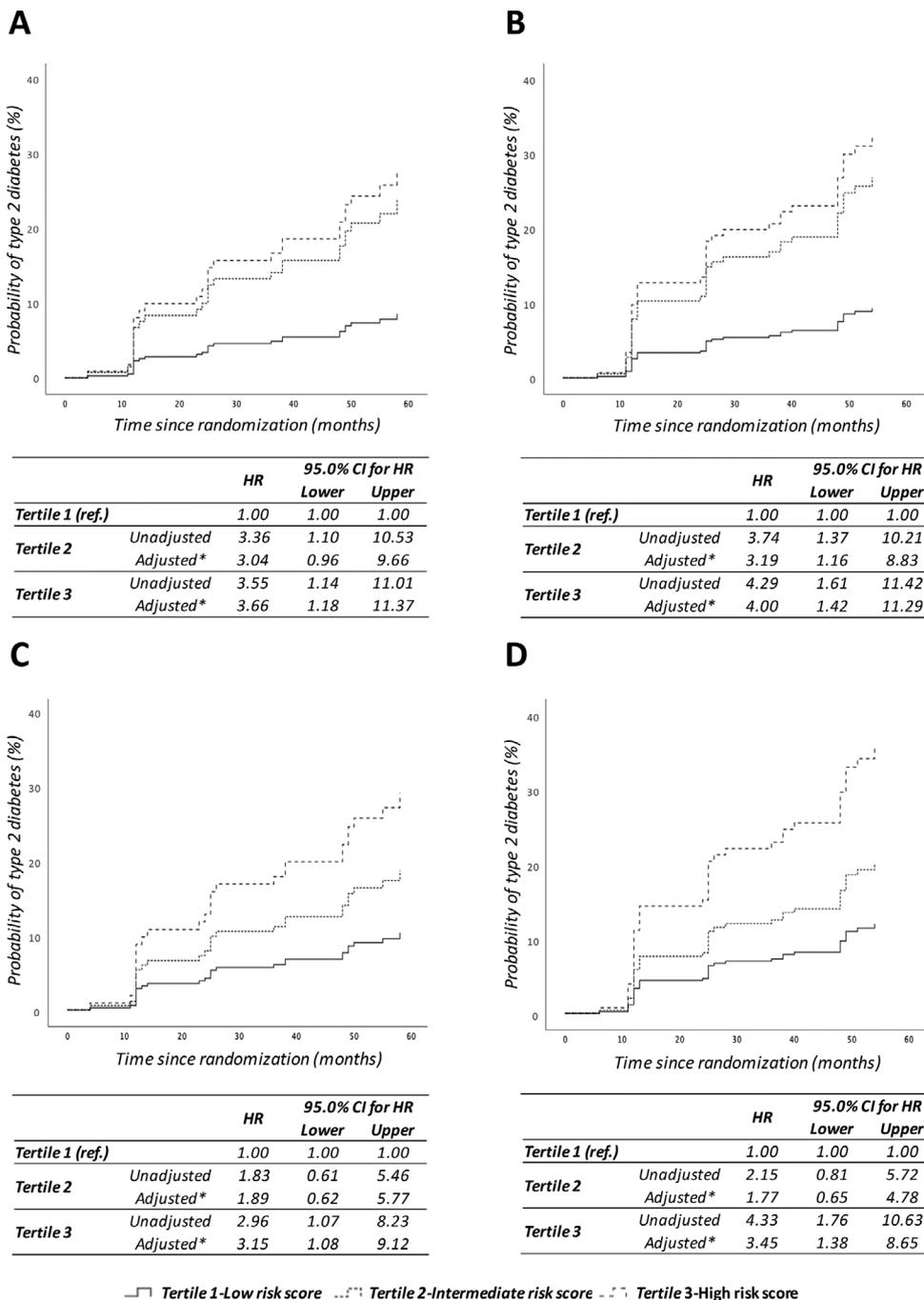


Figure 2. Probability of T2D development by Cox proportional hazards regression analysis according to microbiome-based risk scores for LF or Med diets. The diet-specific microbiome-based risk score was built with the bacterial taxa selected by Random Survival Forest for the patients who consumed an LF diet (RSF-LF score, panel A) and those who consumed the Med diet (RSF-Med score, panel B) or by the Lasso model for the patients who consumed an LF diet (Lasso-LF score, panel C) and for those who consumed the Med diet (Lasso-Med score, panel D). The data represent risk scores values by ascending tertiles: T1, low risk score (continuous line); T2, intermediate risk score (dotted line); T3, high-risk score (dashed line). HR: Hazard ratio. CI: confidence interval. *This model was adjusted by age, gender, BMI, HDL, TG, and intensity of statin treatment.

score; T2, intermediate-risk score; T3, high-risk score. For the RSF-LF-score, we found an adjusted Hazard Ratio (HR) of 3.039 (95% CI 0.956–9.662) between the tertiles of T1 versus T2, and 3.656 (95% CI 1.176–11.368) between the tertiles of T1 versus T3 (Figure 2A), and for the RSF-Med-score, we found an adjusted

HR of 3.192 (95% CI 1.155–8.825) between the tertiles of T1 versus T2, and 3.996 (95% CI 1.415–11.287) between the tertiles of T1 versus T3 (Figure 2B). We also categorized patients who consumed LF diet by ascending tertiles of the Med-score and patients who consumed Med diet by ascending tertiles of the LF-score,

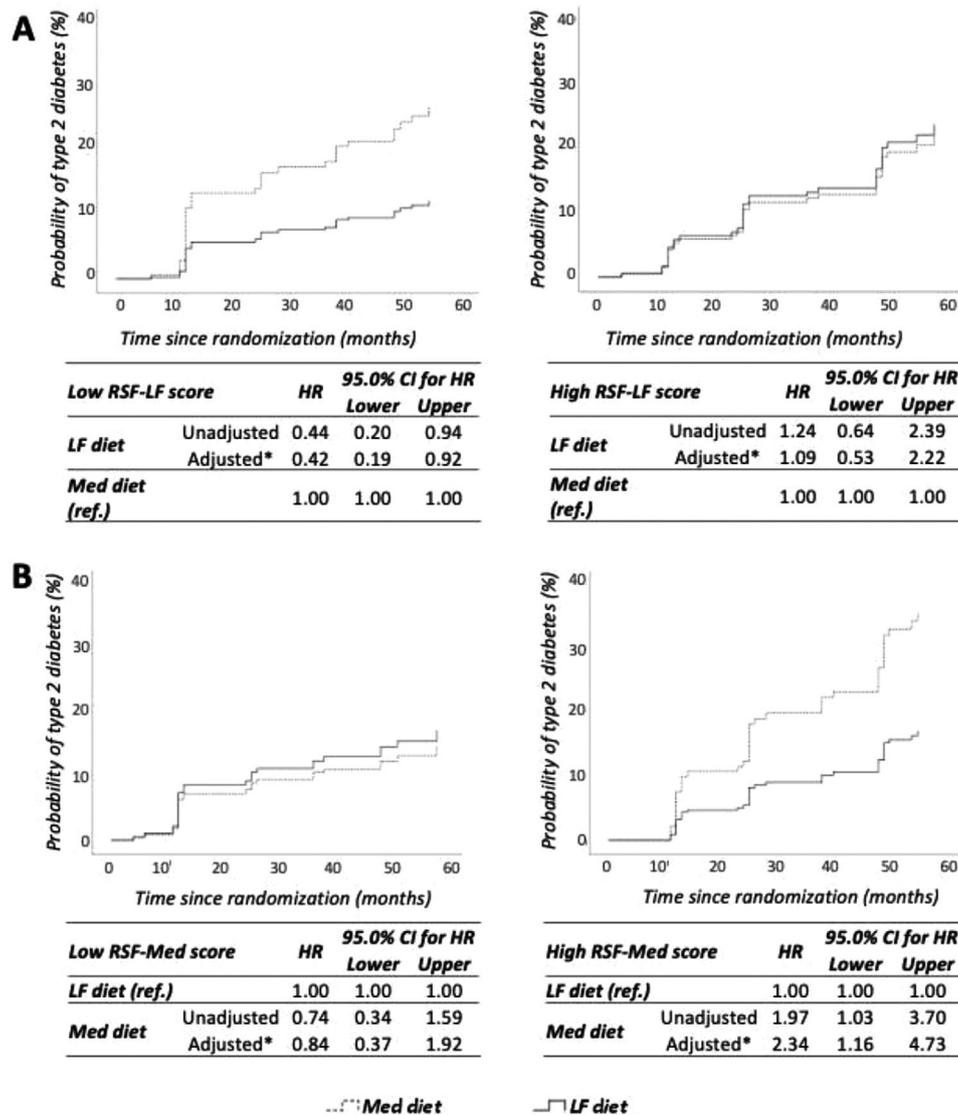


Figure 3. Probability of T2D development assessed by diet-specific microbiome-based RSF risk scores by Cox proportional hazards regression analysis according to diet. Patients who consumed each diet were categorized according to the A) RSF-LF and B) RSF-Med values by median: low-risk score and high-risk score. HR: Hazard ratio. CI: confidence interval. *This model was adjusted by age, gender, BMI, HDL, TG, and intensity of statin treatment. Low-fat (LF) diet, continuous line. Mediterranean (Med) diet, dotted line.

and we found no significant association between the RSF-LF risk score and T2D development in patients who consumed the Med diet, and between the RSF-Med risk score and T2D development in patients who consumed the LF diet (Figure S2, Supporting Information).

2.4.2. Random Survival Forest-Based Scores to Assess the Diet-Specific Risk of T2D

To assess the potential of these diet-specific scores to assess the T2D risk associated with the LF or Med diets, we categorized the patients who consumed LF and Med diets by the median of their LF-score. We further tested, in patients with low and high RSF-LF-score separately, the T2D development risk associated

with the consumption of LF and Med diets by Cox regression analysis. We found an adjusted HR of 0.417 (95% CI 0.190–0.915) for the consumption of the LF diet as compared with the consumption of the Med diet (used as reference) in patients with a low RSF-LF-score, while we observed no differences in T2D development risk between diets in patients with a high RSF-LF-score (Figure 3A; Table S6, Supporting Information). We also categorized the patients who consumed LF and Med diets by the median of the Med-score and tested the T2D development risk. Although we observed no differences in T2D risk development between diets in patients with a low RSF-Med-score, we found an adjusted HR of 2.339 (95% CI 1.157–4.726) for the consumption of a Med diet as compared with the consumption of an LF diet (used as reference) in patients with a high RSF-Med-score (Figure 3B; Table S6, Supporting Information).

2.4.3. Lasso Cox Regression Predictive Model for T2D Incidence by Diet

A LASSO Cox regression model, together with tenfold cross-validation, was performed to analyze the data set from the patients who consumed the LF diet, and a set of 9 out of 132 bacterial taxa was identified (Table 2). ROC curves of the selected bacterial taxa yielded an area under the curve AUC of 0.742, which increased to 0.808 when the clinical variables (age, gender, BMI, HDL, TG, and statin intensity treatment) were included (Table 3). Likewise, the LASSO Cox regression model performed to analyze the data set from patients who consumed the Med diet identified a set of 6 bacterial taxa (Table 2). Further ROC curves of these bacterial taxa yielded an area under the curve AUC of 0.777, which increased to 0.781 when the clinical variables were included (Table 3).

According to the results, each diet-specific set of bacterial taxa along with their coefficients were included into a T2D development risk score formula for each diet, which was built by multiplying the LASSO Cox regression model coefficient for selected bacterial taxa by 1, 0 or -1 , according to the previous criteria for detrimental taxa (positive coefficient) or beneficial taxa (negative coefficient). We evaluated the potential role of these microbiome-based scores to assess the risk of T2D development by Cox regression analysis, categorizing patients who consumed the LF diet by ascending tertiles of the Lasso-LF-score and patients who consumed the Med diet by ascending tertiles of the Lasso-Med-score: T1, low-risk score; T2, intermediate-risk score; T3, high-risk score. For the Lasso-LF-score, we found an adjusted HR of 1.894 (95% CI 0.622–5.766) between the tertiles of T1 versus T2, and 3.145 (95% CI 1.840–9.123) between the tertiles of T1 versus T3 (Figure 2C), and for the Lasso-Med-score, we found an adjusted HR of 1.766 (95% CI 0.652–4.781) between the tertiles of T1 versus T2, and 3.447 (95% CI 1.375–8.646) between the tertiles of T1 versus T3 (Figure 2D). We also categorized patients who consumed the LF diet by ascending tertiles of the Lasso-Med-score and patients who consumed the Med diet by ascending tertiles of the Lasso-LF-score, and found no significant associations between the Lasso-LF-score and T2D development in patients who consumed the Med diet, or between the Lasso-Med-score and T2D development in patients who consumed the LF diet (Figure S2, Supporting Information).

2.4.4. LASSO Cox Regression-Based Scores to Assess the Diet-Specific Risk of T2D

In order to evaluate the potential of these diet-specific scores to assess the T2D risk associated with the consumption of the LF or Med diets, we categorized the patients who consumed the LF and Med diets together by the median of the Lasso-LF-score. We further tested, in patients with low and high Lasso-LF-scores separately, the T2D development risk associated with the consumption of LF and Med diets by Cox regression analysis. We found an HR of 0.502 (95% CI 0.206–1.223) for the consumption of the LF diet as compared with the consumption of the Med diet (used as reference) in patients with a low Lasso-LF-score, while we observed no differences in T2D development risk between diets in patients with a high Lasso-LF-score (Figure 4A; Table S7,

Supporting Information). We also categorized the patients who consumed the LF and Med diets together by the median of the Lasso-Med-score and tested the T2D development risk. Although we observed no differences in T2D development risk between the diets in patients with a low Lasso-Med-score, we found an HR of 1.966 (95% CI 1.003–3.853) for the consumption of the Med diet as compared with the consumption of the LF diet (used as reference) in patients with a high Lasso-Med-score (Figure 4B; Table S7, Supporting Information).

3. Discussion

Our study showed that the architecture of the baseline gut microbiota from patients who developed T2D consuming an LF diet was different to that from patients who developed T2D consuming a Med diet. These differences in the gut microbiota profile were the starting point to build microbiota-based diet-specific risk scores by two approaches (RSF and Lasso models), which allowed us to determine the individual risk of T2D development according to the consumption of the LF or Med diets.

In recent years, new biomarkers such as circulating miRNAs or metabolomic-based approaches for the early detection of T2D risk have been discovered,^[21,22] which circumvent the weak predictive value provided by the traditional clinical biomarkers included in the FINDRISC score.^[3] Whereas these new biomarkers have improved the assessment of the T2D risk, they do not inform on how to reduce the risk, although a miRNAs profile has recently been shown to partially determine the risk associated with the consumption of a specific diet.^[23]

Dietary factors are of paramount importance in the management and prevention of T2D; however, there is no consensus about the best dietary pattern, given the different effects observed in the management of T2D by different authors, which suggests that population-specific factors may determine the success in preventing T2D of a given nutritional therapy.^[5]

Recent studies have suggested that gut microbiome composition may play a role the different responses to dietary interventions observed.^[16–18] In this context, our study suggests that the abundance of several bacterial taxa, selected by RSF and Lasso models, may determine the specific risk for developing T2D, depending on the diet, LF or Med, consumed. This is also supported by the fact that it has been proposed that the gut microbiota, which collaborates as an organ fully integrated into the host's metabolism,^[24] acts as an interconnector between diet and disease.^[6]

Linear discriminant analysis effect size (LEfSe) has shown that the baseline gut microbiota profile associated with T2D incidence in patients who consumed an LF diet was different from that observed by patients who consumed the Med diet, which supports the idea that the interactions between the gut microbiome, metabolism and nutrition are important determinants of health outcomes.^[6] Based on this, we built microbiota-based diet-specific risk scores using two approaches (RSF and Lasso models), which allowed us to determine the individual risk of T2D development according to the consumption of an LF or a Med diet.

Cox's proportional hazard regression analysis showed that LF-scores (RSF-LF-score and Lasso-LF-score) linked the harboring of the LF-specific gut microbiota profile with T2D incidence when

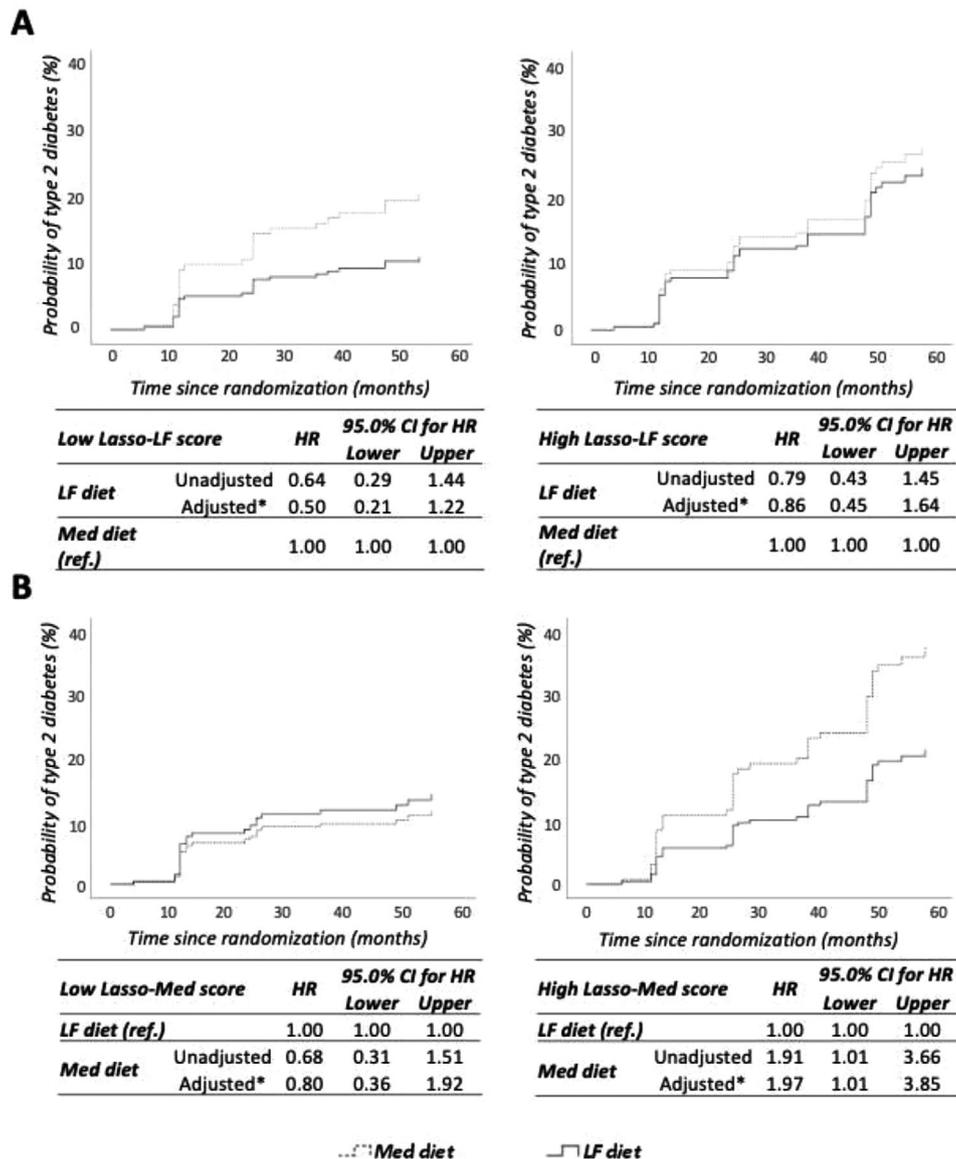


Figure 4. Probability of T2D development assessed by diet-specific microbiome-based Lasso risk scores by Cox proportional hazards regression analysis according to diet. Patients who consumed each diet were categorized according to the A) Lasso-LF and B) Lasso-Med values by median: low-risk score and high-risk score. HR: Hazard ratio. CI: confidence interval. *This model was adjusted by age, gender, BMI, HDL, TG, and intensity of statin treatment. Low-fat (LF) diet, continuous line. Mediterranean (Med) diet, dotted line.

an LF diet was consumed. However, no association was observed between the LF-score and the development of T2D in patients who consumed a Med diet. The opposite was observed for Med-scores (RSF-Med-score and Lasso-Med-score): there was an association with T2D incidence when a Med diet was consumed, and no association in patients who consumed an LF diet.

Here, our study shows the potential role of *Proteobacteria* phylum in harboring the specific risk to T2D development associated with the consumption of an LF or a Med diets. Thus, a higher abundance of *Proteobacteria* (or specifically, the *Gammaproteobacteria* class) was associated with a reduced risk of T2D development when an LF diet was consumed. In contrast, a great abundance of the *Proteobacteria*-belonging *Betaproteobacteria* class was associated with T2D incidence when a Med diet was consumed.

In contrast to other classes of *Proteobacteria*, such as *Alphaproteobacteria* and *Deltaproteobacteria*, also present in our study population, most of the members of *Gamma*- and *Betaproteobacteria* classes are chemo-organotrophs.^[25] The fact that these classes obtain energy from the oxidation of reduced organic compounds supports the idea about their role as an interconnector between the intake of specific nutrients and the host physiology, as these classes may preferentially interact with different nutrients.

Moreover, the *Saccharibacteria* (formerly TM7) phylum has previously been associated with oral mucosal infectious diseases,^[26] which points to a potentially detrimental effect on the intestinal mucosal layer that may favor the absorption of pro-inflammatory bacterial components, such as LPS. This was seen to be relevant when the Med diet was consumed, as it

had a higher fat content than the LF diet, and LPS absorption is increased by fat intake,^[27] which may explain that a higher abundance of *Saccharibacteria* phylum was associated to T2D risk when a Med diet was consumed, whereas no association with T2D was observed when an LF diet was consumed. Elevated endotoxemia precedes the development of T2D^[28] and induces hepatic insulin resistance.^[29]

Furthermore, the abundance of several members of the *Bacteroidales* order was also seen to be highly discriminant between T2D incidence and the diet consumed. Whereas the *Bacteroidales*-belonging genus *Paraprevotella* was associated with T2D risk when an LF diet was consumed, *Prevotella* (specifically an unknown bacterial species from the *Prevotella* genus) was associated with T2D risk when a Med diet was consumed. The abundances of these two genera have been reported to decrease after duodenal-endoluminal sleeve surgery in parallel with an improvement in glucose homeostasis.^[30] A higher abundance of *Prevotella* has been traditionally associated with the consumption of an agrarian-type diet, rich in fruit and vegetables, whereas the abundance of *Bacteroides* has been usually linked to high-fat and protein-rich diets.^[31,32] Different components of the genus *Prevotella* could be associated with either plant-based or animal-based diets,^[33] and both positive and negative associations have been reported, with diet as a potential selector of distinctive *Prevotella* members with distinct functions.^[20]

As previously stated, different members of the genus *Bacteroides* have also been associated with plant- or animal-based diets.^[33] Here, we showed the potential protective effect of two bacterial species belonging to the *Bacteroides* genus, *B. uniformis*, with an important glycolytic capability^[34] and an undefined species, when LF or Med diets were consumed respectively. Taking into account the potential beneficial role of fiber-rich diets, the capacity to degrade specific carbohydrates may be a determinant factor by which bacterial taxa may interact with the nutrients ingested within a specific diet and exert a beneficial, neutral, or detrimental effect on the host.

Overall, our findings support the idea about gut microbiome features as determinant factors that may be involved in the different responses observed to dietary interventions.^[16–18] Overall, our study suggests that when we consider the gut microbiota profile of an individual, the capacity of this bacterial set to interact with the nutrients ingested following LF or Med diets might determine the triggering or not of T2D development. Thus, our study suggests that gut microbiome features may be used for selecting a personalized dietary model to prevent T2D by recommending the nutritional model which is consistent with a lower risk.

Nevertheless, our study showed asymmetric accuracy in evaluating the risk. Although both approaches yielded LF-scores that accurately discriminate the low-risk associated with the consumption of the LF diet compared with the consumption of the Med diet, no such discrimination is exerted in patients with a high-risk score. The opposite was observed for the Med-scores obtained by both approaches, with no discrimination in patients with a low-risk associated score, but accurate discrimination of the high-risk associated with the consumption of Med diet compared with the consumption of an LF diet. Moreover, both approaches seem to discriminate the risk associated to the consumption of each diet in the following 30 months rather than later on time. However, more studies are needed to explore the

potential use of the differences in the gut microbiota, alone or combined with other physiological features, and the time windows in which the potential risk is associated, to develop a tool for a personalized selection of nutrients as nutritional therapy.

Our study also has other limitations. First, the prevention of T2D was not the primary endpoint of the CORDIOPREV trial, as the present study is a secondary analysis conducted in the subgroup of patients without T2D at baseline. Moreover, these patients have CHD, which limits our findings to this patient population and precludes the generalization of our results to the population as a whole. Finally, the sample size was limited, as the subgroup of patients were divided by diet and those who had recently consumed antibiotics, were excluded. Nevertheless, the prevention of T2D is of vital importance, as patients with concurrent CHD and T2D have a considerably higher risk of developing a new cardiovascular event than those without T2D.^[35] Moreover, our study provides evidence of the potential use of gut microbiome features, alone or in combination with other discriminant factors, as a tool for evaluating the T2D risk associated with the consumption of a specific diet. Thus, recommending the consumption of a specific low T2D-risk diet, informed by the microbiota, may be a therapeutic tool for patients at risk.

In conclusion, our results suggest that the microbiome's differential interactions harbored in the intestine and the nutrients ingested may at least partially determine T2D development, as evidenced by the differences in the baseline gut microbiota architecture of patients who developed T2D while consuming an LF or a Med diet. However, more studies are needed to replicate these finding in other populations in addition to test other dietary models. Our study suggests the possible use of the differences in the gut microbiota profile to build microbiota-based diet-specific risk scores. This potential tool may be useful to assess the individual T2D risk associated with different diets, and may help to prevent T2D in clinical practice.

4. Experimental Section

Study Patients: The current work was conducted within the framework of the CORDIOPREV study (Clinicaltrials.gov NTC00924937), an ongoing prospective, randomized, opened, controlled trial including 1002 patients with coronary heart disease (CHD), who had their last coronary event more than 6 months before their enrolment in two different dietary models (Med diet and LF diet), over 7 years, in addition to conventional treatment for CHD. The eligibility criteria, design, and methods of the trial have been reported elsewhere.^[36] All patients gave their written informed consent to participate in the study. The trial protocol and all amendments were approved by the local ethical committee Reina Sofia University Hospital Ethics Committee, following the Helsinki declaration and good clinical practices.

From a total of 462 non-diabetic patients at baseline in the CORDIOPREV study, 107 patients developed type 2 diabetes, according to the American Diabetes Association diagnosis criteria, after a median of follow-up of 60 months (Table S1, Supporting Information). From the patients included in this study during the follow-up, 17 patients died and 7 patients dropped out without being diagnosed with diabetes.^[37] Fecal samples were available at baseline for a total of 319 patients who had not received treatment with antibiotics within a month before baseline sample collection; among them, 69 patients developed type 2 diabetes during the follow-up (Tables S2, S3, Supporting Information). Baseline characteristics of the study population according to the diet consumed and the incidence of T2D are shown in Table S4, Supporting Information.

Study Design: The study design has been previously described.^[36] Briefly, participants were randomized to receive two diets: a Med diet or an LF diet. The LF diet consisted of <30% total fat (<10% saturated fat, 12–14% MUFA fat, and 6–8% PUFA fat), 15% protein, and a minimum of 55% carbohydrates. The Med diet comprised a minimum of 35% of calories as fat (22% MUFA fat, 6% PUFA fat, and <10% saturated fat), 15% proteins, and a maximum of 50% carbohydrates. In both diets, the cholesterol content was adjusted to <300 mg/d.

Dietary Assessment: At the beginning of the study and every year, each patient had a face-to-face interview with a nutritionist to fill in a 137-item semi-quantitative food frequency questionnaire, validated in Spain,^[38] as well as a validated 14-item questionnaire of adherence to the Med diet to produce a Med diet score.^[39]

The Med and LF diets were designed to provide a wide variety of foods, including vegetables, fruit, cereals, potatoes, legumes, dairy products, meat, and fish. The participants in both intervention groups received the same intensive dietary counseling. The nutritionists administered personalized individual interviews at inclusion and every six months, and quarterly group education sessions were held with up to 20 participants per session and separate sessions for each group.

Oral Glucose Tolerance Test: An oral glucose tolerance test (OGTT) was performed at baseline and every year after that to establish plasma glucose and insulin levels. Insulin sensitivity index (ISI), homeostatic model assessment of insulin resistance (HOMA-IR), insulinogenic index (IGI), hepatic insulin resistance index (HIRI), muscle insulin sensitivity index (MISI), and disposition index (DI) were calculated as previously described.^[40]

Intestinal Microbiota Analysis: Fecal samples were collected at baseline and stored at -80°C . The DNA extraction was performed using the QIAamp DNASTool Mini Kit Handbook (QIAGEN, Hilden, Germany), following the manufacturer's instructions. Also following to the manufacturer's instructions, microbiota composition analysis of the fecal samples was performed on a MiSeq Illumina platform (Illumina, San Diego, CA). Briefly, a PCR was performed using 0.2 μm of each of the primers 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-3' and 5'-GTCTCTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-3'^[41] to generate amplicons containing the hypervariable region V3 of the 16S rRNA gene, KAPA HiFi HotStart ReadyMix (KAPABIOSYSTEMS), and 1.25 μL of extracted DNA (5 ng μL^{-1} in 10 mM Tris pH8.5), using the following cycle parameters: 3 min denaturation at 95°C followed by 25 cycles (30 s at 95°C , 30 s at 60°C , 30 s at 72°C) and a final extension at 72°C for 5 min. The amplicon purification was performed using Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter). A second PCR reaction added dual indices and Illumina adapter sequencing using the Nextera XT Index Kit. This PCR was performed with a KAPA HiFi HotStart ReadyMix (KAPABIOSYSTEMS), 5 μL of the previous amplicon, 5 μL of each Nextera XT Index Primer 1 (N7xx), and 5 μL of each Nextera XT Index Primer 2 (S5xx), using the following cycle parameters: 3 min denaturation at 95°C followed by 8 cycles (30 s at 95°C , 30 s at 55°C , 30 s at 72°C) and a final extension at 72°C for 5 min. The PCR product purification was performed using Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter). Sequencing data were analyzed and visualized using QIIME 2 v. 2019.7.^[42] Demultiplexed single-end reads containing V3 hypervariable region were truncated at 212 bp (quality score median > 30), and denoised using the DADA2 method.^[43] Bacterial richness and diversity across the samples were calculated using the Chao1, Simpson, Shannon, and phylogenetic diversity (Faith_pd) indexes. Principal component analysis of the community structure (beta-diversity) was performed using the unweighted and weighted UniFrac distance metrics^[44] and analyzed by permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA). Taxonomy was assigned to the high-quality reads using q2-feature-classifier^[45] with a sequence identity threshold of 99% when the sequences were interrogated with the Greengenes database (13_8).^[46] To be consistent with the 16S rRNA taxonomic data obtained, only taxa in the bacterial domain were included in the statistical analysis. In each sample, the relative taxonomic abundance was measured as the proportion of reads over the total assigned to a given taxonomy. To exclude bacterial taxa that were not present in the majority of samples, a cut-off for exclusion was fixed; only bacterial taxa containing sequence reads in at least 75% of the total samples were considered. Linear discriminant analysis (LDA) effect size

(LEfSe) (<http://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/>) was used to compare groups at baseline and visualize the results using taxonomic bar charts and cladograms.^[47]

Selection of Bacterial Taxa to be Included on the Scores: Variable selection was performed using logistic LASSO (Least Absolute Shrinkage and Selection Operator) regression analysis. Penalized Lasso regression models were used to obtain a list of relevant predictors included in the model by setting some of the coefficients exactly equal to zero with the Lasso-penalization coefficient, which was tuned in this study using tenfold cross-validation.^[21] In the Random Survival Forest (RSF) models, the variable predictiveness was assessed using variable importance measures.^[22] Variable selection was achieved in this case using minimal depth. The models were fitted using R software (version 3.6.2).

Diet-Specific Microbiota-Based Risk Score: Risk scores were built by multiplying the normalized coefficient for each bacterial taxon, selected by the RSF or Lasso model, by 1, 0, or -1 , according to the following criteria. A high abundance for a detrimental taxon determined by ascending tertiles was scored as 1, for a beneficial taxon as -1 , and vice-versa for a low abundance. In this regard, for a detrimental taxon (positive coefficient on RSF or Lasso models), tertile 1 was scored as -1 (protective), tertile 2 as 0 (neutral effect) and tertile 3 as 1 (risk), and the opposite for a beneficial taxon (negative coefficient on RSF or Lasso models): tertile 1 as 1 (risk), tertile 2 as 0 (neutral effect), and tertile 3 as -1 (protective). T2D development risk was then evaluated according to the score generated by the Cox regressions, categorizing patients by ascending tertiles of the score: T1, low-risk score; T2, intermediate-risk score; T3, high-risk score.

Statistical Analysis: SPSS statistical software (IBM SPSS Statistics version 21.0) was used for the statistical analysis of data. The normal distribution of variables was assessed using the Kolmogorov–Smirnov test. The statistical differences in the central metabolic continuous variables between groups were evaluated by one-way ANOVA. The chi-square test was applied to establish differences in bacterial presence/absence in bacterial taxa containing sequence reads in at least 50% of the total samples in at least one of the groups. In addition, Cox proportional hazard regression analysis was performed, including the following co-variables: age, gender, BMI, HDL, triglycerides (TG), and the intensity of statin therapy, according to the American Heart Association.^[48] p -values < 0.05 were considered significant.

Supporting Information

Supporting Information is available from the Wiley Online Library or from the author.

Acknowledgements

The CIBEROBN is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain. The CORDIOPREV study is supported by Ministerio de Economía y Competitividad through grants AGL2012/39615, PIE14/00005, and PIE 14/00031 to J.L.-M.; AGL2015-67896-P to J.L.-M. and A.C.; CP14/00114 to A.C.; PI19/00299 to A.C.; DTS19/00007 to A.C.; FIS PI13/00023 to J.D.-L., PI16/01777 to P.P.-M.; Fundación Patrimonio Comunal Olivarero, Junta de Andalucía (Consejería de Salud, Consejería de Agricultura y Pesca, Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa), Diputaciones de Jaen y Cordoba, Centro de Excelencia en Investigación sobre Aceite de Oliva y Salud and Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino, Gobierno de España; Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, Proyectos de Investigación de Excelencia, Junta de Andalucía through grant CVI-7450 to J.L.-M.; and by the Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). Antonio Camargo is supported by an ISCIII research contract (Programa Miguel-Servet CP14/00114 and CPII19/00007). The authors want to thank the Córdoba branch of the Biobank of the Sistema Sanitario Público de Andalucía (Andalusia, Spain) for providing the human biological samples. The authors would also like to thank the EASP (Escuela Andaluza de Salud Pública), Granada, Spain, which performed the randomization process for this study. The Author Contributions Statement and the academic title for A.C. were updated on November 30, 2020.

Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Author Contributions

A.C. and C.V.-D. contributed equally to this work. J.D.-L. and J.L.-M. share senior authorship. A.C. and C.V.-D. wrote the draft manuscript. J.F.A.-D. and A.V.-G. collected data and performed the classification of participants. C.V.-D., A.V.-G., F.G.-D., C.A. performed the experiments. J.F.A.-D., M.P.C., and J.D.T.-P. performed the medical revisions of participants and clinical databases. I.G., P.P.-M., and J.D.-L. performed the statistical analysis. A.C. P.P.-M., M.M.M., and J.L.-M. interpreted the data and contributed to the discussion. A.C., A.V.-G., M.M.M., J.M.O., P.P.-M., J.D.-L., and J.L.-M. contributed to the writing of the manuscript and revised it critically for important intellectual content. J.L.-M. and A.C. are the guarantors of this work and, as such, had full access to all the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Keywords

CORDIOPREV, diet, intestinal microbiota, predictive model, type 2 diabetes

Received: July 23, 2020

Revised: October 1, 2020

Published online: October 29, 2020

- [1] E. Ginter, V. Simko, *Adv. Exp. Med. Biol.* **2012**, 771, 42.
- [2] World Health Organization, *Global Action Plan for the Prevention and Control of NCDs 2013–2020*, WHO Document Production Services, Geneva, Switzerland **2013**.
- [3] P. E. Schwarz, J. Li, M. Reimann, A. E. Schutte, A. Bergmann, M. Hanefeld, S. R. Bornstein, J. Schulze, J. Tuomilehto, J. Lindstrom, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2009**, 94, 920.
- [4] S. H. Ley, O. Hamdy, V. Mohan, F. B. Hu, *Lancet* **2014**, 383, 1999.
- [5] N. G. Forouhi, A. Misra, V. Mohan, R. Taylor, W. Yancy, *BMJ* **2018**, 361, k2234.
- [6] M. Verma, R. Hontecillas, V. Abedi, A. Leber, N. Tubau-Juni, C. Philipson, A. Carbo, J. Bassaganya-Riera, *Front. Nutr.* **2016**, 3, 5.
- [7] J.-P. Furet, L.-C. Kong, J. Tap, C. Poitou, A. Basdevant, J.-L. Bouillot, D. Mariat, G. Corthier, J. Doré, C. Henegar, S. Rizkalla, K. Clément, *Diabetes* **2010**, 59, 3049.
- [8] F. H. Karlsson, V. Tremaroli, I. Nookaew, G. Bergström, C. J. Behre, B. Fagerberg, J. Nielsen, F. Bäckhed, *Nature* **2013**, 498, 99.
- [9] M. T. Khan, M. Nieuwdorp, F. Bäckhed, *Cell Metab.* **2014**, 20, 753.
- [10] J. Qin, Y. Li, Z. Cai, S. Li, J. Zhu, F. Zhang, S. Liang, W. Zhang, Y. Guan, D. Shen, Y. Peng, D. Zhang, Z. Jie, W. Wu, Y. Qin, W. Xue, J. Li, L. Han, D. Lu, P. Wu, Y. Dai, X. Sun, Z. Li, A. Tang, S. Zhong, X. Li, W. Chen, R. Xu, M. Wang, Q. Feng, et al., *Nature* **2012**, 490, 55.
- [11] H. Tilg, A. R. Moschen, *Gut* **2014**, 63, 1513.
- [12] A. K. Groen, M. Nieuwdorp, *EMBO Mol. Med.* **2017**, 9, 1.
- [13] R. S. Kootte, E. Levin, J. Salojärvi, L. P. Smits, A. V. Hartstra, S. D. Udayappan, G. Hermes, K. E. Bouter, A. M. Koopen, J. J. Holst, F. K. Knop, E. E. Blaak, J. Zhao, H. Smidt, A. C. Harms, T. Hankemeijer, J. J. G. H. M. Bergman, H. A. Romijn, F. G. Schaap, S. W. M. Olde Damink, M. T. Ackermans, G. M. Dallinga-Thie, E. Zoetendal, W. M. de Vos, M. J. Serlie, E. S. G. Stroes, A. K. Groen, M. Nieuwdorp, *Cell Metab.* **2017**, 26, 611.
- [14] L. P. Smits, K. E. C. Bouter, W. M. de Vos, T. J. Borody, M. Nieuwdorp, *Gastroenterology* **2013**, 145, 946.
- [15] A. Vrieze, E. Van Nood, F. Holleman, J. Salojärvi, R. S. Kootte, J. F. W. M. Bartelsman, G. M. Dallinga-Thie, M. T. Ackermans, M. J. Serlie, R. Oozeer, M. Derrien, A. Druesne, J. E. T. Van Hylckama Vlieg, V. W. Bloks, A. K. Groen, H. G. H. J. Heilig, E. G. Zoetendal, E. S. Stroes, W. M. de Vos, J. B. L. Hoekstra, M. Nieuwdorp, *Gastroenterology* **2012**, 143, 913.
- [16] F. De Filippis, P. Vitaglione, R. Cuomo, R. Berni Canani, D. Ercolini, *Inflammatory Bowel Dis.* **2018**, 24, 2142.
- [17] M. Derrien, P. Veiga, *Trends Microbiol.* **2017**, 25, 100.
- [18] N. Zmora, D. Zeevi, T. Korem, E. Segal, E. Elinav, *Cell Host Microbe* **2016**, 19, 12.
- [19] S. E. Berry, A. M. Valdes, D. A. Drew, F. Asnicar, M. Mazidi, J. Wolf, J. Capdevila, G. Hadjigeorgiou, R. Davies, H. Al Khatib, C. Bonnett, S. Ganesh, E. Bakker, D. Hart, M. Mangino, J. Merino, I. Linenberg, P. Wyatt, J. M. Ordovas, C. D. Gardner, L. M. Delahanty, A. T. Chan, N. Segata, P. W. Franks, T. D. Spector, *Nat. Med. (N. Y., NY, U. S.)* **2020**, 26, 964.
- [20] F. De Filippis, E. Pasoli, A. Tett, S. Tarallo, A. Naccarati, M. De Angelis, E. Neviani, L. Cocolin, M. Gobetti, N. Segata, D. Ercolini, *Cell Host Microbe* **2019**, 25, 444.
- [21] N. Simon, J. Friedman, T. Hastie, R. Tibshirani, *J. Stat. Software* **2011**, 39, 1.
- [22] L. Breiman, *Mach. Learn.* **2001**, 45, 5.
- [23] R. Jimenez-Lucena, J. F. Alcalá-Díaz, I. Roncero-Ramos, I. Lopez-Moreno, A. Camargo, F. Gomez-Delgado, G. M. Quintana-Navarro, C. Vals-Delgado, F. Rodriguez-Cantalejo, R. M. Luque, J. Delgado-Lista, J. M. Ordovas, P. Perez-Martinez, O. A. Rangel-Zuñiga, J. Lopez-Miranda, *Clin. Nutr.* **2020**, <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2020.06.035>.
- [24] V. Tremaroli, F. Bäckhed, *Nature* **2012**, 489, 242.
- [25] M. Gargaud, R. Amils, J. C. Quintanilla, H. J. Cleaves, W. M. Irvine, D. Pinti, M. Viso, *Encyclopedia of Astrobiology*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg **2015**, p. 1.
- [26] B. Bor, J. K. Bedree, W. Shi, J. S. McLean, X. He, *J. Dent. Res.* **2019**, 98, 500.
- [27] H. Ghanim, S. Abuaysheh, C. L. Sia, K. Korzeniewski, A. Chaudhuri, J. M. Fernandez-Real, P. Dandona, *Diabetes Care* **2009**, 32, 2281.
- [28] A. Camargo, R. Jimenez-Lucena, J. F. Alcalá-Díaz, O. A. Rangel-Zuniga, S. Garcia-Carpintero, J. Lopez-Moreno, R. Blanco-Rojo, J. Delgado-Lista, P. Perez-Martinez, B. van Ommen, M. M. Malagon, J. M. Ordovas, F. Perez-Jimenez, J. Lopez-Miranda, *Clin. Nutr.* **2019**, 38, 529.
- [29] P. D. Cani, J. Amar, M. A. Iglesias, M. Poggi, C. Knauf, D. Bastelica, A. M. Neyrinck, F. Fava, K. M. Tuohy, C. Chabo, A. Waget, E. Delmée, B. Cousin, T. Sulpice, B. Chamontin, J. Ferrières, J.-F. Tanti, G. R. Gibson, L. Casteilla, N. M. Delzenne, M. C. Alessi, R. Burcelin, *Diabetes* **2007**, 56, 1761.
- [30] T. Kim, C. L. Holleman, T. Ptacek, C. D. Morrow, K. M. Habegger, *Int. J. Obes.* **2017**, 41, 381.
- [31] L. A. David, C. F. Maurice, R. N. Carmody, D. B. Gootenberg, J. E. Button, B. E. Wolfe, A. V. Ling, A. S. Devlin, Y. Varma, M. A. Fischbach, S. B. Biddinger, R. J. Dutton, P. J. Turnbaugh, *Nature* **2014**, 505, 559.
- [32] G. D. Wu, J. Chen, C. Hoffmann, K. Bittinger, Y. Y. Chen, S. A. Keilbaugh, M. Bewtra, D. Knights, W. A. Walters, R. Knight, R. Sinha, E. Gilroy, K. Gupta, R. Baldassano, L. Nessel, H. Li, F. D. Bushman, J. D. Lewis, *Science* **2011**, 334, 105.

- [33] F. De Filippis, N. Pellegrini, L. Laghi, M. Gobetti, D. Ercolini, *Microbiome* **2016**, *4*, 57.
- [34] L. Tasse, J. Bercovici, S. Pizzut-Serin, P. Robe, J. Tap, C. Klopp, B. L. Cantarel, P. M. Coutinho, B. Henrissat, M. Leclerc, J. Dore, P. Monsan, M. Remaud-Simeon, G. Potocki-Veronese, *Genome Res.* **2010**, *20*, 1605.
- [35] R. A. DeFronzo, *Diabetologia* **2010**, *53*, 1270.
- [36] J. Delgado-Lista, P. Perez-Martinez, A. Garcia-Rios, J. F. Alcala-Diaz, A. I. Perez-Caballero, F. Gomez-Delgado, F. Fuentes, G. Quintana-Navarro, F. Lopez-Segura, A. M. Ortiz-Morales, N. Delgado-Casado, E. M. Yubero-Serrano, A. Camargo, C. Marin, F. Rodriguez-Cantalejo, P. Gomez-Luna, J. M. Ordovas, J. Lopez-Miranda, F. Perez-Jimenez, *Am. Heart J.* **2016**, *177*, 42.
- [37] American Diabetes Association, *Diabetes Care* **2011**, *34*, S62.
- [38] J. D. Fernández-Ballart, J. L. Piñol, I. Zazpe, D. Corella, P. Carrasco, E. Toledo, M. Perez-Bauer, M. Á. Martínez-González, J. Salas-Salvadó, J. M. Martín-Moreno, *Br. J. Nutr.* **2010**, *103*, 1808.
- [39] M. A. Martinez-Gonzalez, E. Fernandez-Jarne, M. Serrano-Martinez, M. Wright, E. Gomez-Gracia, *Eur. J. Clin. Nutr.* **2004**, *58*, 1550.
- [40] R. Blanco-Rojo, J. F. Alcala-Diaz, S. Wopereis, P. Perez-Martinez, G. M. Quintana-Navarro, C. Marin, J. M. Ordovas, B. van Ommen, F. Perez-Jimenez, J. Delgado-Lista, J. Lopez-Miranda, *Diabetologia* **2016**, *59*, 67.
- [41] A. Klindworth, E. Pruesse, T. Schweer, J. Peplies, C. Quast, M. Horn, F. O. Glockner, *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, e1.
- [42] E. Bolyen, J. R. Rideout, M. R. Dillon, N. A. Bokulich, C. C. Abnet, G. A. Al-Ghalith, H. Alexander, E. J. Alm, M. Arumugam, F. Asnicar, Y. Bai, J. E. Bisanz, K. Bittinger, A. Brejnrod, C. J. Brislawn, C. T. Brown, B. J. Callahan, A. M. Carballo-Rodriguez, J. Chase, E. K. Cope, R. Da Silva, C. Diener, P. C. Dorrestein, G. M. Douglas, D. M. Durall, C. Duvallet, C. F. Edwardson, M. Ernst, M. Estaki, J. Fouquier, et al., *Nat. Biotechnol.* **2019**, *37*, 852.
- [43] B. J. Callahan, P. J. McMurdie, M. J. Rosen, A. W. Han, A. J. Johnson, S. P. Holmes, *Nat. Methods* **2016**, *13*, 581.
- [44] C. Lozupone, R. Knight, *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 8228.
- [45] N. A. Bokulich, B. D. Kaehler, J. R. Rideout, M. Dillon, E. Bolyen, R. Knight, G. A. Huttley, J. Gregory Caporaso, *Microbiome* **2018**, *6*, 90.
- [46] D. McDonald, M. N. Price, J. Goodrich, E. P. Nawrocki, T. Z. DeSantis, A. Probst, G. L. Andersen, R. Knight, P. Hugenholtz, *ISME J.* **2012**, *6*, 610.
- [47] N. Segata, J. Izard, L. Waldron, D. Gevers, L. Miropolsky, W. S. Garrett, C. Huttenhower, *Genome Biol.* **2011**, *12*, R60.
- [48] N. J. Stone, J. G. Robinson, A. H. Lichtenstein, C. N. Bairey Merz, C. B. Blum, R. H. Eckel, A. C. Goldberg, D. Gordon, D. Levy, D. M. Lloyd-Jones, P. McBride, J. S. Schwartz, S. T. Shero, S. C. Smith, K. Watson, P. W. F. Wilson, *J. Am. Coll. Cardiol.* **2014**, *63*, 2889.

***XIII. MATERIAL
SUPLEMENTARIO***

XIII. MATERIAL SUPLEMENTARIO

1. Material suplementario de la publicación n°1: “A microbiota-based predictive model for type 2 diabetes remission induced by dietary intervention: from the CORDIOPREV study”

Tabla S1. Cambio en las características antropométricas entre el basal y después de 5 años de intervención dietética en los grupos Respondedores y No respondedores.

	Respondedores (n=73)	No respondedores (n=107)	Valor de <i>p</i>
IMC(Kg/m ²)	-0,68 ± 0,20	-0,35 ± 0,21	0,286
Perímetro de cintura (cm)	0,20 ± 0,70	0,29 ± 0,78	0,935
Peso (kg)	-1,74 ± 0,55	-0,98 ± 0,59	0,370

Nuestro estudio se llevó a cabo en 183 pacientes con DMT2 de reciente diagnóstico, de los cuales 110 tenían muestras de heces disponibles y no habían recibido tratamiento antibiótico en los tres meses anteriores a la recogida de las muestras. Los datos son la media±SEM. Valores p del análisis ANOVA de un factor. Diferencias significativas (p< 0,05). *= El cambio delta se calculó con los datos de los pacientes que habían continuado en el estudio a los cinco años de seguimiento (7 pacientes murieron antes del primer año del estudio y 3 murieron entre el segundo año de la intervención).

Tabla S2. Asociación de la remisión de la DMT2 con el tipo de dieta consumida.

	No respondedores	Respondedores	Valor de <i>p</i>
Dieta LF[†]	63 (61,2)	40 (38,8)	0,741
Dieta Med[‡]	47 (58,8)	33 (41,2)	

Nuestro estudio se llevó a cabo en 183 pacientes con DMT2 de reciente diagnóstico, de los cuales 110 tenían muestras de heces disponibles y no habían recibido tratamiento antibiótico en los tres meses anteriores a la recogida de las muestras. Número de pacientes (porcentaje de pacientes en función del grupo de dieta). Valor *p* de la prueba de Chi-cuadrado. Diferencias significativas ($p < 0,05$). [†]Dieta LF: Dieta baja en grasas; [‡]Dieta mediterránea: Dieta Mediterránea.

Tabla S3. Análisis de α -diversidad.

Diversidad	Respondedores	No respondedores	Valor de p
Chao1	199,6 \pm 5,8	196,7 \pm 3,8	0,665
Simpson	0,933 \pm 0,002	0,935 \pm 0,001	0,380
Shannon	3,16 \pm 0,03	3,18 \pm 0,02	0,652

Los datos se presentan como media \pm SEM. Grupo Respondedores: pacientes que revirtieron de DMT2 tras 5 años de seguimiento de la intervención dietética. Grupo No respondedores: pacientes que permanecieron con DMT2 después de 5 años de seguimiento. Diferencias significativas ($p < 0,05$) mediante la prueba U de Mann-Whitney.

Tabla S4. Características basales de los grupos en función de los terciles de la puntuación en la escala de clasificación numérica de predicción de respuesta basada en la microbiota intestinal.

	Puntuación de respuesta alta (n=37)	Puntuación de respuesta intermedia (n=37)	Puntuación de respuesta baja (n=36)	Valor de p
Hombre/Mujer	35/2	28/9	29/7	0,074
Edad (años)	55,9±1,4	60,6±1,7	59,6±1,5	0,081
Peso (kg)	86,8±2,2	83,4±2,6	81,9±2,2	0,339
IMC (kg/m ²)	31,7±0,6	30,5±0,8	30,0±0,7	0,201
Perímetro de cintura (cm)	106±2	105±2	102±1	0,291
Triglicéridos (mmol/L)	1,66±0,13	1,73±0,16	1,60±0,11	0,781
Colesterol (mmol/L)	4,18±0,10	4,25±0,11	4,38±0,19	0,571
HDL (mmol/L)	1,03±0,03	1,06±0,04	1,13±0,06	0,319
LDL (mmol/L)	2,36±0,10	2,39±0,09	2,26±0,15	0,704
Proteína C-reactiva (nmol/L)	30,5±5	37,9±7	34,9±8	0,726
HbA1c (mmol/mol)	49,1±1,2	50,4±1,5	49,5±2,2	0,854
HbA1c (%)	6,64±0,11	6,76±0,13	6,68±0,20	0,854
Glucosa (mmol/L)	6,06±0,17	5,92±0,21	6,38±0,30	0,358
Insulina (nmol/L)	102±20	75,5±8,7	71,1±7,9	0,226
HOMA-IR	5,05±0,75	3,83±0,31	4,42±0,80	0,416
Índice de sensibilidad a la insulina	2,55±0,27	2,65±0,19	2,87±0,28	0,664
Índice insulinogénico	1,02±0,38	1,01±0,31	0,47±0,09	0,314
Índice de resistencia hepática a la insulina	2077±300	1569±123	1790±323	0,392
Índice de resistencia a la insulina muscular(x10 ²)	2,03±0,40	2,31±0,44	1,77±0,41	0,660
“Disposition Index”	0,57±0,06 ^{a,b}	0,61±0,05 ^a	0,43±0,04 ^b	0,040

Nuestro estudio se llevó a cabo en 183 pacientes con DMT2 de reciente diagnóstico, de los cuales 110 tenían muestras de heces disponibles y no habían recibido tratamiento antibiótico en los tres meses anteriores a la recogida de las muestras. Los datos son la media±SEM. Se determinaron los grupos clasificando a los pacientes según los terciles ascendentes del valor de la puntuación en la escala de clasificación numérica de predicción de respuesta basada en la microbiota intestinal: T1, puntuación de predicción de respuesta baja; T2, puntuación de predicción de respuesta intermedia; T3, puntuación de predicción de respuesta alta. Las diferencias en las variables se calcularon mediante ANOVA de un factor. Valor p del género: Análisis de Chi-cuadrado. Letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05) entre grupos en la prueba de comparación múltiple post hoc de Bonferroni.

Tabla S5. Análisis de los niveles de proteína C-reactiva en función de los grupos Respondedores y No respondedores y los cambios entre basal y después de 5 años de intervención dietética.

	Respondedores (n=73)	No respondedores (n=110)	<i>Valor p*</i> <i>de</i> <i>grupo</i>	Respondedores[†] (n=44)	No respondedores[†] (n=66)	<i>Valor p*</i> <i>de</i> <i>grupo</i>
Proteína C-reactiva (nmol/L)						
<i>Basal</i>	37,1±5,3	33,5±3,6	0,558	37,8±6,8	32,2±4,5	0,480
<i>5 años</i>	32,0±7,3	46,4±9,6	0,268	31,7±11,7	35,3±5,8	0,763
Valor p[#] de tiempo	0,200	0,151	----	0,351	0,152	----
<i>“Delta-change”</i>	-8,9±6,8	13,9±9,6	0,077	-9,6±10,1	7,3±5,0	0,105

Nuestro estudio se llevó a cabo en 183 pacientes con DMT2 de reciente diagnóstico, de los cuales 110 tenían muestras de heces disponibles y no habían recibido tratamiento antibiótico en los tres meses anteriores a la recogida de las muestras. Los datos son la media±SEM. Respondedores: pacientes que revirtieron la DMT2 tras 5 años de seguimiento de la intervención dietética. Respondedores[†]: pacientes que revirtieron de la DMT2 tras 5 años de seguimiento de la intervención dietética con disponibilidad de muestra fecal. No respondedores[†]: pacientes que permanecieron con DMT2 después de 5 años de seguimiento. No respondedores[†]: pacientes que permanecieron con DMT2 después de 5 años de seguimiento con disponibilidad de muestra fecal. *Diferencia significativa ($p < 0,05$) entre el grupo Respondedores y No Respondedores, analizada mediante ANOVA de un factor. [#]Diferencia significativa ($p < 0,05$) entre basal y después de 5 años de seguimiento en cada grupo, analizada mediante una prueba t para muestras pareadas.

Tabla S6. Análisis del consumo de antibióticos durante el seguimiento de la intervención dietética en función de los grupos Respondedores y No respondedores.

	Respondedores (n=73)	No respondedores (n=110)	<i>Valor de p</i>	Respondedores† (n=44)	No respondedores† (n=66)	<i>Valor de p</i>
<i>Consumo de antibióticos durante el periodo de seguimiento (%)</i>	79,5	80,9	0,808	72,7	78,8	0,464
<i>Nº de veces</i>	6,29±0,68	6,09±0,73	0,848	5,72±0,84	6,23±1,02	0,726

Nuestro estudio se llevó a cabo en 183 pacientes con DMT2 de reciente diagnóstico, de los cuales 110 tenían muestras de heces disponibles y no habían recibido tratamiento antibiótico en los tres meses anteriores a la recogida de las muestras. Respondedores: pacientes que revirtieron la DMT2 tras 5 años de seguimiento de la intervención dietética. Respondedores†: pacientes que revirtieron de la DMT2 tras 5 años de seguimiento de la intervención dietética con disponibilidad de muestra fecal. No respondedores†: pacientes que permanecieron con DMT2 después de 5 años de seguimiento. No respondedores†: pacientes que permanecieron con DMT2 después de 5 años de seguimiento con disponibilidad de muestra fecal. El porcentaje de pacientes tratados con antibióticos durante el seguimiento se analizó mediante Chi-cuadrado. El número de veces que los pacientes fueron tratados con antibióticos durante el seguimiento se analizó mediante ANOVA de un factor (los datos son media±SEM). Diferencia significativa ($p < 0,05$).

Tabla S7. Adherencia a las dietas en función de los participantes Respondedores y No respondedores antes y después de la intervención dietética.

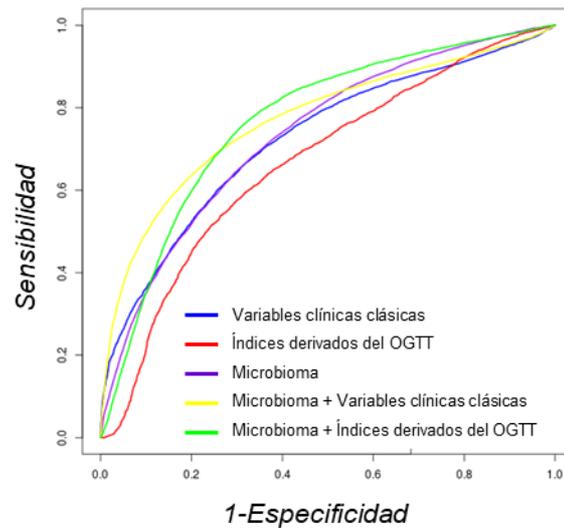
<i>Basal</i>	Respondedores	No respondedores	<i>Valor de p</i>	Respondedores†	No respondedores†	<i>Valor de p</i>
<i>Puntuación de adherencia LF</i>	3,88±0,2	3,78±0,1	0,653	3,68±0,2	3,74±0,2	0,822
<i>Puntuación de adherencia Med</i>	9,01±0,2	8,62±0,2	0,136	8,70±0,3	8,55±0,2	0,650
<i>5-años*</i>	Respondedores	No respondedores	<i>Valor de p</i>	Respondedores†	No respondedores†	<i>Valor de p</i>
<i>Puntuación de adherencia LF</i>	7,39±0,3 ^a	7,24±0,2 ^b	0,646	6,86±0,4 ^a	7,42±0,3 ^b	0,209
<i>Puntuación de adherencia Med</i>	11,53±0,3 ^a	11,33±0,2 ^b	0,583	9,47±0,4	9,32±0,3 ^b	0,763

Nuestro estudio se llevó a cabo en 183 pacientes con DMT2 de reciente diagnóstico, de los cuales 110 tenían muestras de heces disponibles y no habían recibido tratamiento antibiótico en los tres meses anteriores a la recogida de las muestras. Los datos son la media±SEM. Respondedores: pacientes que revirtieron la DMT2 tras 5 años de seguimiento de la intervención dietética. Respondedores†: pacientes que revirtieron de la DMT2 tras 5 años de seguimiento de la intervención dietética con disponibilidad de muestra fecal. No respondedores†: pacientes que permanecieron con DMT2 después de 5 años de seguimiento. No respondedores‡: pacientes que permanecieron con DMT2 después de 5 años de seguimiento con disponibilidad de muestra fecal. Valores p del análisis ANOVA de un factor (p<0,05). ANOVA para medidas repetidas: ^a p<0,05 entre el basal y los cinco años en Respondedores; ^b p<0,05 entre el basal y los cinco años en los No respondedores. *Los datos del año 5 corresponden a los pacientes aleatorizados a cada dieta.

Tabla S8. Tratamiento médico durante la intervención dietética en función de los grupos Respondedores y No respondedores.

Tratamiento durante el seguimiento (%)	Respondedores	No Respondedores	Valor de p	Respondedores†	No Respondedores†	Valor de p
Antiagregantes	94,6	94,0	0,882	92,1	96,2	0,395
Alfabloqueantes	8,9	11,9	0,577	7,9	11,3	0,589
Betabloqueantes	76,8	81,0	0,551	73,7	83,0	0,280
Inhibidores de ACE	45,2	34,5	0,147	57,9	45,3	0,235
Bloqueantes del receptor de Angiotensina-II (ARBs)	26,8	44,0	0,038	28,9	41,5	0,219
Antagonistas de Ca	26,8	22,6	0,577	25,0	19,7	0,509
Estatinas	94,6	97,6	0,353	92,1	96,2	0,395
Inhibidores de la bomba de protones	76,8	82,1	0,438	78,9	88,7	0,204
Opioides	16,1	19,0	0,652	21,1	18,9	0,796
Antidepresivos ISRS	8,9	10,7	0,730	7,9	7,5	0,951
Antidepresivos tricíclicos	0,0	1,2	0,413	0,0	1,9	0,395
Vitamina D (colecalfiferol)	1,8	3,6	0,534	2,6	1,9	0,811
Laxantes	5,4	0,0	0,032	5,3	0,0	0,091
Metformina	0,0	57,1	<0,001	0,0	60,4	<0,001
Otros fármacos antidiabéticos	0,0	11,9	0,007	0,0	15,1	0,012

Nuestro estudio se llevó a cabo en 183 pacientes con DMT2 de reciente diagnóstico, de los cuales 110 tenían muestras de heces disponibles y no habían recibido tratamiento antibiótico en los tres meses anteriores a la recogida de las muestras. Respondedores: pacientes que revirtieron la DMT2 tras 5 años de seguimiento de la intervención dietética. Respondedores†: pacientes que revirtieron de la DMT2 tras 5 años de seguimiento de la intervención dietética con disponibilidad de muestra fecal. No respondedores†: pacientes que permanecieron con DMT2 después de 5 años de seguimiento. No respondedores†: pacientes que permanecieron con DMT2 después de 5 años de seguimiento con disponibilidad de muestra fecal. ACE: Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (“Angiotensin converting enzyme”). ISRI: inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina. Los valores de p se calcularon mediante análisis de Chi-cuadrado.



	AUC	Sensibilidad	Especificidad	Exactitud	Coefficiente Kappa
	Media ± SD				
Variables clínicas clásicas	0,753±0,150	0,74±0,17	0,66±0,23	0,71±0,13	0,40±0,27
Índices derivados del OGTT	0,682±0,156	0,65±0,19	0,64±0,20	0,65±0,12	0,29±0,23
Microbioma	0,762±0,148	0,72±0,17	0,64±0,21	0,69±0,14	0,36±0,28
Microbioma + Variables clínicas clásicas	0,798±0,147	0,78±0,17	0,68±0,21	0,74±0,13	0,46±0,28
Microbioma + Índices derivados del OGTT	0,795±0,148	0,77±0,16	0,68±0,22	0,73±0,14	0,44±0,28

Figura S1. Modelos predictivos “random forest” para la remisión de DMT2 mediante intervención dietética añadiendo la variable tabaquismo. Los datos se expresan como media±SD, las curvas ROC obtenidas son promedio de los modelos predictivos utilizando el método de validación cruzada 10-fold. Variables clásicas (variables clínicas conocidas como factores de riesgo para el desarrollo de la DMT2: género, edad, IMC, perímetro de cintura, HDL, triglicéridos, HbA1c, actividad física, consumo de frutas y verduras en la dieta, uso de medicación antihipertensiva, tabaquismo y antecedentes familiares de diabetes); índices derivados de la prueba OGTT: evaluación del modelo homeostático de resistencia a la insulina, disposition index, índice de resistencia hepática a la insulina, índice de sensibilidad a la insulina, índice de sensibilidad a la insulina muscular e índice insulinogénico, Los modelos se ajustaron por dieta e intensidad del tratamiento con estatinas incluyendo estas variables en todos los modelos, AUC, área bajo la curva ROC.

2. Material suplementario de la publicación nº2: “An altered microbiota pattern precedes Type 2 diabetes mellitus development: from the CORDIOPREV study”

Tabla S1. Características basales de la población de estudio de incidencia de DMT2.

	Incident-DIAB n=107	Non-DIAB n=355	<i>Valor de p</i>
Género			0,350
Hombre	87 (81%)	302 (85%)	
Mujer	20 (19%)	53 (15%)	
Edad (años)	58,7 (9,0)	57,3(9,5)	0,171
Peso (kg)	85,7 (15,2)	82,5 (13,5)	0,037
IMC (kg/m ²)	31,4 (4,8)	29,9 (4,2)	0,002
Perímetro de cintura (cm)	105,3 (11,2)	101,7 (10,8)	0,003
Triglicéridos (mmol/L)	1,5 (0,8)	1,3 (0,7)	0,059
Colesterol (mmol/L)	4,3 (0,9)	4,2 (0,8)	0,217
HDL (mmol/L)	1,1 (0,3)	1,2 (0,3)	0,355
LDL (mmol/L)	2,4 (0,7)	2,4 (0,6)	0,421
Proteína C-reactiva (nmol/L)	27,4 (28,1)	23,9 (32,7)	0,329
HbA1c (mmol/mol)	42,4 (0,4)	40,5 (0,2)	<0,001
HbA1c (%)	6,0 (0,3)	5,9 (0,3)	<0,001
Glucosa (mmol/L)	5,3 (0,6)	5,1 (0,6)	0,002
Insulina (nmol/L)	73,0 (47,1)	57,9 (39,8)	0,001
HOMA-IR	3,4 (3,1)	2,6 (1,7)	0,001
Índice de sensibilidad a la insulina	3,3 (1,9)	4,3 (2,6)	0,001
Índice insulinogénico	0,64 (3,00)	1,08 (1,11)	0,025
Índice de resistencia hepática a la insulina	1,370 (1251)	1,052 (692)	0,001
Índice de resistencia a la insulina muscular (x10 ²)	1,90 (1,74)	2,10 (0,02)	0,388
“Disposition Index”	0,83 (0,48)	1,03 (0,62)	0,003

Datos expresados como promedio (SD) o n (%). Incident-DIAB: pacientes que desarrollaron DMT2, pero eran no diabéticos en el basal. Non-DIAB: pacientes no diabéticos. $p < 0,05$. Variables calculadas mediante ANOVA de un factor. Valor de p de género: análisis Chi cuadrado.

Tabla S2. Características basales de la población de estudio de incidencia de DMT2 comparada con la población incluida en el modelo basado en la microbiota intestinal.

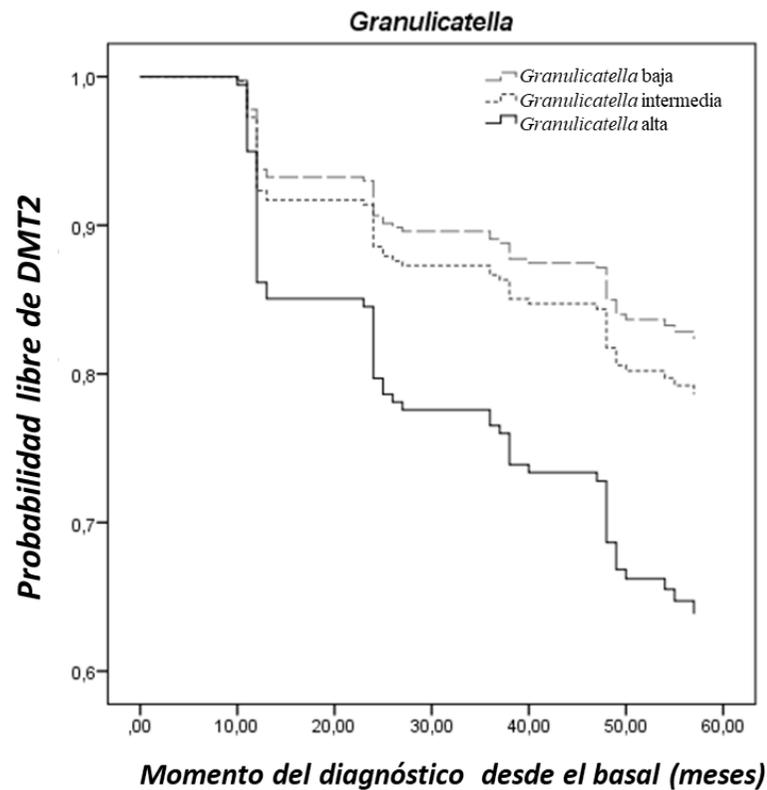
	Incident-DIAB (n=107)	Incident-DIAB* (n=64)	Valor de p	Non-DIAB (n=355)	Non-DIAB* (n=209)	Valor de p
Género			0,805			0,903
Hombre	87 (81%)	53 (83%)		302 (85%)	177 (85%)	
Mujer	20 (19%)	11 (17%)		53 (15%)	32 (15%)	
Edad (años)	58,7 (9,0)	59,5 (9,1)	0,585	57,3(9,5)	57,7 (10,0)	0,668
Peso (kg)	85,7 (15,2)	86,4 (15,5)	0,773	82,5 (13,5)	82,2 (13,4)	0,822
BMI (kg/m ²)	31,4 (4,8)	31,9 (4,4)	0,507	29,9 (4,2)	29,7 (3,9)	0,713
Perímetro de cintura (cm)	105,3 (11,2)	106,3 (11,5)	0,584	101,7 (10,8)	101,3 (10,9)	0,671
Triglicéridos (mmol/L)	1,5 (0,8)	1,6(0,8)	0,584	1,3 (0,7)	1,3 (0,7)	0,936
Colesterol (mmol/L)	4,3 (0,9)	4,4 (1,0)	0,392	4,2 (0,8)	4,2 (0,8)	0,823
HDL (mmol/L)	1,1 (0,3)	1,2 (0,3)	0,507	1,2 (0,3)	1,2 (0,3)	0,836
LDL (mmol/L)	2,4 (0,7)	2,5 (0,8)	0,599	2,4 (0,6)	2,4 (0,6)	0,688
Proteína C-reactiva (nmol/L)	27,4 (28,1)	26,8 (24,0)	0,889	23,9 (32,7)	26 (38,3)	0,499
HbA1c (mmol/mol)	42,4 (0,4)	42,6 (0,5)	0,765	40,5 (0,2)	40,7 (0,3)	0,599
HbA1c (%)	6,0 (0,3)	6,0 (0,4)	0,765	5,9 (0,3)	5,9 (0,3)	0,599
Glucosa (mmol/L)	5,3 (0,6)	5,3 (0,6)	0,438	5,1 (0,6)	5,1 (0,6)	0,620
Insulina (nmol/L)	73,0 (47,1)	67,4 (45,8)	0,451	57,9 (39,8)	58,4 (41,6)	0,907
HOMA-IR	3,4 (3,1)	3,3 (2,7)	0,899	2,6 (1,7)	2,6 (1,8)	0,855
Índice de sensibilidad a la insulina	3,3 (1,9)	3,4 (2,0)	0,996	4,3 (2,6)	4,2 (2,5)	0,704
índice insulínogénico	0,64 (3,00)	0,59 (3,89)	0,936	1,08 (1,11)	1,09 (1,10)	0,915
Índice de resistencia hepática a la insulina	1,370 (1251)	1,334 (1082)	0,849	1,052 (692)	1,060 (717)	0,900
Índice de resistencia a la insulina muscular (x10 ²)	1,90 (1,74)	1,91 (1,85)	0,980	2,10 (2,2)	2,1 (2,3)	0,920
“Disposition Index”	0,83 (0,48)	0,83 (0,52)	0,971	1,03 (0,62)	0,97 (0,52)	0,283

Datos expresados como promedio (SD) o n (%). Incident-DIAB: pacientes que desarrollaron DMT2, pero eran no diabéticos en el basal. Incident-DIAB*: Aquellos pacientes de Incident-DIAB cuya muestra fecal estaba disponible para nosotros. Non-DIAB: pacientes no diabéticos. Non-DIAB*: Aquellos pacientes de Non-DIAB cuya muestra fecal estaba disponible para nosotros. Las diferencias entre los grupos fueron evaluadas mediante ANOVA de un factor. p < 0,05 Valor de p de género: análisis Chi cuadrado.

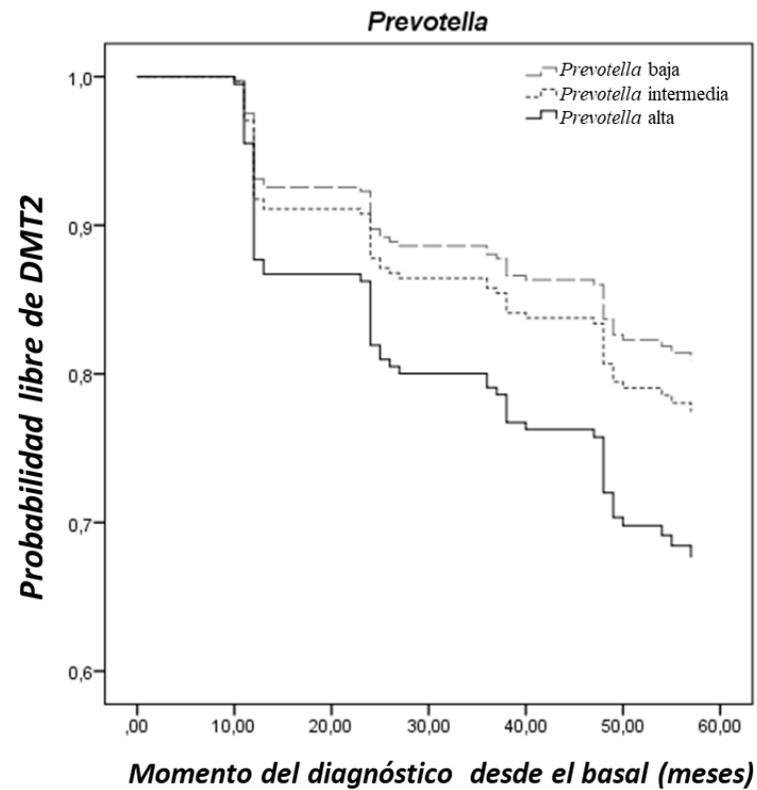
Tabla S3. Análisis ROC de los modelos de clasificación “random forest” ejecutados en el conjunto de datos de prueba sin eliminar pacientes por el criterio de exclusión para el tratamiento con antibióticos.

	AUC	IC 95%	Sensibilidad	Especificidad	Exactitud	Coefficiente Kappa
Variables clínicas clásicas	0,708	0,580-0,837	0,83	0,50	0,755	0,328
Índices derivados del OGTT	0,664	0,544-0,785	0,80	0,32	0,681	0,117
Microbioma	0,989	0,974-1,000	0,99	0,91	0,968	0,910
Microbioma + Variables clínicas clásicas	0,915	0,833-0,997	0,93	0,73	0,883	0,668
Microbioma + Índices derivados del OGTT	0,969	0,935-1,000	0,93	0,91	0,923	0,799

AUC: área bajo la curva en el análisis ROC; IC: intervalo de confianza. Variables clínicas clásicas (variables incluidas en las puntuaciones FINDRISC y ADA: IMC, perímetro de la cintura, consumo dietético de frutas y verduras, edad, uso de medicación antihipertensiva, antecedentes familiares de diabetes, antecedentes de hiperglucemia, actividad física además de diabetes gestacional, HDL, triglicéridos y HbA1c); índices derivados del OGTT (HOMA-IR, índice de sensibilidad a la insulina; ISI, índice insulínogénico; IGI, índice de resistencia a la insulina hepática; HIRI, índice de sensibilidad a la insulina muscular; MISI y “disposition index”; DI). Los modelos se ajustaron en función de la dieta y la intensidad del tratamiento con estatinas.



		HR	IC 95%	
			Inferior	Superior
Abundancia relativa de <i>Granulicatella</i> T1-T2	No ajustado	1,237	0,625	2,450
	Ajustado*	1,066	0,527	2,156
Abundancia relativa de <i>Granulicatella</i> T1-T3	No ajustado	2,310	1,278	4,175
	Ajustado*	1,963	1,073	3,593



		HR	IC 95%	
			Inferior	Superior
Abundancia relativa de <i>Prevotella</i> T1-T2	No ajustado	1,205	0,620	2,344
	Ajustado*	1,315	0,663	2,607
Abundancia relativa de <i>Prevotella</i> T1-T3	No ajustado	1,844	1,001	3,395
	Ajustado*	2,147	1,134	4,064

Figura S1. Probabilidad libre de DMT2 mediante análisis de regresión de Cox en función de la abundancia individual de los taxones bacterianos. Los datos representan la abundancia individual basal de los taxones bacterianos por tertiles ascendentes: T1, baja abundancia; T2, abundancia intermedia; T3, alta abundancia. *Este modelo se ajustó por edad, género, dieta, IMC, HDL, triglicéridos e intensidad del tratamiento con estatinas.

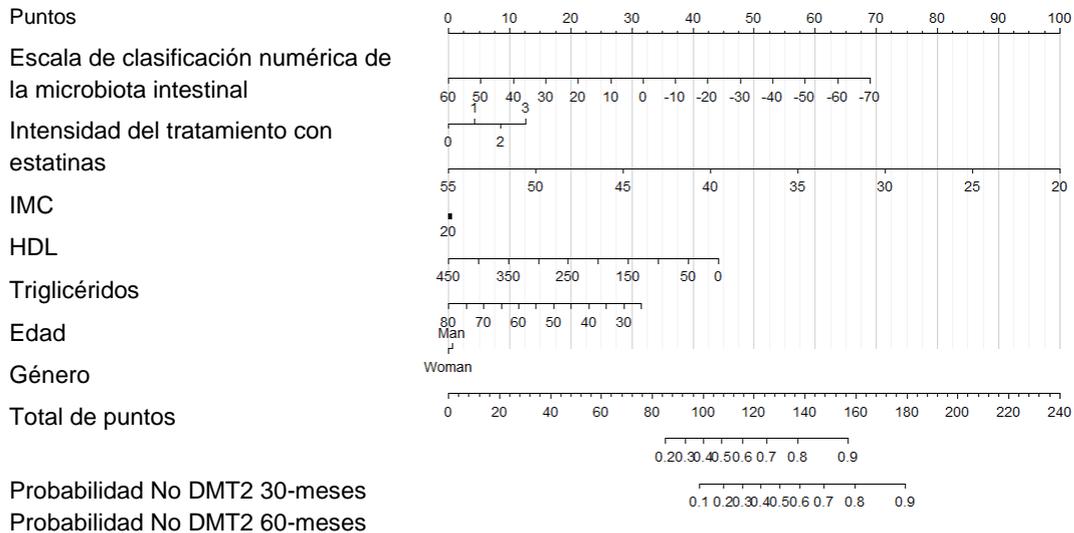


Figura S2. Nomograma basado en la puntuación en la escala de clasificación numérica de la microbiota intestinal y las variables clínicas para predecir el riesgo de desarrollo de DMT2 a los 30 y 60 meses. Los puntos de cada variable dado un valor determinado pueden encontrarse en la escala de puntos situada en la parte superior del nomograma. A continuación, se suman los puntos de cada variable (puntos totales), para estimar el riesgo de desarrollo de DMT2 a los 30 y 60 meses. IMC, índice de masa corporal, HDL, lipoproteínas de alta densidad. Los valores de HDL y triglicéridos se expresan en unidades de mg/dl.

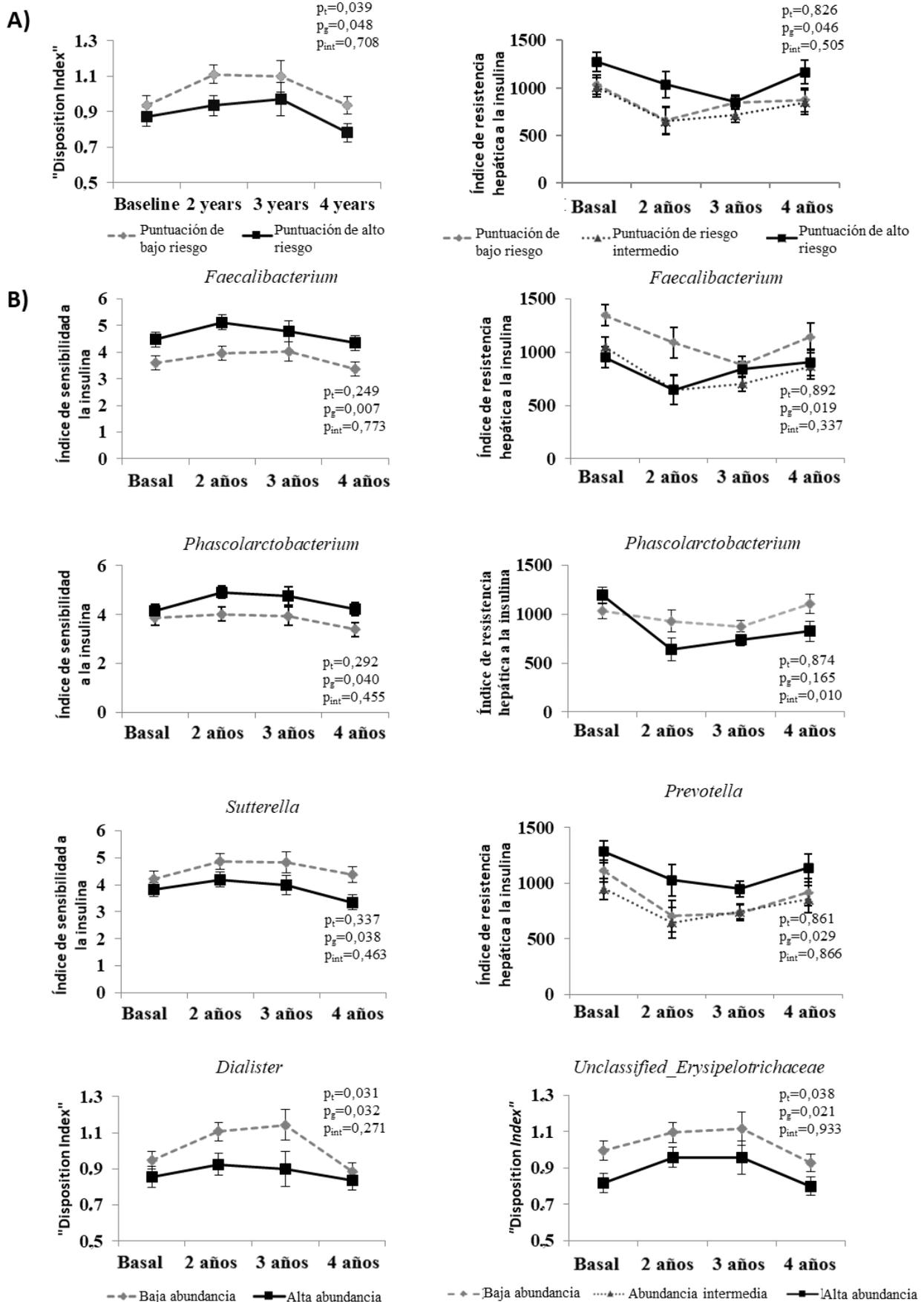
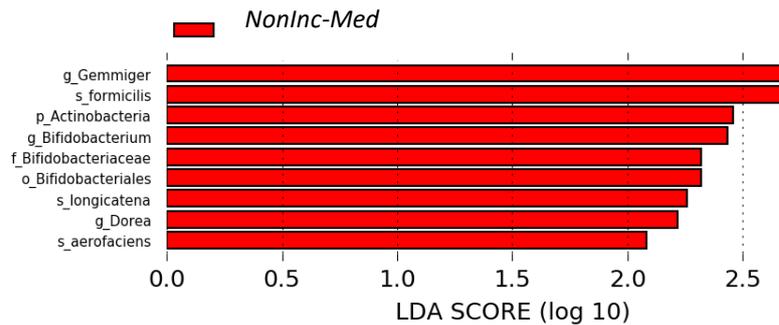


Figura S3. Relación entre la puntuación de riesgo basada en la microbiota intestinal y la abundancia basal de taxones bacterianos con los índices derivados del OGTT. Los pacientes se clasificaron en función de la mediana o los terciles de acuerdo con la abundancia basal de cada taxón bacteriano. ANOVA para medidas repetidas ajustado por edad, género, dieta, IMC, HDL y triglicéridos, valores p globales: p_t : efecto del tiempo; p_g : efecto del grupo; p_{int} : interacción tiempo-grupo. (A) Relación entre la puntuación de riesgo basada en la microbiota intestinal y los valores de los índices derivados del OGTT durante el estudio. La puntuación de riesgo basada en la microbiota intestinal se construyó utilizando los diez taxones bacterianos más discriminantes. (B) Relación entre la abundancia basal de los taxones bacterianos y los valores de los índices derivados del OGTT durante el estudio.

3. Material suplementario de la publicación n°3: “A Diet-Dependent Microbiota Profile Associated with Incident Type 2 Diabetes: From the CORDIOPREV Study”

NonInc-LF vs NonInc-Med



Pacientes-LF vs Pacientes-Med

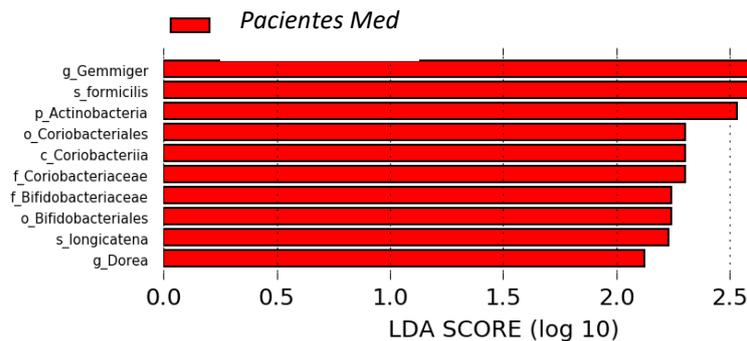


Figura S1. Diferencias en la microbiota intestinal basal entre los pacientes asignados a cada dieta. NonInc-LF: pacientes que consumieron la dieta baja en grasas y no desarrollaron DMT2 durante el periodo de seguimiento. NonInc-Med: pacientes que consumieron la dieta Mediterránea y no desarrollaron DMT2 durante el periodo de seguimiento. Pacientes-LF: todos los pacientes que consumieron la dieta baja en grasas. Pacientes-Med: todos los pacientes que consumieron la dieta Mediterránea. Los colores representan el grupo en el que el taxón indicado es más abundante en comparación con el otro grupo.

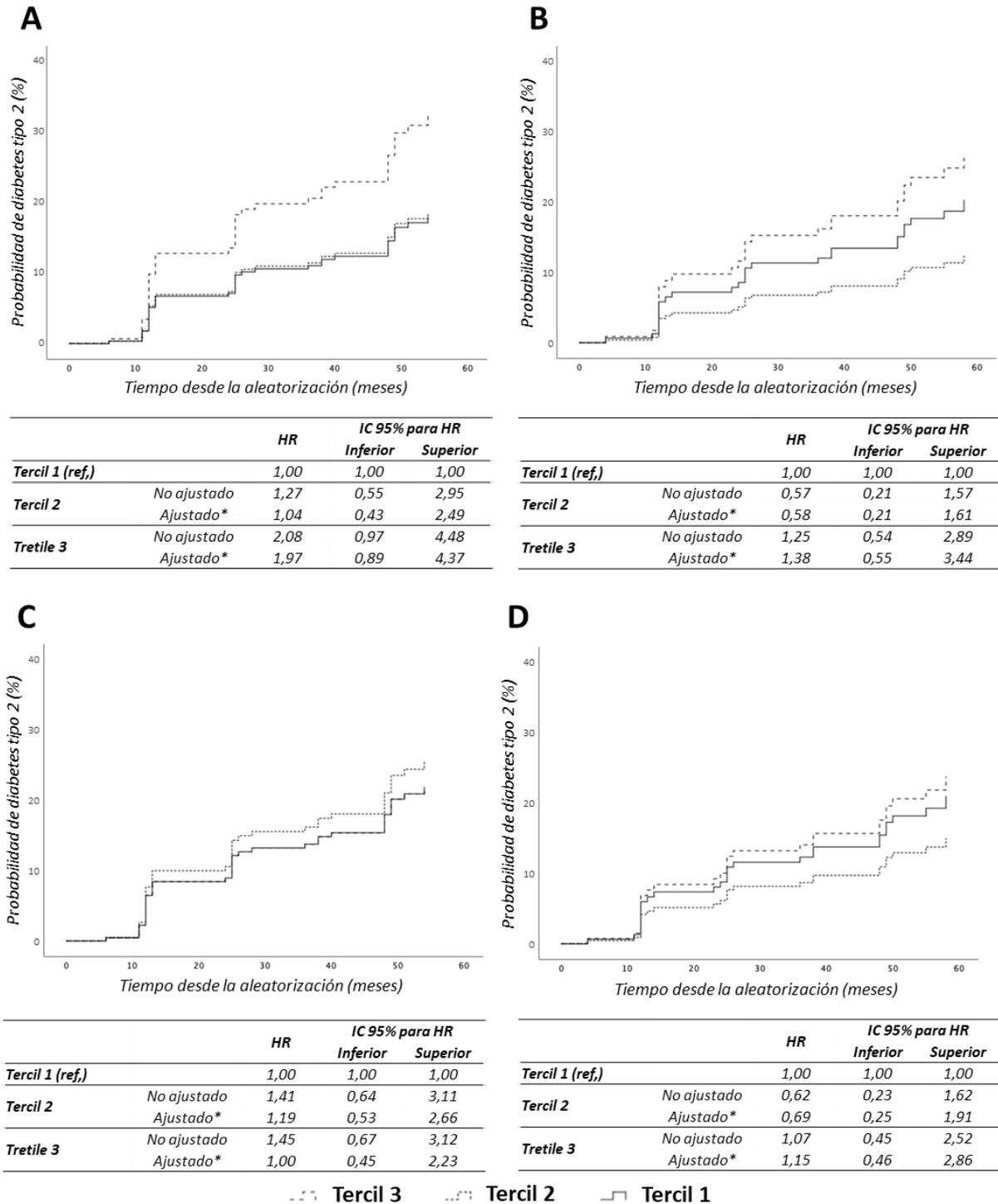


Figura S2. Falta de asociación entre la probabilidad de desarrollo de DMT2 y las puntuaciones de riesgo específicas de la dieta LF en los pacientes que consumieron la dieta Med, y las puntuaciones de riesgo específicas de la dieta Med en los pacientes que consumieron una dieta LF. La probabilidad de desarrollo de DMT2 se evaluó mediante análisis de regresión de Cox. Las puntuaciones RSF-LF y Lasso-LF se probaron en los pacientes que consumieron una dieta Med (panel A y C respectivamente). Las puntuaciones RSF-Med y Lasso-Med se probaron en los pacientes que consumieron una dieta LF (panel B y D, respectivamente). Los datos representan los valores de la puntuación de riesgo por tertiles ascendentes: Tercil 1, puntuación de bajo riesgo (línea continua); Tercil 2, puntuación de riesgo intermedio (línea de puntos); Tercil 3, puntuación de alto riesgo (línea discontinua). Este modelo se ajustó por edad, género, IMC, HDL, triglicéridos e intensidad del tratamiento con estatinas.

Tabla S1. Características basales de los 462 pacientes no diabéticos al inicio del estudio CORDIOPREV en función de la intervención dietética (dietas LF o Med).

	<i>Dieta LF</i>	<i>Dieta Med</i>	<i>Valor de p</i>
<i>N</i>	216	246	n/a
<i>Género (Hombre/Mujer)</i>	(183/33)	(206/40)	0,773
<i>Edad (años)</i>	57,5±0,6	57,8±0,6	0,673
<i>Peso (kg)</i>	83,6±1,0	83,5±0,9	0,907
<i>Perímetro de cintura (cm)</i>	103±1	102±1	0,390
<i>IMC (kg/m²)</i>	30,5±0,3	30,3±0,3	0,604
<i>Glucosa (mg/dL)</i>	93,3±0,7	93,5±0,7	0,865
<i>Insulina (mU/l)</i>	8,6±0,4	9,1±0,4	0,376
<i>Triglicéridos (mg/dL)</i>	125±4	120±4	0,375
<i>Colesterol (mg/dL)</i>	161±2	162±2	0,845
<i>HDL (mg/dL)</i>	43,7±0,7	44,9±0,7	0,182
<i>LDL (mg/dL)</i>	91,0±1,7	92,2±1,7	0,602
<i>Proteína C-reactiva (mg/dL)</i>	3,1±0,2	2,2±0,2	0,005
<i>Presión sanguínea sistólica (mm Hg)</i>	136±1	136±1	0,788
<i>Presión sanguínea diastólica (mm Hg)</i>	79,0±0,7	77,5±0,7	0,133
<i>HbA1c (%)</i>	5,9±0,0	5,9±0,0	0,662
<i>DI</i>	0,94±0,04	0,98±0,04	0,481
<i>ISI</i>	4,28±0,20	3,90±0,14	0,117
<i>IGI</i>	0,94±0,07	1,09±0,15	0,411
<i>HIRI</i>	1105±52	1144±60	0,629
<i>MISI (x10²)</i>	2,42±0,18	1,73±0,09	<0,001
<i>HOMA-IR</i>	2,7±0,1	2,8±0,1	0,717

Valor p del ANOVA de un factor, excepto para el análisis de la proporción Hombre/Mujer en el que el valor p corresponde a la prueba de Chi-cuadrado. (Índice de sensibilidad a la insulina; ISI, índice insulinogénico; IGI, índice de resistencia hepática a la insulina; HIRI, índice de sensibilidad a la insulina muscular; MISI y “disposition index”; DI).

Tabla S2. Características basales de los participantes del estudio (con muestra fecal disponible) en función de la intervención dietética (dietas LF o Med).

	<i>Dieta LF</i>	<i>Dieta Med</i>	<i>Valor de p</i>
<i>N</i>	148	171	n/a
<i>Género (Hombre/Mujer)</i>	(127/21)	(140/31)	0,342
<i>Edad (años)</i>	57,9±0,7	58,2±0,8	0,759
<i>Peso (kg)</i>	84,2±1,2	82,9±1,0	0,410
<i>Perímetro de cintura (cm)</i>	103±1	102±1	0,198
<i>IMC (kg/m²)</i>	30,7±0,4	30,0±0,3	0,185
<i>Glucosa (mg/dL)</i>	93,2±0,9	92,5±0,8	0,532
<i>Insulina (mU/l)</i>	8,9±0,5	8,4±0,4	0,517
<i>Triglicéridos (mg/dL)</i>	126,5±5,1	118,3±4,7	0,237
<i>Colesterol (mg/dL)</i>	162,2±2,4	163,0±2,5	0,814
<i>HDL (mg/dL)</i>	43,6±0,9	45,4±0,8	0,135
<i>LDL (mg/dL)</i>	91,6±2,0	93,3±2,0	0,570
<i>Proteína C-reactiva(mg/dL)</i>	3,1±0,3	2,3±0,3	0,057
<i>Presión sanguínea sistólica (mm Hg)</i>	137±2	135±1	0,367
<i>Presión sanguínea diastólica (mm Hg)</i>	79,4±0,9	76,9±0,8	0,042
<i>HbA1c (%)</i>	5,9±0,0	5,9±0,0	0,510
<i>DI</i>	0,88±0,04	0,96±0,04	0,190
<i>ISI</i>	4,16±0,23	3,99±0,16	0,527
<i>IGI</i>	0,96±0,07	1,02±0,20	0,792
<i>HIRI</i>	1152±69	1063±56	0,311
<i>MISI (x10²)</i>	2,56±0,23	1,67±0,10	<0,001
<i>HOMA-IR</i>	2,9±0,2	2,6±0,1	0,236

Valor p del ANOVA de un factor, excepto para el análisis de la proporción Hombre/Mujer en el que el valor p corresponde a la prueba de Chi-cuadrado. (Índice de sensibilidad a la insulina; ISI, índice insulínogénico; IGI, índice de resistencia hepática a la insulina; HIRI, índice de sensibilidad a la insulina muscular; MISI y “disposition index”; DI).

Tabla S3. Comparación entre las características basales de los 462 pacientes no diabéticos al inicio del estudio CORDIOPREV frente a los participantes en el estudio (con muestras fecales disponibles y sin tratamiento antibiótico) según la intervención dietética (dietas LF o Med). Valor p del ANOVA de un factor, excepto para el análisis de la proporción Hombre/Mujer en el que el valor p corresponde a la prueba de Chi-cuadrado. *Participante en el estudio con muestra fecal disponible y sin tratamiento antibiótico.

	<i>Dieta LF</i>	<i>Dieta LF*</i>	<i>Valor de p</i>	<i>Dieta Med</i>	<i>Dieta Med*</i>	<i>Valor de p</i>
<i>N</i>	216	148	n/a	246	171	n/a
<i>Género (Hombre/Mujer)</i>	(183/33)	(127/21)	0,774	(206/40)	(140/31)	0,618
<i>Edad (años)</i>	57,5±0,6	57,9±0,7	0,642	57,8±0,6	58,2±0,8	0,688
<i>Peso (kg)</i>	83,6±1,0	84,2±1,2	0,717	83,5±0,9	82,9±1,0	0,663
<i>Perímetro de cintura (cm)</i>	103,0±0,8	103,1±0,9	0,900	102,1±0,7	101,5±0,8	0,576
<i>IMC (kg/m²)</i>	30,5±0,3	30,7±0,4	0,676	30,3±0,3	30,0±0,3	0,583
<i>Glucosa (mg/dL)</i>	93,3±0,7	93,2±0,9	0,903	93,5±0,7	92,5±0,8	0,315
<i>Insulina (mU/l)</i>	8,6±0,4	8,9±0,5	0,688	9,1±0,4	8,4±0,4	0,244
<i>Triglicéridos (mg/dL)</i>	125±4	126,5±5,1	0,848	120±4	118,3±4,7	0,778
<i>Colesterol (mg/dL)</i>	161±2	162,2±2,4	0,795	162±2	163,0±2,5	0,734
<i>HDL (mg/dL)</i>	43,7±0,7	43,6±0,9	0,944	44,9±0,7	45,4±0,8	0,665
<i>LDL (mg/dL)</i>	91,0±1,7	91,6±2,0	0,799	92,2±1,7	93,3±2,0	0,692
<i>Proteína C-reactiva (mg/dL)</i>	3,1±0,2	3,1±0,3	0,995	2,2±0,2	2,3±0,3	0,692
<i>Presión sanguínea sistólica (mm Hg)</i>	136±1	137±2	0,677	136±1	135±1	0,754
<i>Presión sanguínea diastólica (mm Hg)</i>	79,0±0,7	79,4±0,9	0,725	77,5±0,7	76,9±0,8	0,567
<i>HbA1c (%)</i>	5,9±0,0	5,9±0,0	0,736	5,9±0,0	5,9±0,0	0,994
<i>DI</i>	0,94±0,04	0,88±0,04	0,331	0,98±0,04	0,96±0,04	0,763
<i>ISI</i>	4,28±0,20	4,16±0,23	0,711	3,90±0,14	3,99±0,16	0,685
<i>IGI</i>	0,94±0,07	0,96±0,07	0,863	1,09±0,15	1,02±0,20	0,787
<i>HIRI</i>	1105±52	1152±69	0,579	1144±60	1063±56	0,344
<i>MISI (x10²)</i>	2,42±0,18	2,56±0,23	0,495	1,73±0,09	1,67±0,10	0,813
<i>HOMA-IR</i>	2,7±0,1	2,9±0,2	0,525	2,8±0,1	2,6±0,1	0,351

Tabla S4. Características basales de la población de estudio. Valor p ANOVA de un factor, a excepción proporción Hombre/Mujer: valor p prueba de Chi-cuadrado.

	<i>Dieta LF</i>			<i>Dieta Med</i>			<i>Dieta</i>	<i>Grupo</i>	<i>Dieta*Grupo</i>	<i>Inc-Dieta</i>
	<i>NonInc-LF</i>	<i>Inc-LF</i>	<i>Valor de p</i>	<i>NonInc-Med</i>	<i>Inc-Med</i>	<i>Valor de p</i>	<i>Valor de p</i>	<i>Valor de p</i>	<i>Valor de p</i>	<i>Valor de p</i>
<i>N</i>	120	28	n/a	130	41	n/a	n/a	n/a	n/a	(28/41)
<i>Género (Hombre/Mujer)</i>	(103/17)	(24/4)	0,987	(107/23)	(33/8)	0,792	0,342	0,782	n/a	0,574
<i>Edad (años)</i>	57,4±0,8	59,9±1,7	0,213	58,1±0,9	58,8±1,4	0,671	0,844	0,221	0,501	0,608
<i>Peso (kg)</i>	83,2±1,3	88,6±3,5	0,069	82,1±1,2	85,3±2,0	0,212	0,266	0,029	0,565	0,381
<i>Perímetro de cintura (cm)</i>	102±1	107±3	0,039	100±1	105±1	0,015	0,223	0,002	0,996	0,506
<i>IMC (kg/m²)</i>	30,3±0,4	32,2±1,1	0,037	29,6±0,4	31,5±0,5	0,010	0,226	0,001	0,930	0,542
<i>Glucosa (mg/dL)</i>	92,4±0,9	96,5±2,5	0,065	91,9±0,9	94,3±1,5	0,200	0,349	0,026	0,574	0,435
<i>Insulina (mU/l)</i>	8,6±0,6	10,1±1,2	0,238	8,0±0,4	9,7±1,0	0,118	0,577	0,056	0,905	0,822
<i>Triglicéridos (mg/dL)</i>	126,1±5,8	128,3±10,9	0,868	108,8±4,5	149,0±12,5	<0,001	0,839	0,013	0,025	0,245
<i>Colesterol (mg/dL)</i>	160,1±2,6	171,3±6,7	0,089	160,9±2,7	170,0±6,2	0,109	0,953	0,020	0,808	0,888
<i>HDL (mg/dL)</i>	43,6±1,0	43,6±1,6	0,997	45,4±0,9	45,4±2,1	0,996	0,228	0,999	0,995	0,533
<i>LDL (mg/dL)</i>	89,7±2,1	99,7±5,6	0,065	93,1±2,3	93,7±4,6	0,899	0,707	0,136	0,185	0,410
<i>Proteína C-reactiva(mg/dL)</i>	3,0±0,4	3,2±0,6	0,772	2,3±0,3	2,4±0,3	0,849	0,104	0,731	0,925	0,166
<i>Presión sanguínea sistólica (mm Hg)</i>	136±2	143±4	0,115	135±2	135±3	0,932	0,132	0,252	0,209	0,121
<i>Presión sanguínea diastólica (mm Hg)</i>	79±1	82±2	0,220	77±1	77±2	0,798	0,032	0,272	0,443	0,125
<i>HbA1c (%)</i>	5,9±0,0	6,1±0,1	0,005	5,9±0,0	6,0±0,1	0,016	0,306	<0,001	0,593	0,413
<i>DI</i>	0,91±0,04	0,79±0,11	0,228	1,03±0,05	0,73±0,05	0,002	0,663	0,005	0,211	0,610
<i>ISI</i>	4,4±0,3	3,2±0,4	0,025	4,2±0,2	3,2±0,3	0,014	0,764	0,001	0,905	0,895
<i>IGI</i>	0,98±0,08	0,88±0,16	0,817	1,20±0,12	0,41±0,77	0,030	0,668	0,112	0,216	0,618
<i>HIRI</i>	1112±73	1327±188	0,189	977±48	1334±171	0,011	0,554	0,008	0,509	0,977
<i>MISI (x10²)</i>	2,67±0,27	2,13±0,45	0,239	1,65±0,12	1,75±0,20	0,808	0,020	0,464	0,294	0,386
<i>HOMA-IR</i>	2,7±0,2	3,4±0,5	0,116	2,4±0,1	3,2±0,4	0,016	0,373	0,006	0,715	0,829

Tabla S5. Diferencias en la frecuencia de presencia/ausencia de taxones bacterianos. Se aplicó la prueba de Chi-cuadrado para establecer las diferencias de presencia/ausencia de taxones bacterianos. Cuando los diferentes taxones jerárquicos presentaban el mismo porcentaje se mostraba el más alto en términos de jerarquía.

<i>Filo</i>	<i>Taxón bacteriano</i>	<i>NonInc-LF</i>	<i>Inc-LF</i>	<i>Valor de p</i>
<i>Actinobacteria</i>	<i>c_Actinobacteria</i>	100,00%	92,86%	0,003
<i>Bacteroidetes</i>	<i>B. uniformis</i>	100,00%	96,43%	0,038
<i>Bacteroidetes</i>	<i>unknown specie (g_Parabacteroides)</i>	99,17%	92,86%	0,033
<i>Firmicutes</i>	<i>o_Lactobacillales</i>	100,00%	96,43%	0,038
<i>Firmicutes (o_Lactobacillales)</i>	<i>f_Streptococcaceae</i>	100,00%	92,86%	0,003
<i>Firmicutes (o_Clostridiales)</i>	<i>unknown genus (f_Christensenellaceae)</i>	71,67%	92,86%	0,019
<i>Firmicutes (o_Clostridiales)</i>	<i>V. parvula</i>	58,33%	32,14%	0,012
<i>Proteobacteria (c_Deltaproteobacteria)</i>	<i>g_Bilophila</i>	96,67%	85,71%	0,021
<i>Proteobacteria (c_Gammaproteobacteria)</i>	<i>c_Gammaproteobacteria</i>	100,00%	96,43%	0,038
<i>Filo</i>	<i>Taxón bacteriano</i>	<i>NonInc-Med</i>	<i>Inc-Med</i>	<i>Valor de p</i>
<i>Bacteroidetes</i>	<i>B. plebeius</i>	68,46%	90,24%	0,006
<i>Firmicutes (o_Gemellales)</i>	<i>f_Gemellaceae</i>	47,69%	65,85%	0,042
<i>Firmicutes (o_Clostridiales)</i>	<i>g_Coprococcus</i>	94,62%	78,05%	0,001
<i>Firmicutes (o_Clostridiales)</i>	<i>g_Megamonas</i>	30,00%	63,41%	0,000
<i>Firmicutes (o_Clostridiales)</i>	<i>g_Megasphaera</i>	44,62%	65,85%	0,018
<i>Firmicutes (o_Clostridiales)</i>	<i>g_Phascalactobacterium</i>	88,46%	100,00%	0,023
<i>Firmicutes (o_Erysipelotrichi)</i>	<i>g_Holdemania</i>	69,23%	48,78%	0,017
<i>Fusobacteria</i>	<i>p_Fusobacteria</i>	44,62%	70,73%	0,004
<i>Verrucomicrobia</i>	<i>c_Verrucomicrobiae</i>	78,46%	95,12%	0,014
<i>Filo</i>	<i>Taxón bacteriano</i>	<i>Inc-LF</i>	<i>Inc-Med</i>	<i>Valor de p</i>
<i>Actinobacteria</i>	<i>B. adolescentis</i>	46,43%	75,61%	0,013
<i>Bacteroidetes</i>	<i>B. fragilis</i>	32,14%	65,85%	0,006
<i>Firmicutes (o_Clostridiales)</i>	<i>unknown genus (f_Christensenellaceae)</i>	92,86%	70,73%	0,025
<i>Firmicutes (o_Clostridiales)</i>	<i>g_Megamonas</i>	39,29%	63,41%	0,048
<i>Firmicutes (o_Clostridiales)</i>	<i>g_Phascalactobacterium</i>	85,71%	100,00%	0,013
<i>Firmicutes (o_Clostridiales)</i>	<i>g_Veillonella</i>	78,57%	95,12%	0,035
<i>Proteobacteria (c_Gammaproteobacteria)</i>	<i>o_Pasteurellales</i>	71,43%	90,24%	0,043

Tabla S6. Tabla de análisis de supervivencia de las puntuaciones específicas de la dieta construidas con los modelos RSF de la microbiota intestinal en función la dieta consumida. Los pacientes se clasificaron según los valores de RSF-LF y RSF-Med por la mediana: puntuación de riesgo baja y puntuación de riesgo alta. Proporción de eventos: n° de eventos/ n° de expuestos al riesgo. Hazard Ratio: probabilidad de ocurrencia del evento en el intervalo de tiempo. LF: dieta baja en grasas; MED: dieta Mediterránea.

Puntuación RSF-LF baja				
<i>Tiempo desde la aleatorización (meses)</i>	<i>Proporción de eventos</i>		<i>Hazard Ratio</i>	
	LF	MED	LF	MED
0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
10	0,0000	0,0112	0,0000	0,0011
20	0,0588	0,1494	0,0061	0,0161
30	0,0157	0,0552	0,0016	0,0057
40	0,0325	0,0299	0,0033	0,0030
50	0,0374	0,0348	0,0038	0,0035
60	0,0000	0,0563	0,0000	0,0058
Puntuación RSF-LF alta				
<i>Tiempo desde la aleatorización (meses)</i>	<i>Proporción de eventos</i>		<i>Hazard Ratio</i>	
	LF	MED	LF	MED
0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
10	0,0129	0,0000	0,0013	0,0000
20	0,0805	0,0629	0,0084	0,0065
30	0,0746	0,0680	0,0078	0,0070
40	0,0323	0,0147	0,0033	0,0015
50	0,0377	0,0976	0,0038	0,0103
60	0,0952	0,0000	0,0100	0,0000
Puntuación RSF-MED baja				
<i>Tiempo desde la aleatorización (meses)</i>	<i>Proporción de eventos</i>		<i>Hazard Ratio</i>	
	LF	MED	LF	MED
0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
10	0,0136	0,0118	0,0014	0,0012
20	0,0979	0,0727	0,0103	0,0075
30	0,0313	0,0265	0,0032	0,0027
40	0,0163	0,0274	0,0016	0,0028
50	0,0374	0,0000	0,0038	0,0000
60	0,0323	0,0299	0,0033	0,0030
Puntuación RSF-MED alta				
<i>Tiempo desde la aleatorización (meses)</i>	<i>Proporción de eventos</i>		<i>Hazard Ratio</i>	
	LF	MED	LF	MED
0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
10	0,0423	0,1429	0,0043	0,0154
20	0,0602	0,0993	0,0062	0,0104
30	0,0484	0,0161	0,0050	0,0016
40	0,0377	0,1391	0,0038	0,0150
50	0,0597	0,0278	0,0062	0,0028
60	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

Tabla S7. Tabla de análisis de supervivencia de las puntuaciones específicas de la dieta construidas con los modelos Lasso de la microbiota intestinal en función la dieta consumida. Los pacientes se clasificaron según los valores de Lasso-LF y Lasso-Med por la mediana: puntuación de riesgo baja y puntuación de riesgo alta. Proporción de eventos: n° de eventos/ n° de expuestos al riesgo. Hazard Ratio: probabilidad de ocurrencia del evento en el intervalo de tiempo. LF: dieta baja en grasas; MED: dieta Mediterránea.

Puntuación Lasso-LF baja				
<i>Tiempo desde la aleatorización (meses)</i>	<i>Proporción de eventos</i>		<i>Hazard Ratio</i>	
	LF	MED	LF	MED
0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
10	0,0000	0,0113	0,0000	0,0011
20	0,0576	0,0920	0,0059	0,0096
30	0,0620	0,0387	0,0064	0,0039
40	0,0000	0,0274	0,0000	0,0028
50	0,0194	0,0310	0,0020	0,0031
60	0,0000	0,0247	0,0000	0,0025
Puntuación Lasso-LF alta				
<i>Tiempo desde la aleatorización (meses)</i>	<i>Proporción de eventos</i>		<i>Hazard Ratio</i>	
	LF	MED	LF	MED
0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
10	0,0132	0,0000	0,0013	0,0000
20	0,0822	0,1258	0,0086	0,0134
30	0,0303	0,0876	0,0031	0,0092
40	0,0625	0,0161	0,0065	0,0016
50	0,0545	0,1101	0,0056	0,0117
60	0,0833	0,0345	0,0087	0,0035
Puntuación Lasso-MED baja				
<i>Tiempo desde la aleatorización (meses)</i>	<i>Proporción de eventos</i>		<i>Hazard Ratio</i>	
	LF	MED	LF	MED
0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
10	0,0126	0,0000	0,0013	0,0000
20	0,0774	0,1032	0,0081	0,0109
30	0,0563	0,0146	0,0058	0,0015
40	0,0301	0,0000	0,0031	0,0000
50	0,0174	0,0000	0,0018	0,0000
60	0,0278	0,0290	0,0028	0,0029
Puntuación Lasso-MED alta				
<i>Tiempo desde la aleatorización (meses)</i>	<i>Proporción de eventos</i>		<i>Hazard Ratio</i>	
	LF	MED	LF	MED
0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
10	0,0000	0,0110	0,0000	0,0011
20	0,0615	0,1124	0,0063	0,0119
30	0,0336	0,1032	0,0034	0,0109
40	0,0351	0,0441	0,0036	0,0045
50	0,0612	0,1345	0,0063	0,0144
60	0,0702	0,0286	0,0073	0,0029

XIV. ANEXOS

XIV. ANEXOS

ANEXO 1. Cuestionario de riesgo de diabetes FINDRISC

Finnish Diabetes Risk Score

TYPE 2 DIABETES RISK ASSESSMENT FORM

Circle the correct alternative and add up your points.

1. Age
 0 p. Under 45 years
 2 p. 45-54 years
 3 p. 55-64 years
 4 p. Over 64 years

2. Body-mass index (see reverse of form)
 0 p. Lower than 25 kg/m²
 1 p. 25-30 kg/m²
 2 p. Higher than 30 kg/m²

3. Weight circumference measured below the ribs (usually measured at the level of the navel)

	MEN	WOMEN
0 p.	Less than 94 cm	Less than 80 cm
3 p.	94-102 cm	80-88 cm
4 p.	More than 102 cm	More than 88 cm

4. Do you usually have daily at least 30 minutes of physical activity at work and/or during leisure time (including normal daily activity)?
 0 p. Yes
 2 p. No

5. How often do you eat vegetables or fruit?
 0 p. Every day
 1 p. Not every day

6. Have you ever taken antihypertensive medication regularly?
 0 p. No
 3 p. Yes

7. Have you ever been found to have high blood glucose (eg in a health examination, during an illness, during pregnancy)?
 0 p. No
 2 p. Yes

8. Have any of the members of your immediate family or other relatives been diagnosed with diabetes (Type 1 or Type 2)?
 0 p. No
 3 p. Yes: grandparents, aunt, uncle or first cousin (but not own parent, brother, sister or child)
 5 p. Yes: parent, brother, sister or own child

9. Are you of Asian or Asian British origin?
 0 p. No
 1 p. Yes

Total Risk Score

The risk of developing Type 2 diabetes within 10 years is

<p>Lower than 7</p> <p>7 – 11</p> <p>12 – 14</p> <p>15 – 20</p> <p>Higher than 20</p>	<p>LOW: estimated 1 in 100 will develop disease</p> <p>SLIGHTLY ELEVATED: estimated 1 in 25 will develop disease</p> <p>MODERATE: estimated 1 in 6 will develop disease</p> <p>HIGH: estimated 1 in 3 will develop disease</p> <p>VERY HIGH: estimated 1 in 2 will develop disease</p>
--	---

ANEXO 2. Cuestionario de riesgo de diabetes de la ADA



Are you at risk for type 2 diabetes?

Diabetes Risk Test:

- 1. How old are you?**
 Less than 40 years (0 points)
 40–49 years (1 point)
 50–59 years (2 points)
 60 years or older (3 points)
- 2. Are you a man or a woman?**
 Man (1 point) Woman (0 points)
- 3. If you are a woman, have you ever been diagnosed with gestational diabetes?**
 Yes (1 point) No (0 points)
- 4. Do you have a mother, father, sister or brother with diabetes?**
 Yes (1 point) No (0 points)
- 5. Have you ever been diagnosed with high blood pressure?**
 Yes (1 point) No (0 points)
- 6. Are you physically active?**
 Yes (0 points) No (1 point)
- 7. What is your weight category?**
 See chart at right.

WRITE YOUR SCORE IN THE BOX.

ADD UP YOUR SCORE.

Height	Weight (lbs.)		
4' 10"	119–142	143–190	191+
4' 11"	124–147	148–197	198+
5' 0"	128–152	153–203	204+
5' 1"	132–157	158–210	211+
5' 2"	136–163	164–217	218+
5' 3"	141–168	169–224	225+
5' 4"	145–173	174–231	232+
5' 5"	150–179	180–239	240+
5' 6"	155–185	186–246	247+
5' 7"	159–190	191–254	255+
5' 8"	164–196	197–261	262+
5' 9"	169–202	203–269	270+
5' 10"	174–208	209–277	278+
5' 11"	179–214	215–285	286+
6' 0"	184–220	221–293	294+
6' 1"	189–226	227–301	302+
6' 2"	194–232	233–310	311+
6' 3"	200–239	240–318	319+
6' 4"	205–245	246–327	328+
	1 point	2 points	3 points

If you weigh less than the amount in the left column: 0 points

Adapted from Bang et al., Ann Intern Med 151:775–783, 2009 • Original algorithm was validated without gestational diabetes as part of the model.

If you scored 5 or higher:

You are at increased risk for having type 2 diabetes. However, only your doctor can tell for sure if you do have type 2 diabetes or prediabetes, a condition in which blood glucose levels are higher than normal but not yet high enough to be diagnosed as diabetes. Talk to your doctor to see if additional testing is needed.

Type 2 diabetes is more common in African Americans, Hispanics/Latinos, Native Americans, Asian Americans, and Native Hawaiians and Pacific Islanders.

Higher body weight increases diabetes risk for everyone. Asian Americans are at increased diabetes risk at lower body weight than the rest of the general public (about 15 pounds lower).

Lower Your Risk

The good news is you can manage your risk for type 2 diabetes. Small steps make a big difference in helping you live a longer, healthier life.

If you are at high risk, your first step is to visit your doctor to see if additional testing is needed.

Visit diabetes.org or call 1-800-DIABETES (800-342-2383) for information, tips on getting started, and ideas for simple, small steps you can take to help lower your risk.

ANEXO 3. Certificados de menciones derivadas de la tesis



sea
Sociedad Española de Arteriosclerosis

EL COMITÉ CIENTÍFICO DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE ARTRIOSCEROSIS

Y

EL COMITÉ ORGANIZADOR DEL XXX CONGRESO NACIONAL

Han decidido otorgar por su calidad científica el

PREMIO MENCIÓN ESPECIAL 2017

Al Póster presentado

EN EL XXX CONGRESO NACIONAL S.E.A.

CÁDIZ 017

**“La alteración de la microbiota intestinal precede al desarrollo de
síndrome metabólico.”**

Presentada por los autores

**Cristina Vals Delgado (1); Isabel Pérez Corral (1); Sonia García Carpintero
(1); Nieves Delgado Casado (1); Oriol A. Rangel Zúñiga (1); Francisco
Pérez Jiménez (1); Antonio Camargo (1)**

(1) Unidad de Lípidos y Arteriosclerosis. Hospital Universitario Reina Sofía/Universidad de Córdoba/IMIBIC, Córdoba, España y CIBER Fisiopatología Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España.

Xavier Pintó Sala
Presidente SEA



sea
Sociedad Española de Arteriosclerosis

LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE ARTERIOSCLEROSIS
Y
EL COMITÉ ORGANIZADOR DEL XXXI CONGRESO NACIONAL SEA

Han decidido otorgar por su calidad científica el
PREMIO MENCIÓN ESPECIAL 2018

A la Comunicación Oral presentada
EN EL XXXI CONGRESO NACIONAL S.E.A.

GIRONA 2018

“La microbiota intestinal como factor determinante del desarrollo de enfermedades metabólicas.”

Presentada por los autores

Cristina Vals Delgado; Rosa Jiménez Lucena; José Antonio Santos Marcos; Oriol A. Rangel Zúñiga; Gracia M. Quintana Navarro; Pablo Pérez Martínez; Antonio Camargo García

Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Canvax Biotech Lifescience, Universidad de Málaga

Pedro Valdivielso Felices

Presidente SEA



sea
Sociedad Española
de Arteriosclerosis

LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE ARTERIOSCLEROSIS

Y

EL COMITÉ ORGANIZADOR DEL XXXII CONGRESO NACIONAL SEA

Han decidido otorgar por su calidad científica el

PREMIO MENCIÓN ESPECIAL 2019

A la Comunicación Oral presentada

EN EL XXXII CONGRESO NACIONAL S.E.A.

VALENCIA 2019

*“Modelo predictivo del desarrollo de diabetes tipo 2 basado en microbiota intestinal:
estudio CORDIOPREV”*

Presentada por los autores

Cristina Vals-Delgado¹, Isabel Pozuelo-Sánchez¹, Francisco Gómez-Delgado¹, Alejandro Villasanta-González¹, José Jiménez-Torres¹, Javier Delgado-Lista¹, Antonio Camargo¹, José López-Miranda¹

1) Unidad de Lípidos y Arteriosclerosis. IMIBIC/Hospital Universitario Reina Sofía/Universidad de Córdoba, Córdoba. CIBER Fisiopatología Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España.

Pedro Valdivielso Felices

Presidente SEA