



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**Asociación de variantes en el gen *NLRP3* del inflammasoma y la microbiota intestinal
con la obesidad y el síndrome metabólico en población infantil**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Ricardo Emmanuel Villarruel Vázquez

Samuel Canizalez Quinteros

Facultad de Química, Unidad Periférica Instituto Nacional de Medicina Genómica

Dr. Fausto Sánchez Muñoz

Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"

Dr. José Adelfo Escalante Lozada

Instituto de Biotecnología UNAM

Ciudad de México. Febrero, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PMDCB/1058/2017

Villarruel Vázquez Ricardo Emmanuel
Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas
P r e s e n t e


Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 12 de junio del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **MAESTRÍA EN CIENCIAS**, con la réplica de la tesis "**Asociación de variantes en el gen NLRP3 del inflammasoma y la microbiota intestinal con la obesidad y el síndrome metabólico en población infantil**", dirigida por el/la Dr(a). **Canizales Quinteros Samuel**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PRESIDENTE	Tovar Palacios Armando Roberto
VOCAL	Pedraza Alva Gustavo
VOCAL	Alcaraz Peraza Luis David
VOCAL	Ochoa Leyva Adrian
SECRETARIO	Ortega Soto Enrique

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"Por mi raza hablará el espíritu"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 12 de junio de 2017.
COORDINADOR


Dr. ROBERTO CORIA ORTEGA

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada durante el desarrollo de la maestría (CVU. 705082) y al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) del Posgrado en Ciencias Bioquímicas por el apoyo económico para la realización de la estancia en la Universidad de California los Angeles.

Asociación de variantes en el gen *NLRP3* del inflamasoma y la microbiota intestinal con la obesidad y el síndrome metabólico en población infantil.

Índice

1. Resumen.....	1
1.1 Abstract.....	3
2. Abreviaturas.....	5
3. Antecedentes.....	6
3.1 Obesidad, causas y consecuencias.....	6
3.1.1 Panorama global de la obesidad.....	6
3.1.2 Obesidad en México.....	7
3.1.3 Obesidad y síndrome metabólico.....	7
3.1.3.1 Clasificación del síndrome metabólico.....	8
3.1.3.2 Factores de riesgo metabólico.....	8
3.1.3.2.1 Hipertrigliceridemia.....	9
3.1.3.2.2 Niveles bajos de lipoproteínas de alta densidad.....	10
3.1.3.2.3 Hiperglucemia.....	10
3.1.3.2.4 Hipertensión.....	11
3.1.3.2.5 Obesidad central.....	11
3.1.3.3 Inflamación crónica en la obesidad y síndrome metabólico.....	12
3.1.4 Factores que influyen en el desarrollo de la obesidad.....	12
3.1.5 La genética como factor que predispone a la obesidad.....	13
3.1.5.1 Genes asociados a la obesidad.....	14
3.2 El inflamasoma y la obesidad.....	15
3.2.1 Receptores tipo NOD (dominio de oligomerización de nucleótidos) y el inflamasoma.....	15
3.2.1.1 Características de NLRP3.....	15
3.2.1.2 Mecanismo de acción.....	16
3.2.2 Asociación de moléculas del inflamasoma con las alteraciones del metabolismo.....	17
3.2.3 Deficiencia de los genes del inflamasoma y su efecto en el desarrollo de obesidad y alteraciones metabólicas.....	20

3.3 Microbiota intestinal y obesidad.....	21
3.3.1 Composición de la microbiota intestinal.....	22
3.3.1.1 Composición de la microbiota intestinal en niños.....	23
3.3.2 Disbiosis de la microbiota intestinal y obesidad.....	23
3.3.3 Asociación de la genética del individuo con la composición de la microbiota intestinal y la obesidad.....	24
3.3.4 Disbiosis de la microbiota intestinal y deficiencias del inflammasoma.....	26
3.3.5 Relación de la microbiota intestinal y la inflamación de bajo grado.....	27
3.4 Estudios genéticos del inflammasoma en humanos.....	28
4. Justificación.....	30
5. Planteamiento del problema.....	31
6. Hipótesis.....	32
7. Objetivo.....	32
7.1 Objetivos particulares.....	32
8. Métodos.....	33
9. Resultados.....	41
10. Discusión.....	59
11. Conclusión.....	68
12. Referencias.....	69
13. Anexos.....	80

1. Resumen

La obesidad es una enfermedad muy prevalente que se acompaña de anormalidades metabólicas, las cuales conducen al desarrollo de enfermedades cardiovasculares y diabetes tipo 2. Al conjunto de estas anormalidades se les denomina síndrome metabólico (SM). Se ha mostrado que la genética del individuo es un factor importante para el desarrollo de obesidad y se han encontrado por escaneos del genoma completo una gran cantidad de genes asociados a su desarrollo. Sin embargo, en conjunto solo explican una proporción (~20%) de la heredabilidad que se ha calculado por estudios en familias y gemelos (50-70%). En los últimos años, los genes asociados a la inflamación han tomado relevancia, debido a que se ha mostrado que la obesidad cursa por un proceso inflamatorio, que contribuye de manera importante al desarrollo de alteraciones metabólicas. Dentro de estos genes se encuentra *NLRP3*, un gen que codifica para una proteína perteneciente a un complejo multiprotéico llamado inflamasoma, cuyo silenciamiento por modificación genética, en ratones alimentados con dieta alta en grasa, disminuye la ganancia de peso y mejora los parámetros metabólicos. Sin embargo, no hay estudios genéticos en humanos que hayan evaluado su participación en el desarrollo de obesidad o alteraciones metabólicas. Por ello, se analizó la asociación de 18 variantes distribuidas a lo largo de *NLRP3* con la obesidad, el SM y los rasgos que lo componen en una población de 1214 niños (556 con obesidad, 658 normopeso). Los hallazgos encontrados fueron replicados en una población de 1083 adultos (589 con obesidad, 494 normopeso). Además se usó una cohorte infantil longitudinal a 2 años para evaluar si las variantes asociadas podrían ser predictoras de alteraciones metabólicas futuras (109 normopeso, 89 con obesidad). Finalmente, en un estudio piloto que incluyó 104 niños (54 normopeso, 50 con obesidad) se midió la concentración de lipopolisacáridos (LPS), y la composición de la microbiota intestinal. Se encontró que de las 18 variantes analizadas ninguna se asoció con la obesidad. Sin embargo, la variante rs12137901 se asoció con la disminución del riesgo de presentar SM en niños con obesidad (RM= 0.685, P=0.044) y de manera interesante, se asoció con el aumento en el riesgo de presentar hipertrigliceridemia (HTG) en niños normopeso (RM= 1.547, P=0.016) y la disminución del riesgo en niños con obesidad (RM= 0.572, P= 0.006). De estas asociaciones solo se replicó la encontrada en niños normopeso en la población de adultos (RM= 1.791, P= 0.006). Este SNP además mostró que independientemente del estado nutricional, causa un aumento en el riesgo de

presentar HTG a los dos años (RM= 2.056, P= 0.029). Sin embargo, el SNP no presentó significancia al evaluar los niveles de transcrito y proteína entre los genotipos, ni al analizar la población infantil completa, ni al estratificar por estado nutricional. Por otro lado ni los niveles de transcrito ni de proteína correlacionaron con los niveles de triglicéridos. Pero la concentración de LPS correlacionó positivamente con los triglicéridos ($r= 0.404$, $P<0.001$), y a su vez el transcrito de *NLRP3* tiende a aumentar conforme a la concentración de LPS ($r=0.268$, $P=0.186$).

Estos hallazgos, sugieren que el inflamasoma de *NLRP3* parece tener una asociación modesta con el desarrollo de alteraciones metabólicas en niños. Pero los LPS podrían ser una pieza fundamental en su desarrollo. Y debido a que el transcrito tiende a aumentar conforme a la concentración de LPS, se debe incrementar el tamaño de muestra y el poder estadístico para corroborar si los LPS, podrían modificar la expresión de *NLRP3* o los niveles de proteína. Además se debe evaluar la participación del SNP y su interacción con los LPS en la edad adulta, en la que hay acumulación de moléculas activadoras de *NLRP3*, lo cual podría aumentar el efecto del gen sobre el desarrollo de alteraciones metabólicas.

1.1 Abstract.

Obesity is a very prevalent disease that is accompanied by metabolic abnormalities, which lead to the development of cardiovascular diseases and type 2 diabetes. Altogether, these abnormalities are called metabolic syndrome (MS). It has been shown that the genetics of the individual is an important factor for the development of obesity and a large number of genes associated with its development have been found by scans of the whole genome. However, together they only explain a proportion (~ 20%) of the heritability that has been calculated by studies in families and twins (50-70%). In recent years, the genes associated with inflammation have become relevant, because it has been shown that obesity is caused by an inflammatory process, which contributes significantly to the development of metabolic disorders. Within these genes is *NLRP3*, a gene that codes for a protein belonging to a multiprotein complex called the inflammasome, whose silencing by genetic modification in mice fed a high-fat diet, decreases weight gain and improves metabolic parameters. However, there are no genetic studies in humans that have evaluated its participation in the development of obesity or metabolic disorders. Therefore, we analyzed the association of 18 variants distributed throughout *NLRP3* with obesity, MS and its features in a population of 1214 children (556 with obesity, 658 normal weight). The findings were replicated in a population of 1083 adults (589 with obesity, 494 normal-weight). In addition, a 2-year longitudinal cohort of children was used to evaluate if the associated variants could be predictors of future metabolic alterations (109 normal-weight, 89 with obesity). Finally, in a pilot study that included 104 children (54 normal-weight, 50 with obesity) the concentration of LPS, and the composition of the intestinal microbiota were measured. It was found that none of the 18 variants analyzed was associated with obesity. However, the SNP rs12137901 was associated with a decreased risk of presenting MS in children with obesity (OR = 0.685, P = 0.044) and interestingly, it was associated with an increased risk of presenting HTG in normal-weight children (OR = 1.547, P = 0.016) and a decreased risk in children with obesity (OR = 0.572, P = 0.006). Of these associations, only the one found in normal-weight children was replicated in the adult population (OR = 1.791, P = 0.006). This SNP also showed that regardless of nutritional status, it causes an increase in the risk of presenting HTG at two years (OR = 2.056, P = 0.029). However, the SNP did not show significance when evaluating the transcript and protein levels among the genotypes, neither when analyzing the whole child

population nor stratifying by nutritional status. On the other hand, neither the transcript nor protein levels correlated with triglyceride levels. But the concentration of LPS correlated positively with triglycerides ($r = 0.404$, $P < 0.001$), and in turn the transcript of NLRP3 tends to increase according to the concentration of LPS ($r = 0.268$, $P = 0.186$).

These findings suggest that the NLRP3 inflammasome seems to have a modest association with the development of metabolic alterations in children. But LPS could be a fundamental piece in their development. And because the transcript tends to increase according to the concentration of LPS, the sample size and statistical power should be increased to corroborate whether the LPS could modify the expression of NLRP3 or protein levels. Furthermore, the participation of the SNP and its interaction with the LPS in adulthood, in which there is accumulation of NLRP3 activating molecules, should be evaluated, to corroborate if the effect of inflammasome is depending of the age.

2. Abreviaturas.

ADR β 2: gen de los receptores adrenérgicos β 2

AGL: Ácidos grasos libres

AIM: ausente en melanoma

APOA5: Gen de la apolipoproteína 5

ASC: dominio terminal de reclutamiento de activación de caspasa

ATP: Adenosín trifosfato

ATPIII: Panel para el tratamiento de adultos III

CASP: Caspasa

DAMP: Patrón molecular asociado a daño

DC: Dieta convencional

DT2: Diabetes tipo 2

ECV: Enfermedades cardiovasculares

FABP: gen de la proteína de unión a ácidos grasos libres

FTO: gen asociado a la obesidad y a la masa grasa

GLUT: Transportador de glucosa

HDL: Lipoproteína de alta densidad

HGL: Hiperglucemia

HTA: Hipertensión arterial

HTG: Hipertrigliceridemia

IL: Interleucina

IMC: Índice de masa corporal

IPAF: Factor ICE que activa a la proteasa

IRS: Sustrato del receptor de insulina

LEP: gen de Leptina

LMI: Libres de microorganismos intestinales

LPL: Lipasa lipoproteica

LPS: Lipopolisacáridos

LRR: dominio de repeticiones ricas en leucina

MI: Microbiota intestinal

NLR: Receptores tipo NOD

NLRP3: gen del receptor NOD que tiene un dominio de pirina 3

NOD: gen del receptor tipo dominio de oligomerización para la unión de nucleótidos

NPY: gen del Neuropeptido Y

OMS: Organización Mundial para la Salud

PAM: Péptido antimicrobiano

PAMP: Patrón molecular asociado a patógenos

pIMC: percentila del índice de masa corporal

PPAR: gen del receptor de proliferación de lisosomas activados

PRR: Receptores que reconocen patrones

PYD: Dominio pirina

RI: Resistencia a la insulina

RXR: gen del receptor x retinoide

SM: Síndrome metabólico

3. Antecedentes

3.1 Obesidad: Causas y consecuencias.

La obesidad es una enfermedad crónica caracterizada por la acumulación anormal de grasa en el organismo que puede ser perjudicial para la salud [1]. Se ha propuesto que es causada por un desbalance entre el consumo y el gasto de energía. En general está clasificada con base en la relación que existe entre el peso corporal y el cuadrado de la estatura (Kg/m^2), la cual es llamada índice de masa corporal (IMC) [2]. Se clasifican como individuos obesos aquellos que tienen un $\text{IMC} \geq 30 \text{kg}/\text{m}^2$ [1]. En niños entre 5 y 17 años se utiliza el percentil del IMC (pIMC), el cálculo toma en cuenta la edad y el sexo, un pIMC ≥ 95 es indicativo de obesidad infantil [3].

En diversos estudios se ha mostrado que la obesidad aumenta el riesgo de desarrollar enfermedades como diabetes tipo 2 (DT2), y enfermedades cardiovasculares (ECV), las dos primeras causas de muerte a nivel mundial [4, 5]. Además, se ha demostrado que los niños obesos que llegaron a ser adultos con obesidad, tienen una mayor probabilidad de desarrollar estas enfermedades a una edad más temprana [6, 7].

3.1.1 Panorama global de la obesidad.

De acuerdo a los datos presentados por la Organización Mundial para la Salud (OMS), los casos de obesidad se han duplicado en los últimos 30 años. En el 2014, 1,900 millones de adultos mayores de 18 años tenían sobrepeso y 600 millones presentaban obesidad. En el mismo año más de 41 millones de niños se presentaron con sobrepeso u obesidad [8]. De no disminuir esta tendencia, se estima que para el 2030 habrá más de 1,100 millones de personas con obesidad en el mundo [9]. Entre los países con mayores índices de obesidad,

tanto en adultos como en niños se encuentran los Estados Unidos, México, Nueva Zelanda, Hungría, Australia y Canadá. [10].

Aproximadamente 2.8 millones de adultos mueren al año por causas asociadas a la obesidad, 44% por DT2, 23% por ECV y el resto por otras enfermedades, incluyendo algunos tipos de cáncer que se han relacionado con la obesidad [11].

3.1.2 Obesidad en México.

México se encuentra en los primeros lugares de obesidad en el mundo, 2 de cada 3 sujetos mayores de 18 años presentan sobrepeso u obesidad, así como 1 de cada 3 niños en etapa escolar [11, 12]. Siguiendo la tendencia mundial, las principales causas de muerte en México son debidas a ECV y DT2 [13]. Estas enfermedades han sido asociadas a un conjunto de alteraciones metabólicas muy frecuentes en la obesidad, denominado síndrome metabólico (SM). El SM tiene una alta prevalencia en la población mexicana, por lo que se considera uno de los principales problemas de salud pública [14].

3.1.3 Obesidad y síndrome metabólico (SM).

De manera general, el SM esta caracterizado por alteraciones metabólicas como: intolerancia a la glucosa, obesidad central, dislipidemias (hipertrigliceridemia y lipoproteínas de alta densidad disminuidas) e hipertensión [15]. El conjunto de estas alteraciones incrementa el riesgo de desarrollar ECV y DT2 [16]. En México, estudios basados en la encuesta nacional de salud y nutrición han revelado que aproximadamente el 40% de personas adultas entre 20 y 30 años presentan SM, siendo más prevalente en sujetos obesos (~60%) [17].

3.1.3.1 Clasificación del síndrome metabólico.

El SM ha sido clasificado de diferentes maneras. Una de las clasificaciones más citadas, es la propuesta por el panel para el tratamiento de adultos III (ATPIII, por sus siglas en inglés), que define al SM como la presencia de tres o más de las siguientes alteraciones metabólicas: hipertrigliceridemia (HTG), niveles disminuidos de lipoproteínas de alta densidad (HDLs por sus siglas en inglés), hiperglucemia (HGL) en ayuno, obesidad central (aumento de la circunferencia de cintura), e hipertensión arterial (HTA) [18]. Sin embargo, se han propuesto otras formas de clasificar al SM (Tabla 1) [19]. Estas clasificaciones se han generado con los resultados obtenidos en estudios realizados en adultos. Sin embargo, para población infantil, de Ferranti y colaboradores propusieron una clasificación basada en la clasificación del ATP III que incluye los cortes pediátricos para los rasgos del SM (tabla 2) [20].

3.1.3.2 Factores de riesgo metabólico.

Los rasgos que conforman al SM, se encuentran muy relacionados entre sí, y se ha probado que en conjunto aumentan el riesgo de padecer las enfermedades antes mencionadas [15, 16, 18,19].

Tabla 1. Definición de síndrome metabólico

Criterio	WHO (1999)	NCEP ATP III (2001)	IDF (2006)
Esencial	Diabetes mellitus, IFG, IGT, o resistencia a la insulina (medida por clamp) y al menos dos de las	Tres o más de los siguientes cinco factores de riesgo	Obesidad central más dos de los siguientes cuatro factores
Obesidad central	Cociente cintura-cadera >0.90 en hombres y >0.85 en mujeres o IMC >30	Circunferencia de cintura > 102cm en hombres y >88 cm en mujeres	Circunferencia de cintura ≥94cm en hombres y ≥80 cm en mujeres (o dependiendo del grupo étnico)
resistencia a la insulina	Diabetes mellitus, IFG, IGT, o resistencia a la insulina (medida por CLAMP) y al menos dos de las	FGP ≥ 100mg/dL (5.6mM)	FGP ≥ 100mg/dL (5.6mM) o diabetes tipo 2 previamente diagnosticada
Perfil de lípidos	Triglicéridos en plasma ≥ 1.7mM y/o HDL-C <0.9mM (35mg/dL) en hombres y <1.0 mM (39mg/dL) en mujeres	Triglicéridos en plasma ≥ 150mg/dL (1.7mM) HDL-C <40mg/dL (1.03mM) en hombres y <50mg/dL (1.29mM) en mujeres	Triglicéridos en plasma ≥ 150mg/dL (1.7mM) o tratamiento específico para esta alteración HDL-C <40mg/dL (1.03mM) en hombres y <50mg/dL (1.29mM) en mujeres
Hipertensión	Presión arterial ≥ 140/90 mmHg	Presión arterial sistólica ≥ 130 o diastólica ≥ 85 mmHg	Presión arterial sistólica ≥ 130 o diastólica ≥ 85 mmHg o tratamiento para hipertensión previamente diagnosticada
Otros	Excreción de albumina en orina >20 ug/min o cociente albumina-creatinina		Criterios metabólicos adicionales que soporten pero no sean esenciales para el diagnóstico.

IMC= Índice de masa corporal; FPG= Glucosa plasmática en ayuno; HDL= Lipoproteínas de alta densidad; IDF= Federación internacional de Diabetes; IFG= alteración en la glucosa en ayuno ; IGT= alteración en la tolerancia a la glucosa ; NCEP ATP III= Programa Nacional de Educación para el Colesterol, Panel de Tratamiento para el Adulto III; WHO= Organización Mundial para la Salud

Tabla 2. Definición de Síndrome metabólico para adultos y propuesta pediátrica

Criterio	Definición en adultos	Definición pediátrica propuesta
Hipertrigliceridemia	≥150 mg/dL	≥100 mg/dL
Lipoproteína de baja densidad (HDL) bajas	<40 mg/dL (hombres), <50 mg/dL (mujeres)	HDL < 50mg/dL (niños en edades entre 15-19 años <45 mg/dL)
Glucosa alta en ayuno	≥110 mg/dL	≥110mg/dL
Obesidad central (circunferencia de cintura)	>103cm (hombres), >88cm (mujeres)	> percentila 75 por edad y género
Hipertensión	Presión arterial sistólica ≥130mmHg, o diastólica ≥80mmHg	> percentila 90 por edad, género y altura

3.1.3.2.1 Hipertrigliceridemia (HTG).

En el organismo existen fuentes exógenas y endógenas de triglicéridos. Los triglicéridos exógenos provienen de la dieta y son transportados por quilomicrones a través del torrente sanguíneo, mientras que los triglicéridos endógenos son sintetizados en el hígado, y transportados por las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDLs, por sus siglas en inglés). Además los triglicéridos son transformados a ácidos grasos libres (AGL), en el tejido adiposo y muscular [21]. Después de una comida, aproximadamente el 90% de los triglicéridos son absorbidos en el intestino y transportados por los quilomicrones. Mientras que durante un

ayuno prolongado predominan los triglicéridos sintetizados por el hígado, transportados por las VLDLs [22]. El incremento en el plasma de lipoproteínas ricas en lípidos es el resultado del aumento en la síntesis en el hígado y la absorción en el intestino, o una disminución del catabolismo, principalmente por una menor actividad de la lipasa lipoproteica (LPL, por sus siglas en inglés) [23]. La HTG es el rasgo del SM más común y se ha asociado con una mayor incidencia de riesgo cardiovascular. El mecanismo propuesto es debido a la capacidad aterogénica de las lipoproteínas ricas en triglicéridos [24].

3.1.3.2.2 Niveles bajos de lipoproteínas de alta densidad (HDLs).

Las HDLs son las encargadas del transporte de colesterol desde los tejidos hasta el hígado, en donde se metaboliza para ser excretado. El hígado es el principal encargado de sintetizar las HDLs, las cuales se dividen en subpoblaciones [25]. Dentro de ellas, HDL₂ y HDL₃ son las más importantes. HDL₂ es la subpoblación menos densa y rica en colesterol, mientras que HDL₃ es la más pequeña, densa, y rica en apolipoproteínas. [26]. Se ha observado que en los sujetos con obesidad la subpoblación HDL₂ se encuentra disminuida. La disminución de las HDL₂ provoca fallas en el transporte de colesterol, que se ha asociado con un mayor riesgo de ECV [27].

3.1.3.2.3 Hiperglucemia (HGL).

La insulina es producida por el páncreas en respuesta a las concentraciones de glucosa en sangre, estimulando su entrada a los diferentes tejidos. La resistencia a la insulina (RI) ocurre cuando hay una disminución en la sensibilidad a los efectos de la insulina en los tejidos [28]. Las causas de RI son numerosas y el mecanismo es multifactorial. En la mayoría de los casos es producida por alteraciones como la lipotoxicidad, inflamación, glucotoxicidad,

disfunción mitocondrial y estrés del retículo endoplasmático. Dichas alteraciones se han asociado a la disminución en la expresión de genes relacionados con la vía de señalización de la insulina, que resulta en deficiencias en su mecanismo de acción y en consecuencia en el aprovechamiento de la glucosa en sangre [29]. En la obesidad, generalmente se producen las alteraciones antes mencionadas, siendo común que se presente RI. Por lo tanto, las personas con obesidad a menudo presentan concentraciones elevadas de insulina y de glucosa en plasma [30].

3.1.3.2.4 Hipertensión (HTA).

La HTA es el principal factor de riesgo en el desarrollo de ECV, y el más importante cuando hablamos de morbilidad y mortalidad por esta enfermedad [31]. Algunos rasgos del SM contribuyen a elevar la presión arterial. La HGL, debida a la RI por ejemplo, produce la elevación de la presión arterial a través de la activación del sistema nervioso simpático y el sistema renina-angiotensina-aldosterona, que provoca la retención de sodio, disfunción endotelial y alteraciones en la función renal, elevando la presión arterial [32]. La HTA también está asociada a la HTG, ya que la acumulación de lípidos en la pared de arterias produce una disminución de su diámetro, aumentando la presión sanguínea contribuyendo al desarrollo de HTA [33].

3.1.3.2.5 Obesidad central.

El IMC es uno de los cálculos más usados para clasificar a la obesidad. Sin embargo, no considera la distribución de la grasa en el cuerpo [2]. La obesidad central en cambio, medida a través de la circunferencia de cintura, nos permite tener un estimado del tejido adiposo visceral, el cual se ha asociado con el desarrollo de ECV y DT2 [34]. El tejido adiposo

visceral es uno de los principales productores de adipocinas (Ej. TNF- α , IL-6 y resistina), las cuales incrementan la inflamación y la probabilidad de desarrollar alteraciones metabólicas [35]. Por esta razón en las clasificaciones de SM es común encontrar la obesidad central entre los rasgos que definen al SM [36].

3.1.3.3 Inflamación crónica en la obesidad y síndrome metabólico.

La obesidad y el SM están muy relacionados con el proceso inflamatorio. Sin embargo, la inflamación observada, tiene características particulares; por ejemplo, no existe infección o signos de autoinmunidad, ni daño en algún tejido. Además, el nivel de activación es menor al observado durante una infección. Por lo anterior, la inflamación que se presenta en la obesidad es considerada de bajo grado [37]. Este tipo de inflamación es atribuida principalmente al tejido adiposo visceral, debido a que el incremento en el tamaño y número de adipocitos, conducen a un aumento en la producción de adipocinas proinflamatorias [38]. Estas adipocinas promueven la infiltración de células del sistema inmune (principalmente macrófagos). La acumulación de macrófagos en el tejido adiposo incrementa la producción de mediadores inflamatorios (IL-6, IL-1 β , TNF- α , entre otros), que junto a un alto grado de estrés oxidante, hipoxia y lipólisis en adipocitos, provocan un incremento en la inflamación [39]. Diversos estudios sugieren que la inflamación de bajo grado en el tejido adiposo es el desencadenante de las alteraciones características del SM [40].

3.1.4 Factores que influyen en el desarrollo de la obesidad.

Debido a la relación estrecha entre la obesidad, el SM y las enfermedades que las acompañan, se han buscado los factores causales de la obesidad, con el fin de prevenirla y tratarla. La obesidad es una enfermedad multifactorial, en la que se ha descrito la

participación de la dieta, el ejercicio, el sedentarismo, la genética, y en años recientes la microbiota intestinal (MI) [41]. Uno de los factores más relevantes y de los más estudiados es la dieta. Se ha propuesto que la obesidad es provocada por un desbalance entre el consumo y el gasto energético. La energía que no se gasta durante el día en gran medida se almacena en forma de grasa en el tejido adiposo [42, 43]. Los altos índices de obesidad en diferentes países, ha sido propiciada por el aumento en el consumo de bebidas endulzadas y de alimentos con alto contenido calórico, los cuales son de bajo costo y de fácil acceso para la mayor parte de la población, aunado a una vida sedentaria y con baja actividad física [44, 45]. Por otro lado, se ha mostrado que el tipo de dieta puede generar cambios en la composición de la MI, favoreciendo a microorganismos que generan un mejor aprovechamiento energético de los alimentos [46].

Los factores antes mencionados pueden ser modificados con cambios de hábitos, principalmente alimenticios y de actividad física. Por el contrario, hay factores como la genética que son intrínsecos de cada individuo, que no podemos modificar y que se ha mostrado contribuyen al desarrollo de la obesidad.

3.1.5 La genética como factor que predispone al desarrollo de obesidad.

Estudios en familias y gemelos, han permitido calcular una heredabilidad de la obesidad entre 50-70% [47, 48]. Aunque estos estudios presentaban evidencia de que el componente genético está involucrado en el desarrollo de la obesidad, se desconocían los genes participantes. A través de los estudios de ligamiento en familias y estudios de escaneo del genoma completo, se han encontrado más de 600 regiones asociadas con la obesidad [49,50]. Estas regiones solo explican un 20% de la heredabilidad de la obesidad; por lo que el

resto continúa sin poder ser explicado [51]. Por ello, se ha generado la hipótesis de que la obesidad puede ser causada por un número amplio de alelos, los cuales generan pequeños aumentos en la predisposición y que actúan en conjunto [52]. Debido a esto, la búsqueda de genes asociados a la obesidad aún sigue en curso.

3.1.5.1 Genes asociados a la obesidad

En humanos se han encontrado diversos genes que pueden estar participando en el desarrollo de la obesidad. Estos genes incluso han sido divididos de acuerdo a la función que tiene la proteína que codifican [53]. Genes como el neuropéptido Y (*NPY*), el gen asociado a la obesidad y a la masa grasa (*FTO*) y el gen de la leptina (*LEP*), están asociados con el apetito. Mientras que genes como el de los receptores adrenérgicos $\beta 2$ (*ADR\beta 2*) y el gen para la proteína de unión a ácidos grasos libres (*FABP*) se han asociado con el metabolismo, y genes como el receptor de proliferación de lisosomas activados (*PPAR*) y el receptor X retinoide (*RXR*) con la adipogénesis [54, 55]. Diversos estudios han presentado que polimorfismos en estos genes se asocian con el incremento en el peso corporal [56].

Por otra parte, en modelos animales con distintas intervenciones dietarías, se han descrito una gran cantidad de genes involucrados en la ganancia de peso. Recientemente han cobrado relevancia genes relacionados con el proceso inflamatorio, debido a que la obesidad cursa por un proceso inflamatorio crónico de bajo grado que se ha asociado con el desarrollo de alteraciones metabólicas [57]. Dentro de estos genes, se encuentra el gen del receptor tipo dominio de oligomerización para la unión de nucleótidos (NOD, por sus siglas en inglés) que tiene un dominio de pirina 3 (*Nlrp3*), un gen que codifica para una proteína que participa en la formación de un complejo multiprotéico llamado inflamasoma. Este gen se ha

asociado con cambios en la ganancia de peso, alteraciones metabólicas y disbiosis de la MI [58, 59, 60]. Estos hallazgos han generado interés en el estudio de NLRP3 en humanos.

3.2. El inflammasoma y la obesidad

El inflammasoma es un complejo multiprotéico que regula la secreción de proteínas proinflamatorias como interleucina 1 β (IL-1 β) e interleucina 18 (IL-18) [61]. Es conocido por ser un sensor de la homeostasis del metabolismo, y en modelos animales se ha demostrado que su activación crónica está asociada con mayor ganancia de peso y con las alteraciones metabólicas características del SM [58, 59, 60].

3.2.1 Los Receptores tipo NOD (dominio de oligomerización de nucleótidos) y el inflammasoma

El sistema inmune innato se activa cuando receptores que reconocen patrones (PRRs, por sus siglas en inglés), interactúan con moléculas asociadas a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés) o a daño tisular (DAMPs, por sus siglas en inglés), con el fin de eliminar al patógeno o reparar el daño de los tejidos [62]. Dentro de estos receptores, se encuentran los receptores tipo NOD (NLR, por sus siglas en inglés), los cuales han cobrado importancia debido a que algunos de ellos pueden formar el inflammasoma. Los NLRs son receptores citosólicos que se expresan predominantemente en macrófagos y células dendríticas [63, 64]. Basados en su estructura y función los NLRs se pueden clasificar en 3 grupos: los NLR, los NLR que contienen un dominio pirina (NLRP, por sus siglas en inglés), y los receptores ausentes en melanoma (AIM, por sus siglas en inglés). Dentro de estos grupos, la familia de los receptores NLRP es la más grande, siendo NLRP3 el más estudiado por su capacidad de formar al inflammasoma y ser activado por una gran variedad de moléculas [65, 66, 67].

3.2.1.1 Características de NLRP3.

NLRP3 tiene los dominios característicos de este grupo de receptores, estos son: el dominio NOD, el dominio pirina (PYD, por sus siglas en inglés) y el dominio de repeticiones ricas en leucina (LRR por sus siglas en inglés) [68]. Las señales y moléculas que activan a NLRP3 son variadas y pueden ser tanto exógenas como endógenas. Dentro de los activadores exógenos se encuentra: los ácidos nucleicos bacterianos, el muramil dipéptido y ciertas proteínas formadoras de poros como la pneumolisina y la negiricina, además de asbestos y cristales de sílice [69, 70]. Los activadores endógenos incluyen: la concentración de adenosín trifosfato (ATP) extracelular, los AGL, cristales de ácido úrico, cristales de colesterol, sulfato de heparán y hialurán, fibras β amiloides e incluso concentraciones elevadas de glucosa [71, 72].

3.2.1.2 Mecanismo de acción.

El mecanismo por el cual se activa NLRP3 ha sido bien descrito (Fig. 1). Este receptor requiere de dos señales para su activación, la primera es una señal de preparación, en la que participan los receptores tipo Toll (TLR, por sus siglas en inglés) y es dependiente de la activación del factor nuclear κ B [73, 74]. Éste es un factor de transcripción que al llegar al núcleo induce la expresión de genes del inflammasoma, entre ellos *NLRP3* y citocinas pro-inflamatorias (*IL-1 β* e *IL-18*) [75]. Una vez que se lleva a cabo la traducción de las proteínas del inflammasoma, se requiere de una segunda señal, mediada por la unión de moléculas activadoras al dominio LRR [76].

Después del reconocimiento de la segunda señal, se produce la unión de la proteína asociada a la apoptosis que contiene un dominio terminal de reclutamiento de

activación de caspasa (ASC, por sus siglas en inglés). Esta proteína es la encargada de unirse a NLRP3 a través del dominio PYD que poseen ambas proteínas [77]. La unión de ASC con NLRP3 produce la oligomerización de PYD y la subsecuente unión de más ASC que forman filamentos, a los cuales se les une la pro-caspasa 1, a través del dominio de unión a caspasa, que comparte con ASC [78]. La proximidad entre las pro-caspasas 1 provoca su auto-proteólisis, produciendo su forma activa, la caspasa-1 (CASP-1), la cual promueve la liberación de IL-1 β e IL-18 [79].

3.2.2 Asociación de moléculas del inflamasoma con la obesidad y alteraciones del metabolismo.

En condiciones fisiológicas NLRP3 participa en la defensa contra infecciones, el recambio de células dañadas y la reparación de lesiones en el tejido, las cuales promueven su activación en células del sistema inmune (Ej. macrófagos, células dendríticas y linfocitos), produciendo en respuesta IL-1 β e IL-18. Una vez que la respuesta inmune mediada por NLRP3 ha eliminado las células dañadas o infectadas o bien ha generado la reparación tisular, regresa la homeostasis en el organismo y en consecuencia cesa la producción de citocinas generadas por la activación de NLRP3 y por tanto la activación celular [80].

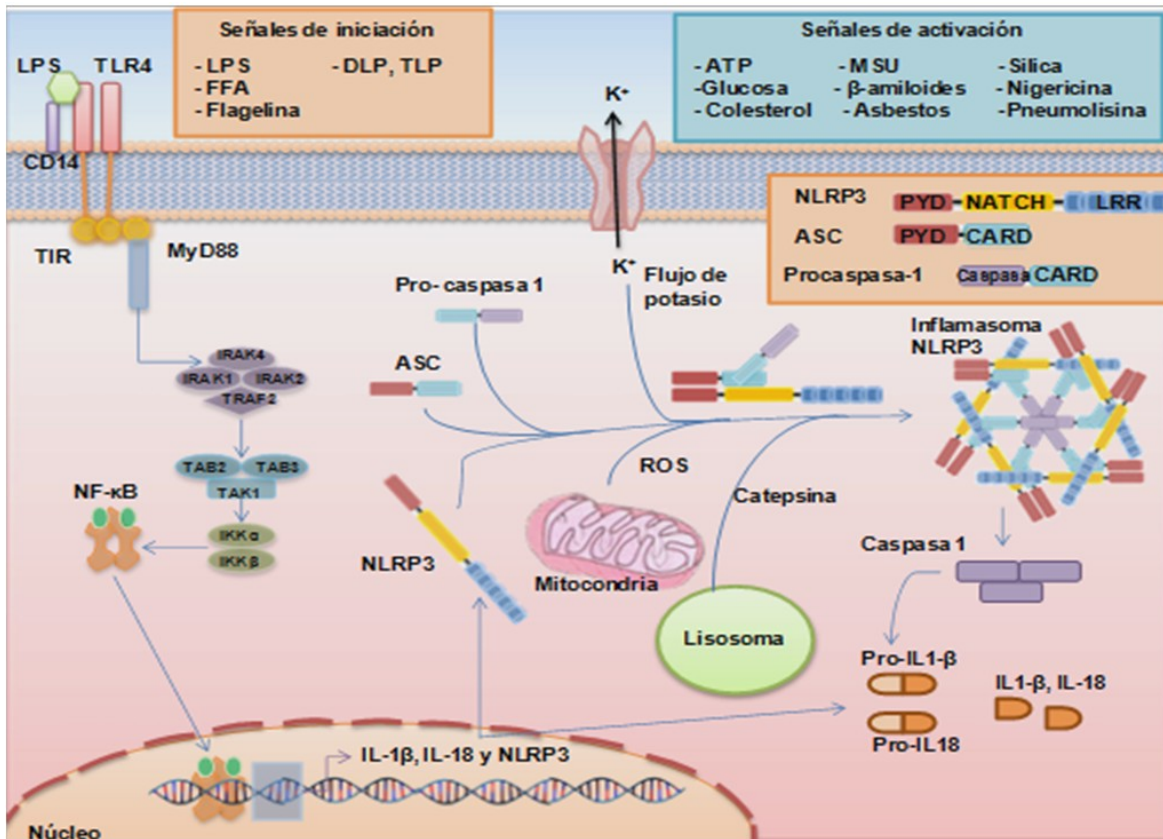


Fig.1 Mecanismo de activación del inflamasoma. NLRP3 requiere de dos señales para su activación y el ensamblaje del inflamasoma. La primera señal está mediada por la activación de los TLR. Los cuales al reconocer su molécula blanco activan al factor NF-κB, el cual promueve la expresión de *NLRP3*, así como *IL1B* e *IL18*. Una vez traducido, NLRP3 requiere de una segunda señal para promover el ensamblaje del inflamasoma. Esta señal es mediada por alteraciones en el metabolismo (concentraciones altas de AGL o glucosa, cristales de colesterol, etc.). Una vez activado se une a ASC y forma filamentos por interacciones a través del dominio PYD que comparten ambas proteínas. A estos filamentos se une la pro-caspasa 1 por interacción con el dominio de unión a caspasa, permitiendo la activación autoproteolítica de la caspasa 1, la cual finalmente escinde a la pro-IL-1β y pro-IL-18, liberándolas en su forma activa. Basada en [76]

Sin embargo, en la obesidad hay un estímulo constante de NLRP3 que proviene de diversas fuentes (Ej. AGL, LPS, HGL, entre otros), conduciendo a una inflamación crónica, lo que aumenta la activación de CASP-1 y por tanto los niveles de IL-1β e IL-18. El aumento en la activación de CASP-1, así como los niveles de estas citocinas se ha asociado con alteraciones metabólicas, como menor diferenciación de adipocitos, mayores niveles de triglicéridos circulantes, RI, pérdida y disfunción de las células β pancreáticas, esteatosis hepática y el aumento de la permeabilidad de la pared intestinal (fig. 2) [81, 82].

En cuanto a CASP-1, se ha sugerido que ciertas moléculas importantes en la diferenciación del adipocito, pueden servir como sustrato de CASP-1, lo cual disminuye la diferenciación a adipocitos maduros. Además, se ha mostrado que CASP-1 puede inhibir a la LPL, provocando un aumento de triglicéridos en circulación [83].

Por otra parte, se sabe que IL-1 β afecta la señalización de la insulina a través de la fosforilación de un residuo de serina en el sustrato 1 del receptor de insulina (IRS-1), lo cual provoca que no se produzca la exportación del transportador de glucosa (GLUT4, por sus siglas en inglés) hacia la membrana [84]. Por lo tanto hay un menor aprovechamiento de la glucosa en circulación. Además, en el hígado IL-1 β puede inhibir a PPAR- α , lo que produce la disminución de la oxidación de lípidos, los cuales pueden llegar a acumularse y provocar esteatosis hepática [85]. Por otro lado, NLRP3 puede producir muerte de células β pancreáticas, debido a que las células β secretan junto con la insulina, una molécula llamada péptido amiloide de los islotes, que es un activador de este receptor. Esto provoca el reclutamiento de macrófagos que promueven la muerte de estas células, lo cual puede conducir a DT2 [86, 87].

Finalmente se suman las alteraciones que produce IL-18. Esta interleucina juega un papel importante en el recambio y maduración de células del intestino, principalmente de las células caliciformes, las cuales sirven como barrera física entre el organismo y el lumen intestinal. Además, son productoras de moco y péptidos antimicrobianos (PAM), que mantienen la homeostasis de la MI [88, 89]. IL-18 puede provocar alteraciones cuando se trata de un proceso inflamatorio crónico, generando una menor diferenciación de células caliciformes, una menor producción de PAM, por lo tanto una mayor permeabilidad de la

pared intestinal, lo cual puede llevar a alteraciones en la composición de la MI y a una mayor traslocación de productos bacterianos como los LPS [90].

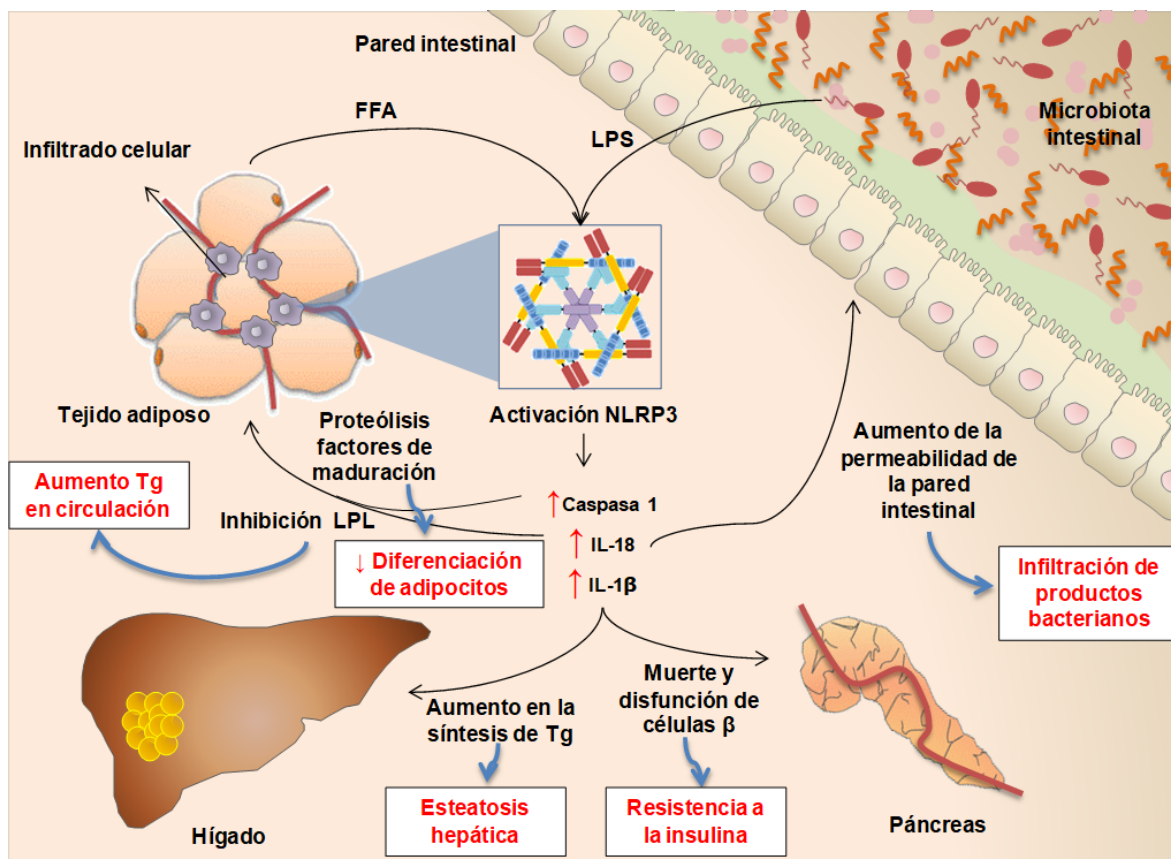


Fig.2 Efectos metabólicos de la activación crónica del inflamasoma. Los productos del inflamasoma, CASP-1, IL-1 β , e IL-18 pueden afectar la función de varios órganos. Por un lado, CASP-1, limita la diferenciación de adipocitos y disminuye la oxidación de lípidos. IL-1 β puede interferir con la señalización de la insulina en el tejido adiposo y el hígado, así como conducir a la muerte y disfunción de células β en el páncreas.. Por otro lado, la activación crónica IL-18 aumenta la permeabilidad de la pared intestinal, provocando disbiosis de la microbiota intestinal y favoreciendo el paso de LPS al torrente sanguíneo. Los LPS que son activadores de NLRP3, pueden incrementar su activación y por tanto agravar las alteraciones metabólicas. Basado en [81]

3.2.3 Deficiencia de los genes del inflamasoma y su efecto en el desarrollo de obesidad y alteraciones metabólicas.

Debido a la importancia de moléculas del inflamasoma en el desarrollo de alteraciones metabólicas, se han llevado a cabo diferentes estudios en modelos animales evaluando su participación en condiciones fisiológicas, o bajo un estímulo, generalmente dado por una dieta alta en grasa, encontrándose resultados contrastantes. Ratones deficientes para el gen

del antagonista del receptor de interleucina 1 (*Il-1ra^{-/-}*) esto es, en los que IL-1 β se podía unir a su receptor libremente, alimentados con una dieta convencional (DC) son resistentes al desarrollo de obesidad [91, 92]. Mientras que los ratones deficientes del gen del receptor de interleucina 1 (*Il-1r^{-/-}*) desarrollaban obesidad y resistencia a la insulina [93]. De manera contraria, los ratones deficientes de *Nlrp3*, que tienen una menor producción de IL-1 β y que fueron alimentados con una dieta alta en grasa, son menos propensos a la ganancia de peso y tienen mejores parámetros metabólicos (mayor sensibilidad a la insulina y menor acumulación de triglicéridos hepáticos), en comparación con ratones silvestres de la misma cepa, bajo las mismas condiciones [94]. En otro estudio, Stienstra y colaboradores observaron que los precursores de adipocitos de ratones deficientes en *Casp-1* o *Nlrp3* alimentados con una dieta alta en grasa, tienen una mayor diferenciación a adipocitos maduros y un mayor nivel de oxidación de lípidos, previniendo la ganancia de peso [83].

Debido a estos resultados, se ha propuesto que el efecto causado por la activación del inflamasoma depende del estado en el que se encuentre el organismo. En un estado de baja activación, el inflamasoma previene la ganancia de peso y mantiene la homeostasis metabólica [95], pero cuando el organismo se encuentra en un estado de inflamación crónica, la activación del inflamasoma se asocia con una mayor ganancia de peso y complicaciones metabólicas [96].

3.3 Microbiota intestinal y obesidad.

La microbiota intestinal es el conjunto de microorganismos que habitan en el intestino de manera comensal, mutualista u oportunista . Es conocida como el biorreactor, debido a que se encarga de proveernos de vitaminas y metabolitos necesarios para el organismo. Dentro

de sus otras funciones también se encuentran, protegernos de enteropatógenos, extraer energía de la dieta, y mantener una respuesta inmune normal. Sin embargo, las alteraciones en el balance entre la MI y el hospedero, se han asociado con obesidad y enfermedades inflamatorias [97, 98, 99].

3.3.1 Composición de la microbiota intestinal.

De manera general, la MI de humanos está constituida por siete phyla: Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacterias, Fusobacteria, Proteobacteria, Verrucomicrobia y Cyanobacteria, en orden de abundancia. Dentro de éstas, Firmicutes y Bacteroidetes conforman más del 90% de la abundancia [100]. Sin embargo, la microbiota intestinal tiene una gran variabilidad de individuo a individuo, por lo que establecer una composición "normal" es uno de los grandes retos [101].

Una de las estrategias que se ha propuesto para unificar la MI, es categorizar a cada individuo dependiendo del genero más representativo en su MI, a lo que se ha denominado enterotipos. En general los enterotipos son muy estables; pueden ser *Bacteroides*, *Prevotella* o *Ruminococcus*, y la clasificación se hace con base en el género que tenga mayor abundancia dentro de una MI específica [102]. Cada enterotipo está acompañado por una mayor abundancia de ciertas bacterias, relacionadas con el metabolismo por el cual tienen preferencia. *Bacteroides* es el género más representativo en individuos con alto consumo de proteína y grasa animal. *Prevotella* es prevalente en individuos con alto consumo de carbohidratos y fibra. Finalmente, *Ruminococcus* está mejor representado en dietas mixtas (proteínas y carbohidratos) [103, 104]. Los enterotipos son una de las formas más aceptadas para clasificar a la MI.

3.3.1.1 Composición de la microbiota intestinal en niños.

La MI en los niños pasa por diferentes etapas desde el nacimiento, hasta que entre los 5 y 6 años llega a ser más estable y vuelve a modificarse en la adolescencia debido a los cambios hormonales [105]. Se ha descrito que la colonización microbiana en el intestino de un infante, tiene un papel importante en el desarrollo inmunológico y metabólico, lo que puede impactar en la salud del niño [106].

Después del nacimiento, el intestino es colonizado rápidamente. Los primeros colonizadores son anaerobios facultativos, que crean un medio que promueve la colonización de anaerobios estrictos como *Bacteroides*, *Clostridium* y *Bifidobacterium* [107]. La MI del recién nacido está caracterizada por una baja diversidad. Después del primer año de vida, ya es distintiva en cada individuo y hacia los 5 años, prácticamente puede semejar la de un adulto en términos de composición y diversidad [108].

3.3.2 Disbiosis de la microbiota intestinal y obesidad.

La disbiosis está definida como cambios en la abundancia de la MI que está asociado a una patología, en este caso a la obesidad. Los primeros estudios que mostraron asociación entre la MI y la obesidad fueron en modelos animales, en los que se observó que ratones libres de microorganismos en el intestino (LMI) tenían un menor aumento de peso en comparación con los ratones colonizados por una MI. Al trasplantar la MI de uno de estos ratones a un ratón LMI, éste presentaba un aumento de peso similar al donador, sugiriendo que la MI era importante en la ganancia de peso [109]. Posteriormente, se descubrió que ratones alimentados con dieta alta en grasa, tenían cambios en la composición de la MI y presentaban un aumento de Firmicutes y una disminución de Bacteroidetes [110]. Estos

cambios se asociaron con el aumento de peso en los ratones, con resultados consistentes en diferentes estudios. En contraste, en humanos los resultados han sido inconsistentes. Mientras que algunos estudios que evaluaron la composición de la MI en sujetos obesos mostraron la misma tendencia que en ratones [111], otros presentaron el efecto inverso [112] o incluso no observaron diferencias en la abundancia de estos dos phyla [113]. En este sentido un estudio en niños mexicanos, mostró que no hay diferencias a nivel de phyla entre niños con normopeso y obesidad. Sin embargo, a nivel de especie *Bacteroides eggerthii* se encuentra elevado en niños con obesidad, mientras que bacterias de la familia *Cristencenellaceae* y de la especie *Bacteroides plebeius* son más abundantes en niños con normopeso [114]. De manera contrastante, Murugesan y colaboradores, encontraron mayor abundancia de Firmicutes y menor abundancia de Bacteroidetes asociada con complicaciones metabólicas en niños mexicano [115]. Por lo tanto, debido a que el procedimiento para la evaluación de la MI podría estar implicado en las diferencias entre los resultados, su estandarización es una tarea vigente [116, 117, 118].

3.3.3 Asociación de la genética del individuo con la composición de la microbiota intestinal y la obesidad.

La participación de la genética en la composición de la microbiota intestinal fue inicialmente demostrada en familias. Estos estudios presentaron una composición de MI muy parecida entre miembros de la familia, sugiriendo la existencia de un núcleo muy conservado de la microbiota, que no se comparte con individuos no relacionados [119]. Sin embargo, estos resultados pueden deberse a que los individuos de una familia comparten el medioambiente y el tipo de dieta. Estudios en gemelos monocigóticos que en su mayoría fueron separados al nacer, mostraron que a pesar de no compartir un mismo ambiente, tienen una composición

de MI muy similar, lo cual sugiere que la genética tiene una participación importante en su modulación [120, 121].

A pesar de esto, los genes involucrados y las bacterias que podrían ser reguladas por la genética, han sido poco descritos. Un estudio realizado en ratones calculó la heredabilidad que tienen las diferentes familias bacterianas de la MI, encontrando que la familia *Christensenellaceae*, perteneciente al phylum Firmicutes, es una de las más heredables. Además, esta familia se asoció con una menor ganancia de peso [122]. Posteriormente, otro estudio mostró que hay genes específicos que se asocian a un incremento o una disminución de ciertas bacterias. Dentro de los genes asociados, se encontró que la expresión de *Irak4*, uno de los genes involucrados en la cascada de señalización de los TLRs, correlacionaba positivamente con la abundancia de *Rosseburia spp.*, la cual se había asociado con un mayor IMC y con resistencia a la insulina [123]. Finalmente, un estudio en humanos evaluó la participación de un polimorfismo (rs651821) en el gen de la apolipoproteína A-V (*APOA5*) con el síndrome metabólico y las alteraciones de la microbiota intestinal, encontrando que las personas portadoras del alelo menor del SNP, tenían una mayor concentración de triglicéridos en sangre y presentaban una disminución de *Bifidobacterium spp.*, la cual además estuvo asociada con el síndrome metabólico [124].

Los estudios en modelos animales y en humanos sugieren que alteraciones en la MI, mediadas por la genética del individuo, podrían estar favoreciendo el desarrollo de obesidad y complicaciones metabólicas.

3.3.4 Disbiosis de la microbiota intestinal y deficiencias del inflamasoma.

Como se mencionó anteriormente, se sabe que IL-18 juega un papel importante en cuanto a la integridad de la pared intestinal. Por ello, alteraciones que modifiquen su concentración, tienen efecto en el intestino. Se ha descrito que ratones con genes del inflamasoma silenciados (*Nlrp3*, *Asc*, *Casp-1*) y alimentados con DC, tienen una menor producción de IL-18, lo cual provoca una menor diferenciación de células calciformes, por lo tanto una menor producción de moco y de PAM, lo cual ha sido asociado con una mayor permeabilidad de la pared intestinal y la disbiosis de la MI [125,126]. Sin embargo, el silenciamiento de estos genes en ratones a los que se les induce colitis (inflamación crónica), los protege de desarrollar colitis y mantienen la composición de la MI [127]. Por lo tanto, estos resultados indican que la respuesta del inflamasoma en el intestino, también depende del estado de activación en el que se encuentre el organismo.

Por otro lado Levy y colaboradores [125], mostraron que la microbiota intestinal en condiciones normales, mantiene una estrecha comunicación con el inflamasoma, ya que la MI produce metabolitos que favorecen la activación benéfica del inflamasoma que conduce a una producción constante de IL-18, resultando en una buena integridad de la pared intestinal. Mientras que cuando hay disbiosis de la MI, se producen metabolitos que inhiben la activación del inflamasoma, afectando la producción de IL-18, lo cual conduce a una menor integridad de la pared intestinal. Estos hallazgos sugieren que el inflamasoma juega un papel importante en el establecimiento de la MI. Por ello variantes genéticas en estos genes pueden estar involucradas en la disbiosis de la MI y en consecuencia en el desarrollo de alteraciones metabólicas.

3.3.4 Relación de la microbiota intestinal y la inflamación de bajo grado.

La obesidad es conocida por ser una enfermedad inflamatoria crónica, y se ha propuesto a la MI como un posible contribuyente a la inflamación (Fig. 3) [128]. En ratones alimentados con dieta alta en grasa se ha visto que hay un aumento en la concentración de LPS circulantes, que es un componente de la pared celular de bacterias Gram negativas, este aumento se ha definido como endotoxemia [129, 130]. En este caso, la dieta alta en grasa aumenta la permeabilidad de la pared intestinal, debido a la disfunción de proteínas como la ocludina y la claudina-1: lo cual permite el paso de productos bacterianos, principalmente LPS, que al llegar al torrente sanguíneo se pueden distribuir a diferentes tejidos, donde son reconocidos por células del sistema inmune [131]. Los LPS causan inflamación mediada por la liberación de citocinas proinflamatorias (Ej. TNF- α e IL-6) a través de la activación de TLR-4 [132]. Además, el reconocimiento de LPS por TLR-4 puede estar relacionado con la señal de preparación del inflamasoma, que al activarse estaría favoreciendo la liberación de IL-1 β e IL-18, y por tanto aumentando la probabilidad de desencadenar alteraciones metabólicas, como ya se ha mencionado [133].

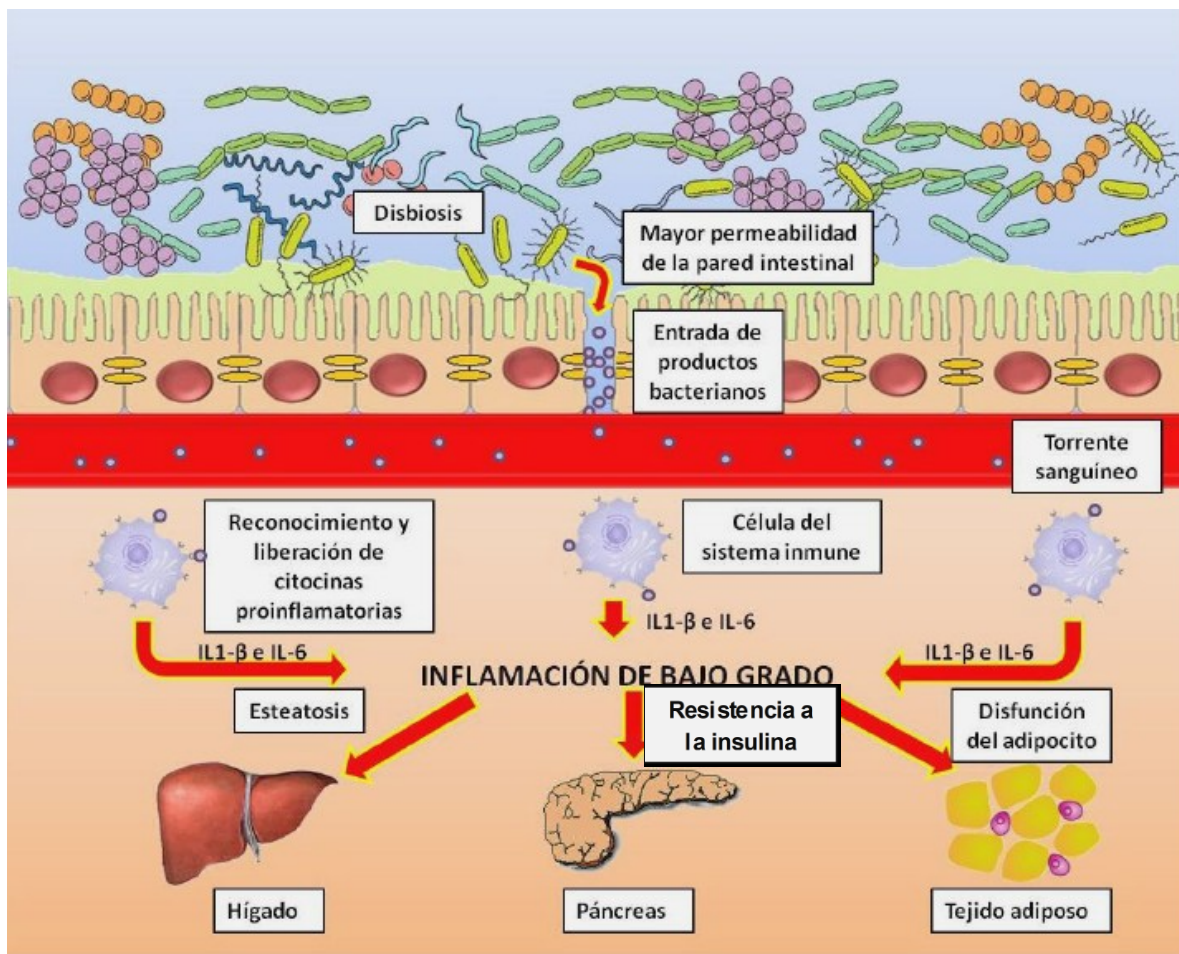


Fig. 3 Contribución de la microbiota intestinal a la inflamación de bajo grado. El aumento en la permeabilidad de la pared intestinal, favorece el paso de productos bacterianos al torrente sanguíneo (principalmente LPS), los cuales pueden distribuirse a los diferentes órganos. Dentro de ellos los macrófagos residentes reconocen estos productos a través de los TLRs desencadenando una cascada de señalización que culmina en la producción de citocinas proinflamatorias. La inflamación puede causar alteraciones en los diversos órganos; esteatosis, resistencia a la insulina y disfunción del adipocito. Basada en [57]

3.4 Estudios genéticos de *NLRP3* en humanos.

A pesar de la importancia que ha mostrado *NLRP3* en modelos animales en el desarrollo de obesidad y complicaciones metabólicas, no hay estudios en humanos que hayan evaluado su participación en estas alteraciones. Los estudios genéticos de *NLRP3* que existen hasta el momento se han dirigido solo a algunas variantes genéticas que incrementan el riesgo de desarrollar enfermedades inflamatorias. Dentro de estas variantes, algunas de ellas se asociaron con un aumento en la expresión del gen y con más de una enfermedad

inflamatoria, como enfermedad de Crohn, artritis reumatoide y gota [134]. Sin embargo, no se sabe si variantes en el gen *NLRP3* podrían estar asociadas con la obesidad y sus alteraciones metabólicas.

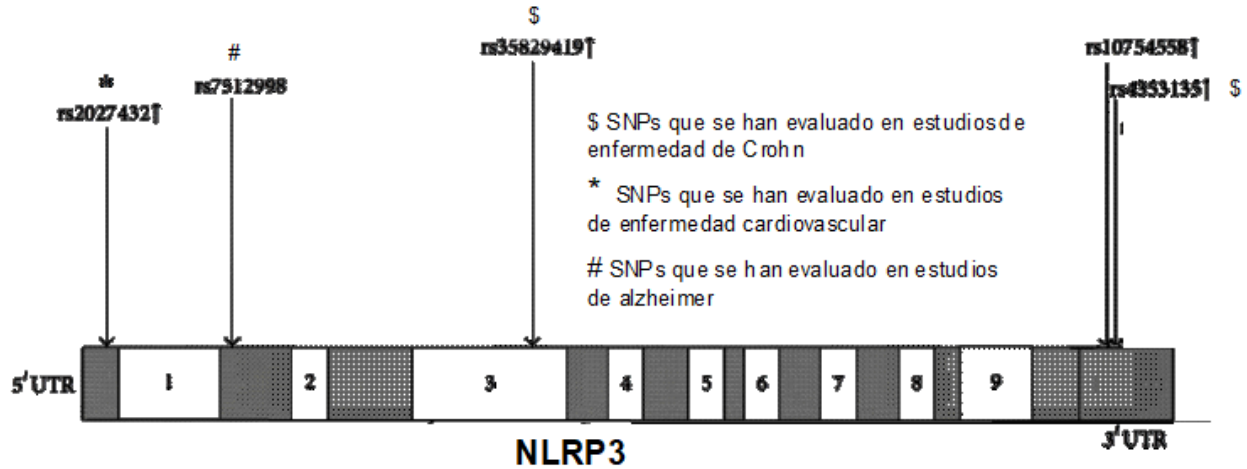


Fig 4. SNPs en *NLRP3* que se han evaluado en estudios de enfermedades inflamatorias. Modificada de [134]

4. Justificación

La obesidad y las complicaciones metabólicas que la acompañan son un problema de salud muy prevalente en México. Por ello, entender las bases moleculares de la obesidad y el desarrollo de las complicaciones es de gran importancia. Las complicaciones asociadas a la obesidad son generadas en gran medida por el estado inflamatorio crónico por el que cursa el organismo. Hay diversos receptores celulares que regulan el proceso inflamatorio, debido a que su activación promueve la producción de citocinas pro-inflamatorias. Entre ellos, NLRP3 es uno de los receptores más estudiados por ser un sensor de los cambios en la homeostasis del metabolismo, los cuales producen su activación. En modelos animales se ha mostrado la importancia del gen *Nlrp3* en la ganancia de peso, el desarrollo de alteraciones metabólicas y la modulación de la MI. Sin embargo, en humanos no hay estudios que hayan evaluado la participación de *NLRP3* en el desarrollo de las alteraciones antes descritas. Los estudios genéticos en humanos relacionados con *NLRP3*, solo se han dirigido a buscar asociación de polimorfismos en el gen con el riesgo de desarrollar enfermedades inflamatorias (Ej. enfermedad de Crohn y artritis reumatoide). A la fecha no hay estudios que hayan evaluado la asociación de polimorfismos en *NLRP3* con el desarrollo de obesidad o alteraciones metabólicas. Por lo tanto, el interés de este estudio es evaluar tanto en niños como en adultos si polimorfismos en el gen *NLRP3* producen efectos similares a los reportados en modelos animales, ya que se ha propuesto que las alteraciones asociadas a *NLRP3* pueden ser dependientes de la edad.

5. Planteamiento del problema.

Debido a que se ha mostrado que el inflamasoma de NLRP3 produce un efecto diferenciado dependiendo del estado nutricional del organismo, en el presente trabajo se realizó un estudio de casos y controles (sujetos normopeso vs sujetos obesos) con el fin de contrastar el efecto de variantes genéticas en *NLRP3*. Para lo cual, se evaluó la asociación de 18 variantes distribuidas a lo largo del gen con la presencia de obesidad y los rasgos del SM, tanto en una población infantil como en población de adultos, ya que se ha propuesto que la función del inflamasoma incrementa durante la edad adulta, en la cual hay una acumulación de moléculas activadoras del inflamasoma. Además, como se ha sugerido que el inflamasoma de NLRP3 tiene un efecto en la permeabilidad de la pared intestinal, se realizó un estudio piloto con 104 muestras de niños para evaluar si los LPS podrían ser un mecanismo mediante el cual se produce la activación de NLRP3 y por tanto el establecimiento de alteraciones metabólicas. En estas muestras también se evaluó si había cambios en la composición de alguna bacteria de la microbiota intestinal relacionados con las variantes de NLRP3 y los niveles circulantes de LPS.

6. Hipótesis

Los SNPs en *NLRP3* del inflammasoma se asocian a la obesidad, el SM y/o sus rasgos aumentando los niveles de LPS y alterando la composición de la microbiota intestinal.

7. Objetivo General

Evaluar la asociación de polimorfismos de un nucleótido ubicados en el gen *NLRP3* del inflammasoma con la obesidad, el SM y la disbiosis de la MI.

7.1 Objetivos particulares

- Valorar si los SNPs en el gen *NLRP3* están asociados con la obesidad, el SM o sus rasgos.
- Evaluar si los SNPs asociados modulan la expresión del gen *NLRP3*.
- Establecer si la concentración de LPS en suero se asocia con la obesidad, el SM o sus rasgos.
- Identificar si los LPS se asocian con los SNPs en *NLRP3* previamente asociados.
- Verificar si existen bacterias de la microbiota intestinal que se relacionen con los SNPs en *NLRP3* previamente asociados.
- Identificar bacterias de la microbiota intestinal que estén relacionadas con los niveles de LPS.

8. Métodos

8.1. Grupos de estudio

8.1.1 Fase de descubrimiento de variantes en el gen *NLRP3*.

Para la fase de descubrimiento se realizó un estudio de corte transversal, en el cual se incluyeron 1214 niños con edades entre seis y doce años, incluyendo 658 con normopeso ($pIMC \geq 15$ y ≤ 70) y 556 con obesidad ($pIMC \geq 95$). Los padres o tutores firmaron un consentimiento informado y los niños asintieron su participación en el estudio. Se excluyeron aquellos niños con enfermedades crónicas como diabetes tipo I.

8.1.2 Estudio de seguimiento a dos años

Para evaluar si los SNPs identificados en la fase de descubrimiento están asociados con complicaciones metabólicas futuras, se usó una cohorte longitudinal en la que se incluyeron niños con seguimiento a dos años, conformada por 109 niños normopeso y 89 niños obesos, los cuales mantuvieron su estado nutricional durante los dos años de seguimiento.

8.1.3 Réplica en población de adultos

Para la réplica de las asociaciones genéticas encontradas en el grupo de niños, se realizó un estudio transversal en 1083 adultos, incluyendo 494 sujetos normopeso ($18.5 \leq IMC \leq 24.9$) y 589 con obesidad ($IMC \geq 30$). No se incluyeron aquellos sujetos que presentaron alguna enfermedad que comprometiera el peso (Ej. infección por virus de inmunodeficiencia humana, enfermedades de la tiroides, cáncer) o que estuvieran bajo tratamiento farmacológico para bajar de peso. Los participantes en el estudio firmaron un consentimiento informado.

8.1.4 Estudio de composición de la microbiota intestinal y determinación de LPS.

Para el estudio de la composición de la MI y la determinación de LPS se seleccionaron 104 niños de la cohorte transversal que tenían muestra de materia fecal (54 niños con normopeso y 50 niños con obesidad), y que no presentaron diarrea o uso de antibióticos en los tres meses previos a la toma de muestra.

8.2. Parámetros antropométricos y bioquímicos.

Los parámetros antropométricos como peso, talla, y circunferencia de cintura, se midieron de acuerdo a las recomendaciones del manual de referencia de normalización antropométrica [135], con instrumentos estandarizados que cumplen los parámetros de calidad internacionales. La presión arterial fue medida con un esfigmomanómetro (BP 1 Basic, Microlife®), y la percentila de la presión diastólica y sistólica fue determinada en base a los datos del Programa de Educación Nacional de la Presión Sanguínea Elevada [136]. En el caso de los niños, la pIMC se calculó de acuerdo a las tablas del Centro para la Prevención y Control de Enfermedades [3], las cuales además del peso y la talla, toman en cuenta la edad y el sexo. Para los adultos se calculó el IMC con los datos de peso y talla, dividiendo el peso en kilogramos entre la talla en metros al cuadrado (kg/m^2). Los niños fueron clasificados como normopeso si se encontraban entre el percentil 15 y 75 del IMC y con obesidad si se encontraban en la percentila igual o mayor a 95. Los adultos se clasificaron como normopeso si se encontraban en un IMC entre 18.5 y 24.9, mientras que aquellos con obesidad presentaron IMC igual o mayor a 30.

Para las determinaciones de los parámetros bioquímicos, se realizó una toma de muestra de sangre periférica en ayuno, a partir de la cual se separó el suero, en el que se

midieron las concentraciones de HDLs, triglicéridos, colesterol, LDLs, glucosa, insulina, alanin aminotransferasa, aspartato aminotransferasa y proteína C reactiva,, con reactivos comerciales y procedimientos estandarizados (Boehringer-Mannheim). Todas las mediciones se llevaron a cabo en colaboración con el Departamento de Endocrinología y Metabolismo de Lípidos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán".

8.3 Definición del síndrome metabólico

Los individuos de nuestros grupos de estudio fueron clasificados de acuerdo a los cortes usados por de Ferranti (en niños) y por el ATP III (en adultos) para los rasgos del SM. La presencia de tres o más de los rasgos fue considerada como diagnóstico de SM [18, 20].

8.4 Cuantificación de lipopolisacárido.

La cuantificación de LPS fue realizada con el kit QCL 1000 (Lonza, Suiza), basado en una reacción enzimática con el lisado de *Limulus amebodyte*, cuyas enzimas en presencia de LPS llevan a cabo una reacción que produce color. Para la determinación se utilizó una curva estándar preparada con un stock de LPS de *E. coli* O111:B4 en un rango de 0.1 EU/mL a 1 EU/mL. Para cada muestra se usaron 50µL de suero los cuales se incubaron con la enzima y el sustrato, para que se produjera el color. Después se midió la absorbancia a 405nm en un espectrofotómetro con lector de placa (Epoch, Bio Tek), y la concentración de cada muestra se calculó por interpolación con los datos de la curva estándar. Las mediciones se realizaron por duplicado. Todos los materiales y reactivos utilizados para esta determinación fueron estériles y libres de endotoxinas.

8.5 Extracción de DNA

La extracción de DNA genómico se realizó a partir de 1mL de sangre periférica, con un kit comercial basado en el método de columnas en placa de 96 pozos (QIAmp® 96 DNA Blood Kit, Qiagen). La extracción de DNA bacteriano se realizó a partir de un fragmento de materia fecal de entre 0.18-0.22g. Para la cual también se usó un kit comercial basado en el método de columnas (QIAmp® DNA Stool Mini Kit, Qiagen). Ambas extracciones se realizaron de acuerdo al protocolo del fabricante.

8.6 Concentración y pureza del DNA

La concentración del DNA se determinó por espectrofotometría, midiendo la absorbancia a 260 nanómetros (nm). Para la pureza se midió la absorbancia a 280nm y a 230nm. Se buscó que la relación 260/280, se encontrara entre 1.8-2.0 lo que indica una baja presencia de proteínas. Además que la relación 260/230, se encontrara entre 1.5 y 2.0, lo cual fue indicativo de una baja presencia de sales. Todas las mediciones espectrofotométricas fueron realizadas en el equipo Nanodrop 2000c (Thermo Scientific®).

8.7 Genotipificación

Para la cohorte transversal de niños, a partir del DNA que se extrajo de sangre total, se hizo un escaneo del genoma completo con el microarreglo multiétnico de genotipificación (MEGA, por sus siglas en inglés, Illumina), del cual se eligieron 28 polimorfismos que se encontraban en la región del gen *NLRP3*. Se descartaron 4 SNPs por tener una frecuencia del alelo menor < 0.1. Además, se descartaron 6 SNPs que se encontraban en bloques con desequilibrio de ligamiento con una $r^2 > 0.8$ (Haploview), seleccionándose solo un SNP del bloque. Después de aplicar los filtros se incluyeron 18 SNPs con los cuales se hicieron los análisis de asociación (Fig. 5).

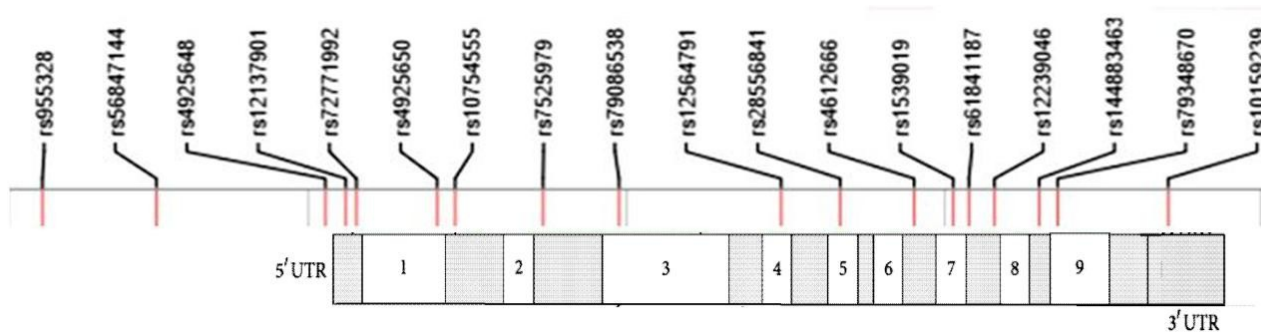


Fig. 5. Distribución de SNPs a lo largo del gen *NLRP3*.

Para la cohorte longitudinal infantil, se genotificaron los SNPs rs12137901 y rs72771992 por PCR en tiempo real (Light Cycler 480, Roche) con sondas Taqman (Applied Biosystems). Estos SNPs se asociaron en la fase de descubrimiento de este estudio con el SM y/o con alguno de los rasgos que lo componen. Además, estos SNPs fueron analizados en la población adulta (microarreglo MEGA, Illumina).

8.8 Ajuste por mezcla étnica.

Los resultados de la asociación fueron ajustados por mezcla étnica con 2 componentes obtenidos por escalado multidimensional. Para este análisis se utilizaron 1,008,875 SNP (microarreglo MEGA, Illumina), que estuvieron disponibles para la población de estudio y las tres poblaciones parentales que contribuyen al mestizaje en los mexicanos (nativos americanos, europeos y africanos) [137]. Finalmente, el análisis de escalado multidimensional fue realizado a través de una matriz de semejanza genotípica, de la cual se obtuvieron los dos primeros componentes [138].

8.9 Cuantificación relativa del RNA mensajero (mRNA) de *NLRP3*

El RNA total se extrajo de leucocitos mediante TRIzol (invitrogen), siguiendo el protocolo del fabricante. El RNA fue tratado con DNasa I recombinante (Roche). Se usaron 1000ng de RNA total para la síntesis de DNA complementario (cDNA), usando los reactivos del kit

TaqMan Reverse Transcription (Applied Biosystems). La cuantificación relativa del mRNA de *NLRP3* y del gen constitutivo *HPRT* se realizó mediante PCR en tiempo real (QuantoStudio 7 Flex, Applied Biosystems) usando 1 μ L de cDNA y sondas Taqman (Roche) con primers específicos para cada gen, diseñados con el programa del centro de diseño de ensayos de la librería universal de sondas (https://lifescience.roche.com/en_mx/brands/universal-probe-library.html). Las sondas utilizadas y los oligonucleótidos se presentan en el anexo 1.

8.10 Cuantificación de la proteína NLRP3 mediante inmunoblot tipo Western.

Se extrajo proteína total a partir de 300 μ L de capa leucocitaria de cada muestra, con buffer de análisis de radio inmunoprecipitación (RIPA; radioimmunoprecipitation assay) al cual se le adicionaron inhibidores de proteasas (Complete mini, Roche). Una vez que se extrajeron las proteínas, se cuantificaron por el método de Lowry con reactivos comerciales (Bio-Rad). Se cargaron 40 μ g de proteínas totales en geles de poliacrilamida al 8% en condiciones desnaturizantes. Posteriormente las proteínas fueron transferidas a membranas de fluoruro de polivinilideno (GE, Healthcare Life Sciences). Después de la transferencia las membranas fueron bloqueadas con leche libre de grasa al 5% (Blotting-Grade Blocker, Biorad) por 3 horas a temperatura ambiente, e incubadas toda la noche con los anticuerpos que se enlistan en el anexo 1. Finalmente las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario marcado con peroxidasa de rábano por una hora y se revelaron con un reactivo quimiolumincente (Chemiluminescent HRP Substrate- ECL, Millipore). La quimioluminiscencia fue medida en el equipo Gel Doc XR (Bio-Rad) y el análisis de la densidad de la banda en el programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

8.11 Clasificación taxonómica de la Microbiota intestinal.

El DNA bacteriano fue extraído de la materia fecal de un subgrupo de 104 niños de la cohorte transversal; 53 niños normopeso y 51 niños obesos. Posteriormente se amplificó la región V4 del gen 16S ribosomal con los primers 515F y 806R (anexo 1), de acuerdo al protocolo propuesto por el Proyecto del Microbioma de la Tierra [139]. La PCR se llevó a cabo con 100ng de DNA bacteriano, y los amplicones fueron purificados con perlas magnéticas (Agencourt AMPure XP, Beckman Coulter). La concentración de los amplicones purificados fue determinada por fluorescencia con el kit dsDNA HS Assay, en el equipo Qubit (Thermo Fisher Scientific). Se usaron concentraciones equimolares de cada muestra para formar una mezcla final que posteriormente se secuenció con el kit MiSeq® Reagent v3 (150 ciclos) en el equipo MiSeq (Illumina). De manera breve, la mezcla final se coloca en un soporte que tiene anclados adaptadores complementarios a los amplicones, con el fin de llevar a cabo una PCR y generar copias de los amplicones. Posteriormente se lleva a cabo la secuenciación, añadiendo bases nitrogenadas modificadas, las cuales al ser añadidas a la cadena de DNA emiten diferente tipo de fluorescencia, lo cual permite identificar la base que se añadió. A partir de los resultados de la secuenciación, se realizó la clasificación taxonómica por referencia abierta por medio del programa QIIME v.1.9.0, con un porcentaje de identidad del 97%, tomando como referencia la base de datos de Greengenes v.13.8. Para la evaluación de la microbiota intestinal se tomó en cuenta que la abundancia relativa de una unidad taxonomica operacional (OTU, por sus siglas en inglés) representara al menos el 0.1% y que estuviera presente al menos en el 10% de los sujetos analizados. En promedio se obtuvieron 110,995 secuencias (43,252-198,475) por muestra, las cuales generaron 510 OTUs que corresponden 5 phyla, 20 familias, 33 géneros y 42 especies, con las cuales se hicieron los análisis posteriores (Anexo 4).

8.12 Análisis estadístico.

Se utilizaron pruebas de *t de Student* para variables continuas que presentaron distribución normal, y la prueba de Chi-cuadrada para variables categóricas nominales. Para aquellas variables que no presentaron distribución normal, se usaron pruebas no paramétricas (U de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis).

Para los análisis de asociación se utilizó regresión logística multinomial, usando como variable dependiente la presencia de obesidad, de SM o de los rasgos que lo componen, y como variable independiente el SNP de interés. Estos análisis estuvieron ajustados por edad, sexo, pIMC o IMC y mezcla étnica.

Para los análisis de la MI, se comparó la distribución de la abundancia de cada OTU de acuerdo a la presencia de obesidad, SM o de los rasgos que lo componen mediante pruebas no paramétricas (U de Mann-Whitney). Para la comparación de la distribución de la abundancia de cada OTU por genotipo, se usó la prueba de Kruskal-Wallis. Para los análisis de asociación genética y de la microbiota intestinal se usó corrección por múltiples comparaciones, por medio del índice de falsos descubrimientos (FDR, por sus siglas en inglés), con P significativa < 0.05 . Las correlaciones se llevaron a cabo por medio de la prueba de correlación de *Spearman*. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS v.22 (IBM).

9. Resultados.

9.1 Características antropométricas y bioquímicas de la cohorte transversal de niños.

En la fase de descubrimiento se incluyeron 658 niños normopeso y 556 con obesidad (Tabla 3), los cuales no se encuentran pareados por edad ni sexo. De estos, los niños con obesidad presentaron un porcentaje significativamente menor de mujeres y aunque ambos grupos tienen una media de edad muy similar, en los análisis estadísticos se ajustó por edad y sexo para eliminar posibles confusores. Los niños con obesidad, presentaron niveles más altos de todos los parámetros bioquímicos, exceptuando las HDLs, las cuales en los niños obesos fueron menores. De manera interesante, en los casos la media del índice de resistencia a la insulina (HOMA-IR) se encuentra arriba del corte de 2.5, propuesto como indicativo de RI [140]. Así mismo la proteína C reactiva se encuentra elevada, lo cual podría indicar un proceso inflamatorio crónico en los niños con obesidad.

Tabla 3. Características antropométricas y bioquímicas

Parámetro	Delgados (n= 658)	Obesos (n= 556)	P
M%	50.5	38.5	< 0.001
Edad (años)	9.14±1.92	9.35±1.79	0.084
pIMC	45.29±16.47	97.41±1.29	< 0.001
Glucosa (mg/dL)	89.75±8.21	91.48±7.85	< 0.001
Triglicéridos (mg/dL)	85.13±44.32	146.90±77.74	< 0.001
Colesterol (mg/dL)	166.45±28.88	178.67±32.78	< 0.001
HDL (mg/dL)	51.74±11.38	42.55±10.06	< 0.001
LDL (mg/dL)	98.12±23.84	107.41±25.54	< 0.001
Percentila Presión arterial sistólica (mmHg)	36.08±24.53	57.38±24.01	< 0.001
Percentila Presión arterial diastólica (mmHg)	60.87±24.53	65.49±9.46	< 0.001
ALT (U/L)	19.70±12.01	33.57±22.75	< 0.001
AST (U/L)	29.90±8.39	33.02±11.88	< 0.01
Insulina (µU/mL)	5.35±4.57	12.56±9.46	< 0.001
HOMA-IR	1.23±1.01	2.86±2.26	< 0.001
Proteína C reactiva (mg/dL)	0.13±0.41	0.35±0.55	< 0.001

Los datos se presentan como la media con la desviación estándar o el porcentaje.

M%= Porcentaje de mujeres; HDL= Lipoproteínas de alta densidad; LDL= Lipoproteínas de baja densidad; ALT= Alanin aminotransferasa; AST= Aspartato aminotransferasa; HOMA= Índice de resistencia a la insulina
Prueba estadística: *t de Student*; P< 0.05.

9.2 Presencia de síndrome metabólico y sus rasgos en la población de estudio.

Debido a que el SM está conformado por diversos rasgos, y algunos de estos son más prevalentes, se calculó el porcentaje de niños que presentaban SM y los rasgos que lo conforman en los casos y controles (Tabla 4). En los niños normopeso el SM es muy poco prevalente, ya que solo 5.2% de estos niños lo presentan. Por el contrario, 60.9% de los niños con obesidad presentaron SM. De manera interesante, a pesar de que el SM es poco frecuente en los niños normopeso, rasgos como la HTG y las HDLs disminuidas son frecuentes (29.2% y 44.4%, respectivamente). De la misma manera, estos dos rasgos también son los más frecuentes en los niños con obesidad (70.4% y 78.9%, respectivamente).

Tabla 4. Prevalencia del síndrome metabólico y sus rasgos

Parámetro o rasgo	Delgados (n= 658)	Obesos (n= 556)	P
Síndrome metabólico	34 (5.2%)	332 (60.9%)	<0.001
pCircunferencia de cintura > p75	22 (3.4%)	451 (81.4%)	<0.001
Glucosa > 110mg/dL	9 (1.4%)	17 (3.1%)	0.05
Triglicéridos > 100mg/dL	192 (29.2%)	390 (70.4%)	<0.001
HDL < 50mg/dL	292 (44.4%)	437 (78.9%)	<0.001
pPAS> p90	11 (1.7%)	68 (12.4%)	<0.001
pPAD> p90	67 (10.2)	91 (16.4%)	0.001

Los datos se presentan como el número de individuos que presentan síndrome metabólico o alguno de los rasgos y el porcentaje que representan del grupo que conforman.

HDL= Lipoproteína de alta densidad; pPAS= percentila de la presión arterial sistólica; pPAD= percentila de la presión arterial diastólica.

Prueba estadística χ^2 para variables categóricas; P<0.05

9.3 Asociación de los SNPs en *NLRP3* con la obesidad.

Los estudios en modelos murinos alimentados con dieta alta en grasa han mostrado que la deficiencia del gen *Nlrp3* tiene un efecto positivo para el animal, disminuyendo la ganancia de peso y mejorando los parámetros metabólicos [57.58]. Por ello, en este estudio se evaluó la

asociación de 18 variantes del gen *NLRP3* con la obesidad y/o alteraciones metabólicas. Sin embargo, de los 18 SNPs analizados, ninguno mostró asociación significativa con la obesidad (Tabla 5).

Tabla 5. Análisis de asociación de los SNPs en *NLRP3* con la obesidad

Gen	SNP	Alelos	FAM _{niños}	FAM _{1000 genomes}	RM	IC (95%)	P
<i>NLRP3</i>	rs955328	C/T	0.28	0.26	0.930	0.777-1.114	0.431
	rs56847144	C/T	0.23	0.33	1.001	0.826-1.213	0.994
	rs4925648	C/T	0.28	0.17	1.104	0.916-1.331	0.299
	rs12137901	C/T	0.34	0.29	1.045	0.878-1.242	0.621
	rs72771992	G/T	0.16	0.08	0.929	0.747-1.155	0.505
	rs10754555	C/G	0.40	0.44	1.016	0.863-1.197	0.845
	rs200927356	A/C/G	0.38	-	1.031	0.872-1.220	0.718
	rs28556841	A/G	0.26	0.14	1.113	0.923-1.342	0.263
	rs4612666	C/T	0.40	0.41	1.007	0.854-1.189	0.930
	rs1539019	G/T	0.25	0.35	0.873	0.725-1.052	0.154
	rs61841187	C/T	0.16	0.07	0.985	0.792-1.224	0.892
	rs144883463	C/T	0.11	0.01	1.041	0.802-1.351	0.762
	rs79348670	C/T	0.15	0.03	1.038	0.825-1.305	0.750
	rs10157379	C/T	0.39	0.38	0.881	0.747-1.039	0.133
	rs10159239	A/G	0.30	0.40	0.929	0.777-1.111	0.419
	rs10754558	C/G	0.15	0.35	0.874	0.695-1.099	0.248
	rs10925027	C/T	0.43	0.49	0.774	0.976-0.828	0.774
	rs12070953	C/T	0.14	0.11	1.190	0.936-1.513	0.155

RM= Razón de momios; IC= Intervalo de confianza; FAM= Frecuencia del alelo menor

Prueba estadística: Regresión logística multinomial ajustada por edad sexo y mezcla étnica; p< 0.05

9.4 Asociación de los SNPs en *NLRP3* con el síndrome metabólico.

Una vez que se probó que las variantes en *NLRP3* no se asociaban con la obesidad, se analizó si había asociación con el SM, considerando que *NLRP3* es un receptor que se activa por alteraciones en la homeostasis metabólica, las cuales son muy comunes en la obesidad (Tabla 6). El análisis de asociación en la población conjunta (casos y controles), mostró que dos SNPs se asociaron con un incremento en el riesgo de presentar SM (rs72771992 y rs79348670; $P= 0.004$, $P= 0.035$ respectivamente). El análisis estratificado en niños con obesidad y normopeso, mostró que el SNP rs72771992 se asocia en ambos grupos con un

incremento en el riesgo de tener SM ($P=0.001$ y $P=0.013$). Por otro lado, en los niños normopeso los SNPs rs29348670 y rs10925027 se asocian con un incremento en el riesgo de presentar SM ($P= 0.016$ y $P=0.033$, respectivamente). Mientras que en los niños con obesidad, el SNP rs12137901 y rs4612666 se asociaron con una disminución del riesgo de presentar SM ($P=0.044$ y $P= 0.045$, respectivamente). Al ajustar los análisis por FDR, las asociaciones perdieron significancia. Sin embargo, se tomaron aquellos 5 SNPs que tuvieron significancia estadística antes del ajuste en la población conjunta o bien en casos o controles, con el fin de hacer los análisis de asociación con los rasgos del SM (Tabla 6).

9.4.1 Análisis de asociación de los SNPs en *NLRP3* con los rasgos del síndrome metabólico.

Algunos rasgos del SM son los más prevalentes en la población de estudio, por lo tanto, se probó si los SNPs asociados al SM ya fuese en la población completa o en casos y controles, estaban asociados con alguno de estos rasgos (Anexo 2). Al evaluar la asociación en la población completa no se encontró ninguna asociación significativa con los rasgos del SM. Sin embargo, al analizar por casos y controles, en los niños con obesidad los SNPs rs72771992, rs29348670 y rs10925027 se asociaron con un aumento en el riesgo de presentar niveles bajos de HDLs ($P= 0.002$, $P=0.025$, $P= 0.038$ respectivamente). Por otro lado, los SNPs rs12137901, rs4612666 y rs10925027 se asociaron con una disminución del riesgo de tener HTG ($P= 0.006$, $P= 0.044$, $P= 0.032$, respectivamente). De manera interesante, el SNP rs12137901 se asoció con un aumento en el riesgo de tener HTG en los niños normopeso ($P= 0.016$; Fig. 6).

Al ajustar las asociaciones por FDR, solo permanecieron significativas las

asociaciones del SNP rs72771992 con los niveles disminuidos de HDLs ($P_{FDR}= 0.01$) y la asociación del rs12137901 con la HTG en los niños con obesidad ($P_{FDR}= 0.03$). Para los análisis posteriores se eligieron estos SNPs, debido a que se ubican en una región reguladora del gen *NLRP3*, por lo que podrían modificar la expresión de este gen.

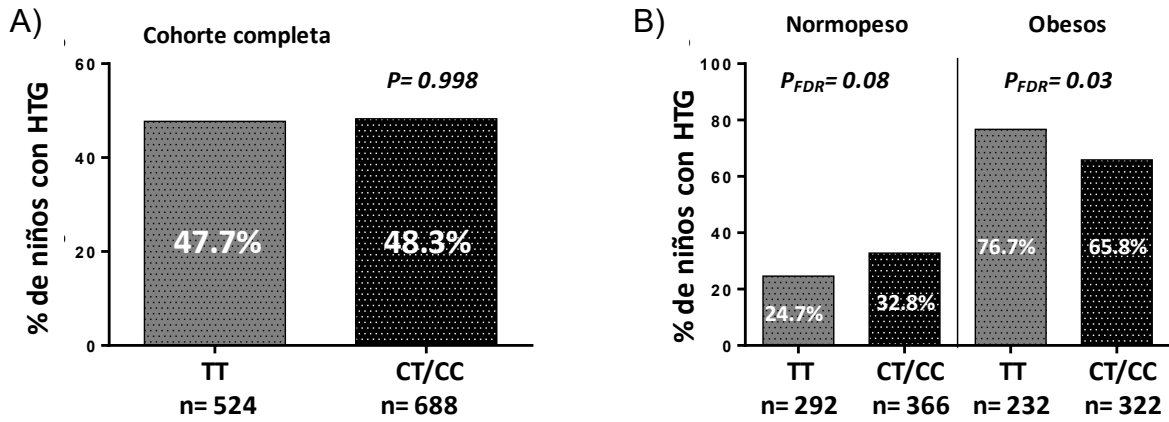


Fig 6. Asociación del SNP rs12137901 con la HTG en niños. A) en la cohorte transversal de niños conjunta, B) en los niños normopeso y obesos. Se muestra el porcentaje de niños por arriba del corte de triglicéridos elevados ($Tg > 100\text{mg/dL}$), con el modelo dominante. Prueba estadística: Regresión logística multinomial, ajustada por edad, sexo, pIMC, y mezcla étnica.

Tabla 6. Análisis de asociación de los SNPs en *NLRP3* con el síndrome metabólico

Gen	SNP	Alelos	Cohorte completa n= 1,214			Niños delgados n=658			Niños obesos n= 556		
			RM	IC (95%)	P	RM	IC (95%)	P	RM	IC (95%)	P
<i>NLRP3</i>	rs955328	C/T	1.065	0.832-1.364	0.616	0.768	0.381-1.550	0.768	1.257	0.875-1.806	0.215
	rs56847144	C/T	0.961	0.746-1.238	0.759	0.683	0.325-1.432	0.312	1.014	0.702-1.465	0.940
	rs4925648	C/T	0.975	0.760-1.249	0.838	1.526	0.757-3.073	0.237	0.785	0.547-1.126	0.188
	rs12137901	C/T	0.919	0.715-1.178	0.503	1.514	0.735-3.118	0.261	0.685	0.474-0.990	0.044
	rs72771992	G/T	1.489	1.139-1.946	0.004	3.106	1.543-6.250	0.001	1.684	1.115-2.543	0.013
	rs10754555	C/G	0.919	0.711-1.187	0.517	1.631	0.746-3.565	0.220	0.698	0.477-1.024	0.066
	rs200927356	A/C/G	1.057	0.821-1.361	0.665	0.585	0.290-1.179	0.134	1.121	0.777-1.616	0.541
	rs28556841	A/G	0.927	0.722-1.190	0.552	1.283	0.638-2.580	0.484	0.709	0.493-1.021	0.065
	rs4612666	C/T	0.780	0.604-1.006	0.056	0.683	0.339-1.376	0.286	0.676	0.461-0.991	0.045
	rs1539019	G/T	0.911	0.740-1.215	0.674	1.213	0.604-2.435	0.587	0.912	0.632-1.316	0.621
	rs61841187	C/T	0.873	0.662-1.150	0.334	0.867	0.395-1.902	0.722	0.824	0.552-1.229	0.342
	rs144883463	C/T	1.009	0.746-1.365	0.953	0.357	0.107-1.189	0.094	1.156	0.746-1.793	0.516
	rs79348670	C/T	1.340	1.021-1.759	0.035	2.378	1.172-4.826	0.016	1.260	0.843-1.883	0.260
	rs10157379	C/T	1.076	0.833-1.389	0.576	1.720	0.787-3.758	0.174	1.106	0.766-1.596	0.593
	rs10159239	A/G	0.965	0.766-1.216	0.761	1.697	0.816-3.527	0.157	1.185	0.827-1.699	0.354
	rs10754558	C/G	0.971	0.732-1.289	0.841	1.022	0.470-2.224	0.955	1.003	0.660-1.523	0.989
	rs10925027	C/T	0.932	0.716-1.212	0.597	2.861	1.086-7.538	0.033	0.706	0.477-1.045	0.082
	rs12070953	C/T	0.949	0.740-1.216	0.949	1.311	0.653-2.632	0.447	0.766	0.514-1.141	0.189

Los datos muestran el resultado del análisis de asociación con el modelo dominante

RM= Razón de momios; IC= Intervalo de confianza

Prueba estadística: Regresión logística multinomial ajustada por pIMC, edad, sexo, y ancestría; p< 0.05

9.5 Réplica de los SNPs rs12137901 y rs72771992 en la población de adultos.

Se buscó replicar la asociación de los SNPs rs12137901 y rs72771992, previamente asociados con el SM y sus rasgos, en una población de adultos. Esta población estuvo conformada por 494 adultos normopeso y 589 con obesidad. En la población conjunta, el alelo menor del SNP rs12137901 se asoció con un riesgo mayor de HTG ($P=0.027$). Sin embargo, el análisis estratificado por el estado nutricional, presentó asociación significativa con mayor riesgo de HTG en los adultos con normopeso (RM= 1.791; $P= 0.006$, Fig. 7), pero no en los adultos con obesidad (RM= 1.100; $P= 0.582$, Fig. 5). El análisis combinado de niños y adultos con normopeso mostró que el alelo menos frecuente "C" se asocia con un mayor riesgo de HTG (RM: 1.704, $P= 0.0005$).

En contraste, el SNP rs72771992 no presentó asociación significativa con los niveles disminuidos de HDLs como se había mostrado en los niños (Anexo 3).

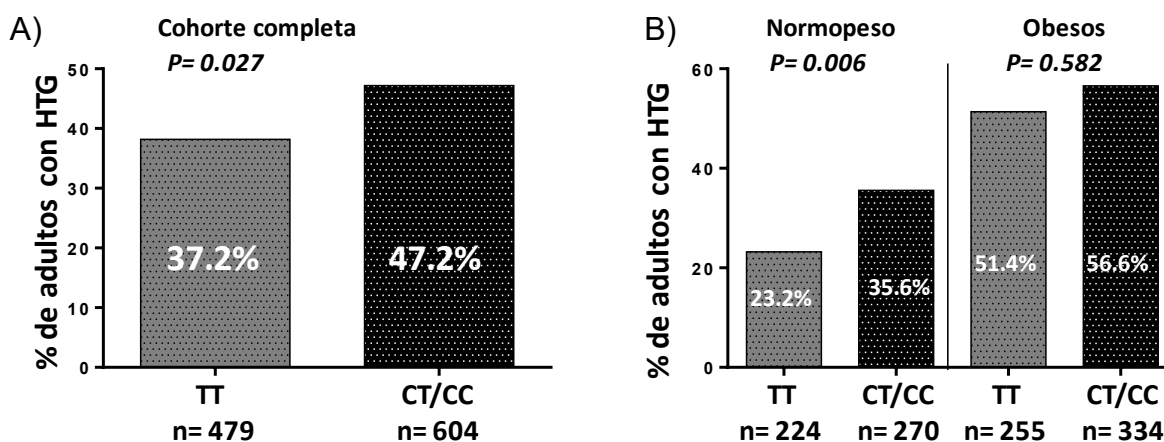


Fig 7. Asociación del SNP rs12137901 con los triglicéridos elevados en la cohorte transversal de adultos. A) Población completa, B) adultos normopeso y obesos. Se muestra el porcentaje de adultos con HTG (Tg > 150mg/dL), por cada genotipo. Prueba estadística: Regresión logística multinomial, ajustada por edad, sexo, IMC, y mezcla étnica.

9.6 Asociación de los SNPs rs12137901 y rs72771992 con el desarrollo de complicaciones metabólicas futuras.

Para evaluar si los SNPs rs12137901 y rs72771992 son predictores de HTG y de niveles disminuidos de HDLs en la población infantil, se analizaron 113 niños con niveles normales de triglicéridos al inicio del estudio (T_0), de los cuales 33 presentaron HTG (triglicéridos >100mg/dL) a dos años de seguimiento (T_1). Se encontró que en la población completa el alelo menor está asociado con un aumento en el riesgo de tener HTG a los dos años, (RM= 2.056, $P= 0.029$). Al separar la población, tanto en casos como en controles se ve la misma tendencia que en la población completa, pero no tiene significancia estadística, posiblemente debido al tamaño de la muestra (Tabla 7). Además para corroborar que el SNP rs12137901 se asociaba con la HTG futura, se utilizaron cortes para HTG de triglicéridos >130mg/dL y >150mg/dL, que se han usado para definirla en otros estudios [141, 142]. Como se mostró con el corte de 100mg/dL el alelo "C" del SNP se asoció con el aumento en el riesgo de presentar HTG a los dos años independientemente del corte utilizado ($P= 0.023$ y $P= 0.007$, respectivamente). Sin embargo, al estratificar por estado nutricional no se encontraron asociaciones significativas (Tabla 7).

En el caso del SNP rs72771992, se analizaron 86 niños que presentaron HDLs normales al inicio del estudio, de los cuales 22 tuvieron niveles de HDLs disminuidos (HDLs > 50mg/dL) a los 2 años. Al hacer el análisis en la población completa, el alelo menor del SNP no estuvo asociado con la disminución de las HDLs a los 2 años ($P= 0.698$), lo cual también se observó al estratificar por casos y controles ($P= 0.212$; $P=0.275$, respectivamente; Tabla 7).

9.7 Efecto del SNP rs12137901 sobre la expresión del gen *NLRP3*.

Debido a que se desconoce si el SNP rs12137901, ubicado en una región intrónica en el extremo 5' del gen *NLRP3*, tiene un efecto funcional sobre la expresión de este gen, se evaluó la asociación de los genotipos de este SNP con la expresión de *NLRP3* en leucocitos de sangre periférica (ya que no se contaba con biopsia de tejido adiposo), no observándose diferencias significativas en ninguno de los grupos de estudio (Fig. 8). Aunque no se descarta que se puedan observar diferencias en la expresión de *NLRP3* en el tejido adiposo, en el que el gen tiene gran relevancia.

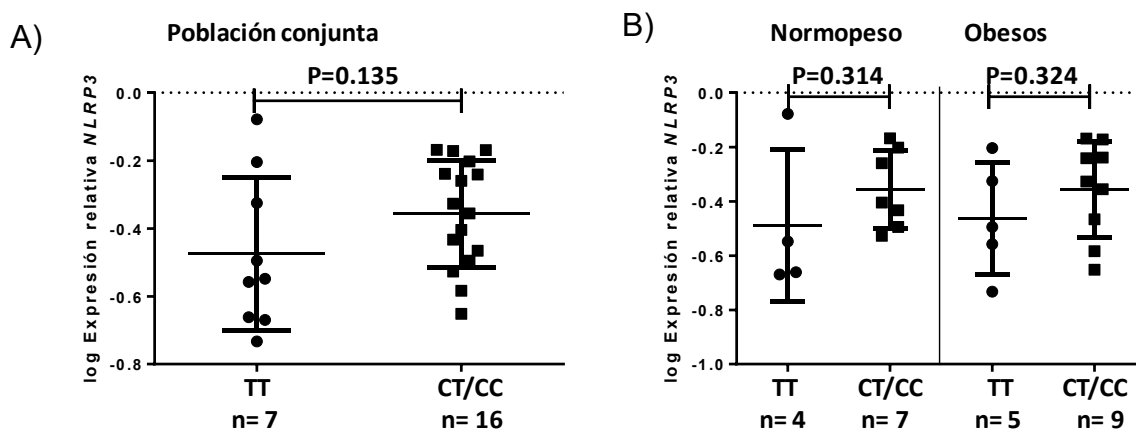


Fig 8. Efecto de los genotipos del SNP rs12137901 sobre la expresión del gen *NLRP3*. (A) Expresión relativa para los genotipos del SNP rs12137901 en la muestra completa. (B) Expresión relativa para los genotipos del SNP rs12137901 para delgados y obesos. Se grafica la media \pm desviación estándar. Se usó la prueba de ANOVA para la comparación estadística entre genotipos, P significativa < 0.05

Además, se analizó si la expresión de *NLRP3* correlacionaba con los niveles de triglicéridos, que es el rasgo principal con el que se había asociado el SNP rs12137901, no encontrándose correlación significativa entre la expresión de *NLRP3* y los niveles de triglicéridos (Fig. 9).

Tabla 7. Asociación de SNPs con complicaciones metabólicas futuras

SNP	Corte	Alelo	Cohorte completa n= 113				Delgados n= 82				Obesos n= 31			
			%niños con HTG	RM	IC (95%)	P	%niños con HTG	RM	IC (95%)	P	%niños con HTG	RM	IC (95%)	P
rs12137901	Tg > 100mg/dL		29.2	2.056	1.076-3.926	0.029	22.0	1.424	0.623-3.257	0.402	48.4	7.613	0.761-76.206	0.084
	Tg > 130mg/dL	C/T	14.3	3.055	1.167-7.995	0.023	9.7	3.008	0.851-10.633	0.087	27.3	2.442	0.377-15.803	0.349
	Tg > 150mg/dL		11.2	5.225	1.572-17.370	0.007	6.0	7.863	0.304-20.313	0.124	22.7	4.912	0.214-112.757	0.319
rs72771992	HDLs < 50mg/dL	G/T	25.6	0.771	0.210-2.831	0.771	19.4	1.685	0.023-2.928	0.275	41.7	5.115	0.393-66.553	0.212

Los datos muestran el resultado del análisis de asociación con el modelo Dominante

RM= Razón de momios; IC= Intervalo de confianza

Prueba estadística: Regresión logística multinomial ajustada por Δ pIMC, Δ edad, sexo, y semejanza genética; P < 0.05

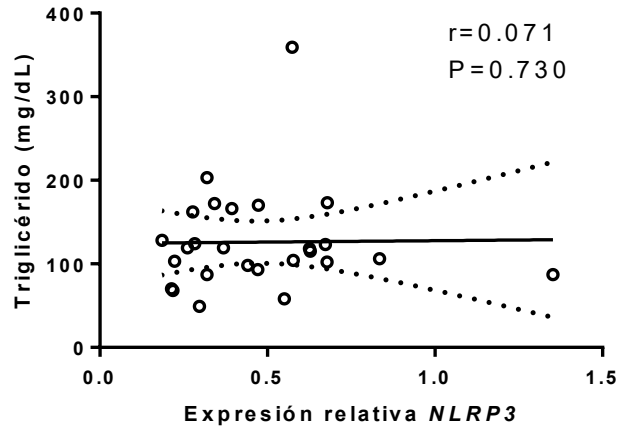
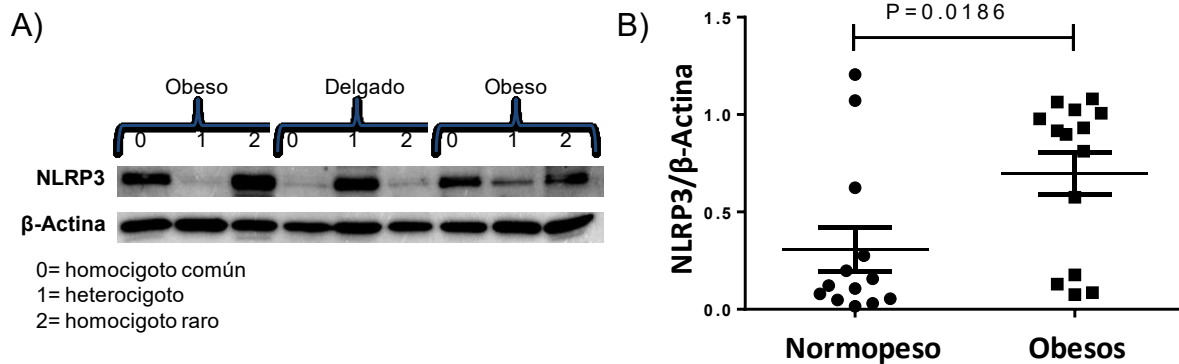


Fig. 9. Correlación de los niveles de triglicéridos plasmáticos con la expresión del gen *NLRP3*. Prueba estadística: Correlación de *Spearman*, *P* significativa < 0.05.

9.8 Relación de los genotipos del SNP rs12137901 con la concentración de proteína *NLRP3*.

Se determinó la concentración de proteína *NLRP3* en leucocitos de sangre periférica por inmunoblot tipo western, en 27 muestras de la población de niños (13 niños normopeso y 14 niños obesos), seleccionados de acuerdo a los genotipos del SNP rs12137901. De manera interesante los niños con obesidad presentaron una concentración de la proteína *NLRP3* significativamente más alta que los niños con normopeso (Fig. 10). Sin embargo, al analizar de acuerdo a los genotipos, no presentaron diferencias significativas en la población completa y estratificando por estado nutricional.



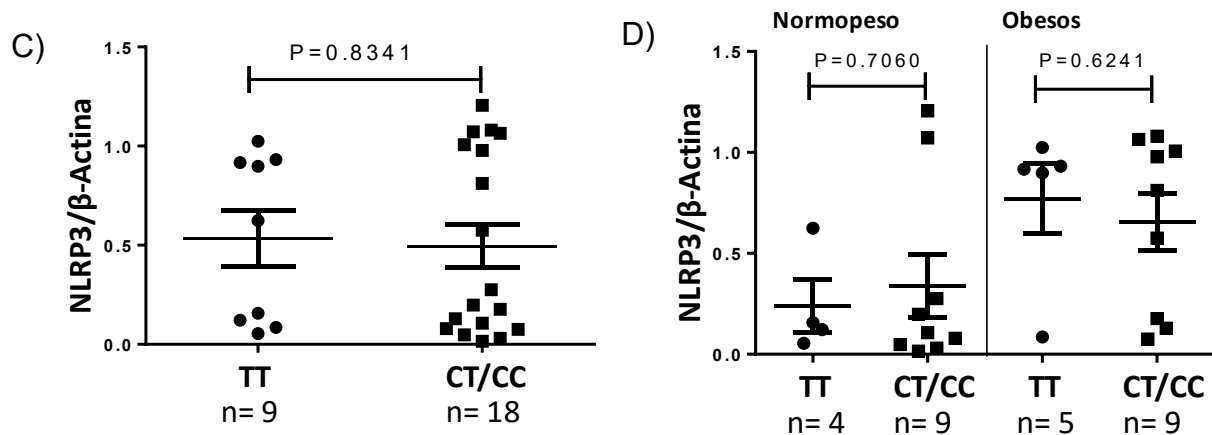


Fig. 10. Efecto del estado nutricional y de los genotipos del SNP rs12137901 sobre los niveles de proteína NLRP3. (A) Hibridación tipo western para NLRP3 y β -Actina (constitutivo), por estado nutricional y genotipo. (B) Comparación de los niveles de NLRP3 por estado nutricional. (C) Comparación de los niveles de NLRP3 en los niños con y sin el alelo "C" del SNP rs12137901. (D) Comparación de los niveles de NLRP3 en los niños con y sin el alelo "C" del SNP rs12137901 estratificados de acuerdo al estado nutricional. Prueba estadística *t de Student*. *P* significativa < 0.05.

Al comparar la concentración de NLRP3 entre niños con y sin HTG, no se encontró diferencia significativa (Fig. 11). Al hacer la comparación estratificando por casos y controles, solo se pudo analizar en niños con normopeso, debido al número reducido de niños con obesidad y sin HTG (Fig. 11).

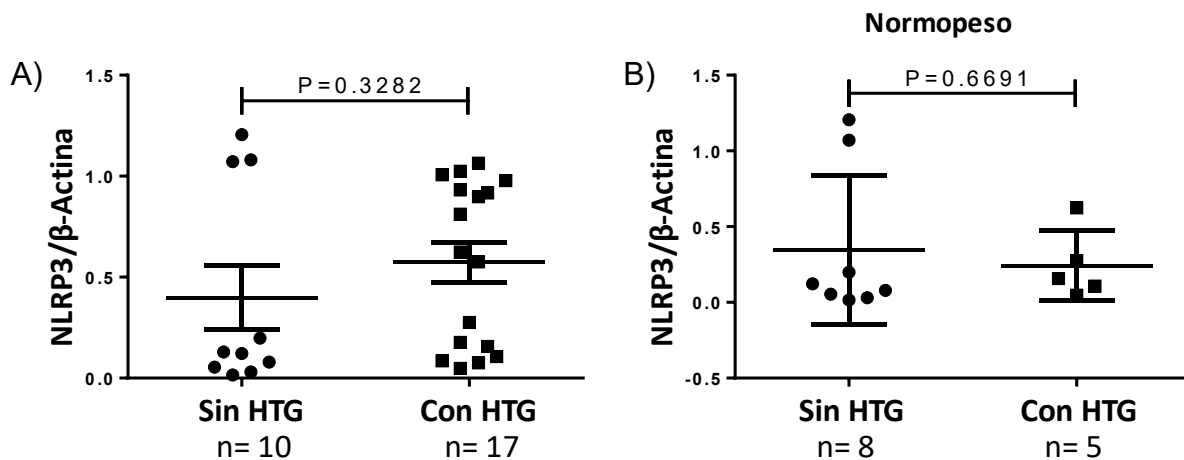


Fig. 11. Comparación de la concentración de la proteína NLRP3 en niños con y sin HTG. (A) Comparación de la concentración de la proteína NLRP3 en niños con y sin HTG en la muestra completa (B) Comparación de los niveles de NLRP3 en niños normopeso con y sin HTG. Prueba estadística *t de Student*. *P* significativa < 0.05

9.9 Los LPS como desencadenante de las alteraciones metabólicas.

Se determinaron los niveles de LPS en 53 niños con normopeso y 51 niños con obesidad, sin observarse diferencias significativas entre estos grupos ($P= 0.435$). Sin embargo, la concentración de LPS correlacionó positiva y significativamente con los niveles de glucosa, triglicéridos y colesterol (Tabla 8). Las correlaciones con los niveles de glucosa y triglicéridos se mantuvieron al analizar estratificando en controles ($r= 0.317$, $P= 0.025$; $r= 0.322$ $P=0.023$, respectivamente) y casos ($r= 0.301$, $P= 0.038$; $r= 0.479$ $P=0.001$, respectivamente).

Tabla 8. Correlación de los niveles de LPS con los parámetros bioquímicos

Parámetro	n	Coefficiente de correlación	P
Glucosa (mg/dL)	99	0.311	0.002
Triglicéridos (mg/dL)	99	0.404	0.00003
Colesterol (mg/dL)	99	0.196	0.049
HDL (mg/dL)	99	-0.105	0.296
LDL (mg/dL)	96	0.100	0.328
ALT (U/L)	99	0.123	0.219
AST (U/L)	99	0.080	0.425
Insulina (μ U/mL)	97	0.013	0.900
HOMA-IR	97	0.038	0.705
Proteína C reactiva (mg/dL)	99	-0.053	0.602

Prueba estadística: Correlación de Spearman, ajustada por edad, sexo y pIMC
P significativa < 0.05.

Además, los niños con HTG presentaron concentraciones más altas de LPS comparados con los niños sin HTG. Sin embargo, el análisis separado en controles y casos, presentó niveles de LPS más altos en los niños con obesidad e HTG (Fig.12).

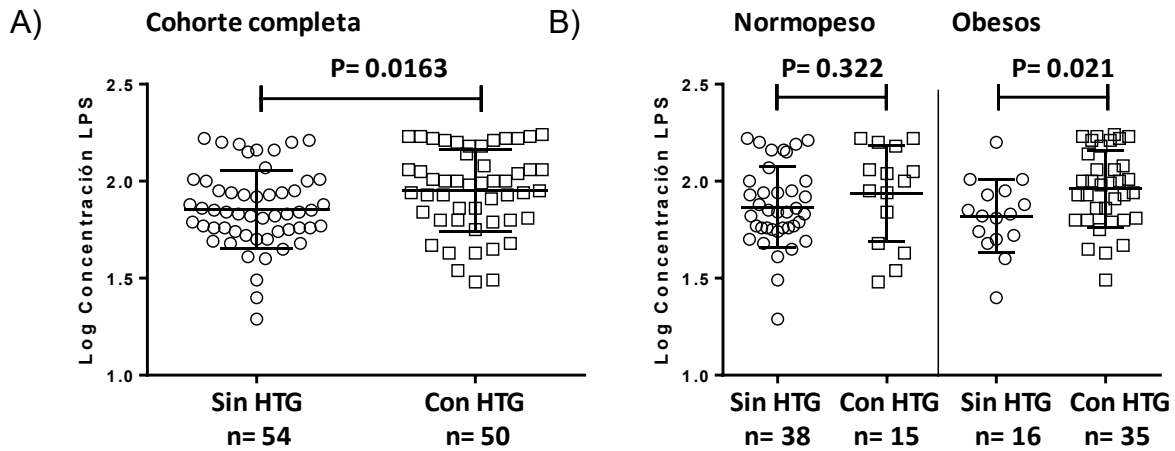


Fig 12. Concentración de LPS en los niños con y sin HTG. (A) Población conjunta de niños con y sin HTG (B) Análisis estratificado de niños normopeso y con obesidad con y sin HTG. Prueba estadística: *t de Student*; *P* significativa < 0.05.

Posteriormente se evaluó si la concentración de LPS variaba al comparar los genotipos TT y CT/CC del SNP rs12137901, se encontró que los niños con obesidad portadores del alelo "C" presentan concentraciones más altas de LPS (Fig. 13).

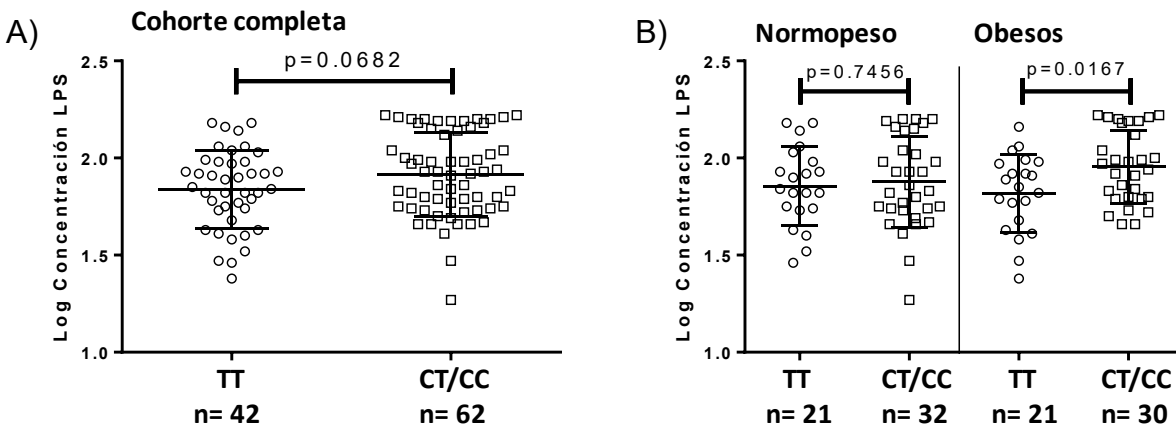


Fig 13. Concentración de LPS de acuerdo a los genotipos del SNP rs12137901. (A) Población completa. (B) Niños normopeso, y niños con obesidad. Se presentan los datos logaritmo transformados. Prueba estadística: *t de student*, *P* significativa < 0.05

Finalmente, se analizó si los LPS que correlacionaron positivamente con los niveles de triglicéridos (tabla 8; Fig. 14), también correlacionaban con la expresión de *NLRP3*. Se encontró, que la expresión de *NLRP3* tiende a incrementarse conforme aumentan los niveles de LPS (*P*= 0.186; Fig. 14). Sin embargo, se requiere ampliar el número de muestras con expresión del mensajero de *NLRP3*, para corroborar que esta

tendencia se mantenga y se vuelva significativa.

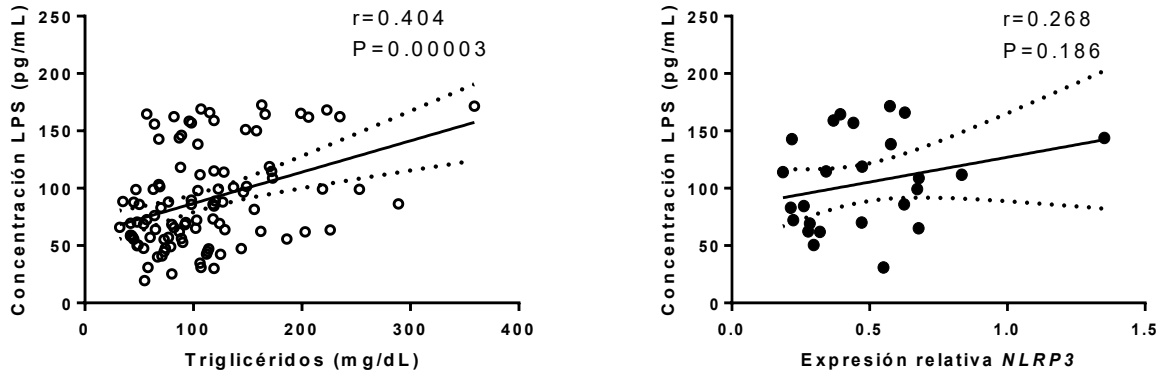


Fig. 14. Correlación de la concentración de LPS con triglicéridos y la expresión de *NLRP3*. (A) Correlación entre la concentración de LPS y los niveles de triglicéridos plasmáticos. (B) Correlación entre la concentración de LPS y la expresión del gen *NLRP3*. Prueba estadística: Correlación de *Spearman*, P significativa < 0.05

9.10 Cambios en la abundancia de la microbiota intestinal asociados a la HTG.

Se sabe que *NLRP3* está relacionado con la integridad de la pared intestinal y en modelos animales se ha propuesto como uno de los genes responsables de causar disbiosis intestinal [88]. La cual a su vez, se ha asociado con mayores niveles de LPS en circulación [128]. Por lo tanto, se probó si había cambios en la MI entre los niños con y sin HTG, que pudieran estar relacionados con los genotipos del SNP rs12137901 y que correlacionaran con los niveles de LPS. Para este fin, se analizó la composición de la MI en las 104 muestras con mediciones de LPS. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre la alfa y beta diversidad de niños con normopeso y obesidad ni tampoco entre aquellos con y sin HTG (Fig. 15).

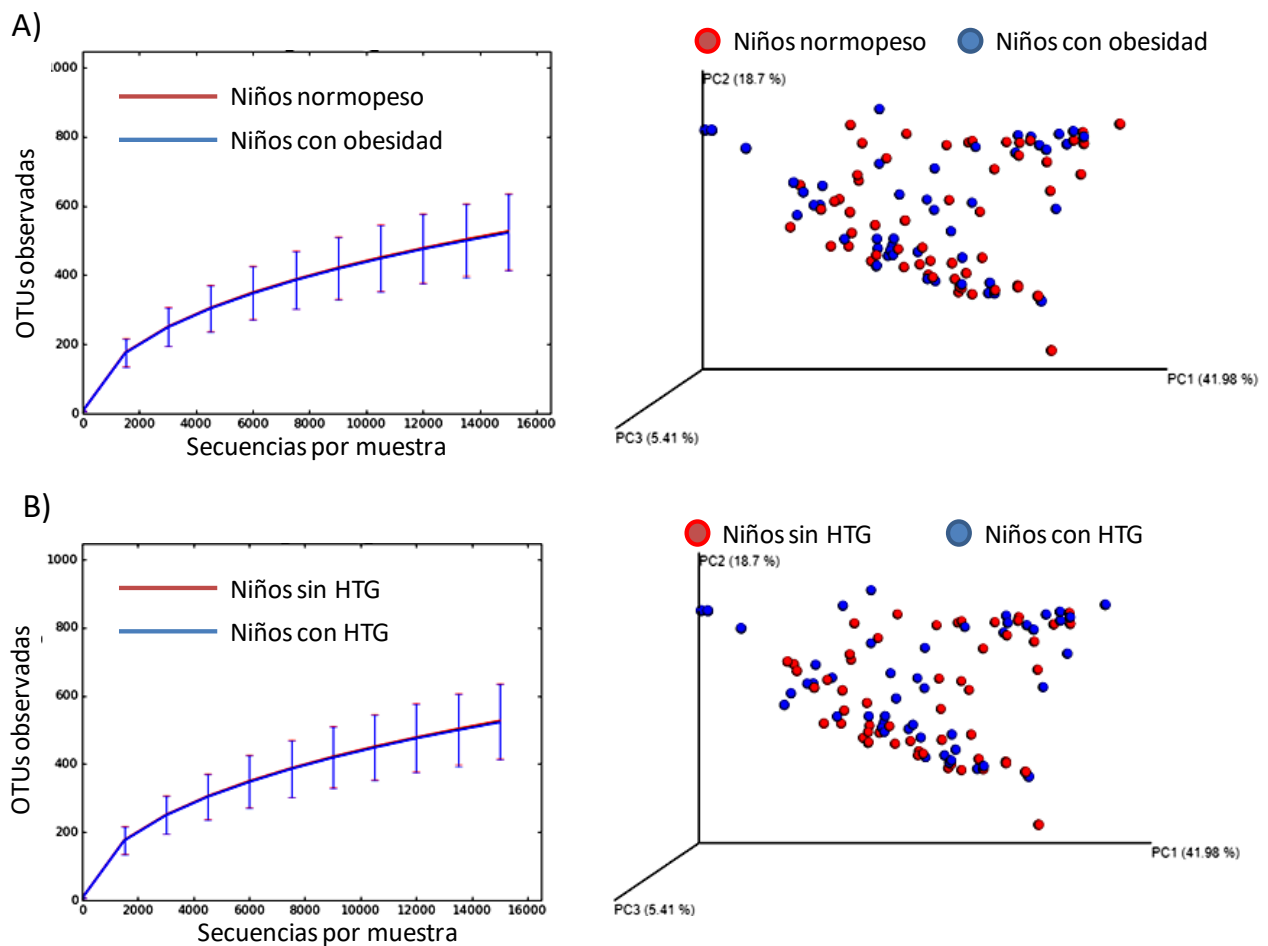


Fig. 15. Comparación de la alfa y beta diversidad. A) Curvas de rarefacción con 15,000 secuencias por muestra y análisis de coordenadas principales para niños con normopeso y obesidad (weighted unifrac). B) Curvas de rarefacción con 15,000 secuencias por muestra y análisis de coordenadas principales para niños con HTG y sin HTG (weighted unifrac).

Por otro lado, el análisis de la abundancia relativa de los diferentes OTUs no mostró diferencias significativas al comparar niños de la población completa con y sin HTG, así como en los niños normopeso (Anexo 4). En contraste, los niños con obesidad e HTG presentaron una menor abundancia relativa de *Akkermansia muciniphila* (*A. muciniphila*) comparado con los niños con obesidad y sin HTG. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la abundancia relativa de *A. muciniphila* entre los genotipos del SNP rs12137901, ni correlación significativa entre la abundancia de *A. muciniphila* y la concentración de LPS (Fig. 16)

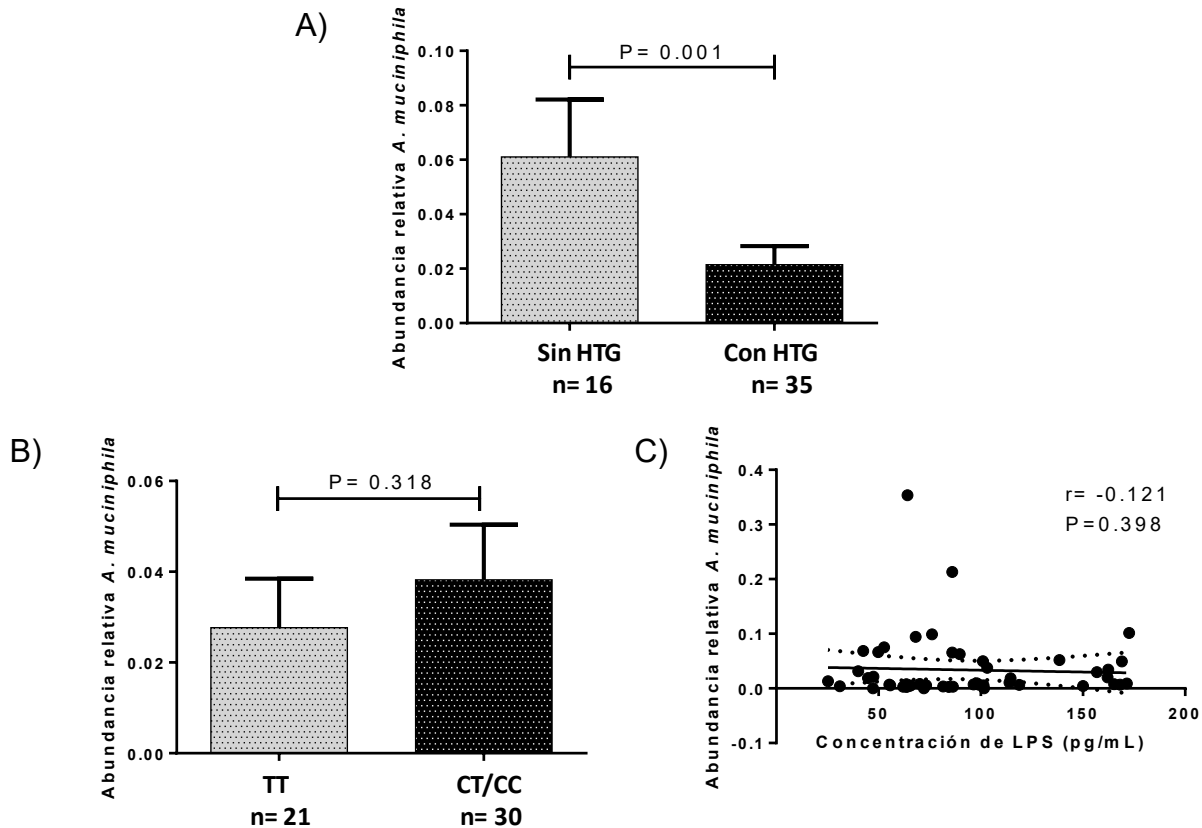


Fig. 16. Análisis de la abundancia relativa de *Akkermansia muciniphila* en niños con obesidad. A) Comparación de la abundancia de *A. muciniphila* en niños con y sin HTG. B) Comparación de la abundancia de *A. muciniphila* en niños de acuerdo a los genotipos del SNP rs12137901. C) Correlación de *A. muciniphila* con los niveles de LPS. Prueba estadística: U Mann-Whitney para variables categóricas y correlación de Spearman para variables continuas. P significativa < 0.05.

Por otra parte se identificaron algunas especies bacterianas significativamente diferenciadas en la población completa (HTG vs. sin HTG), antes de la corrección por FDR (Anexo 3). Tal es el caso de *Eubacterium bifforme*, la cual se encuentra en mayor abundancia en los niños con HTG, así como en menor abundancia en aquellos niños con los genotipos CT/CC del SNP rs12137901. Además, esta bacteria correlacionó negativamente con la concentración de LPS (Fig. 17).

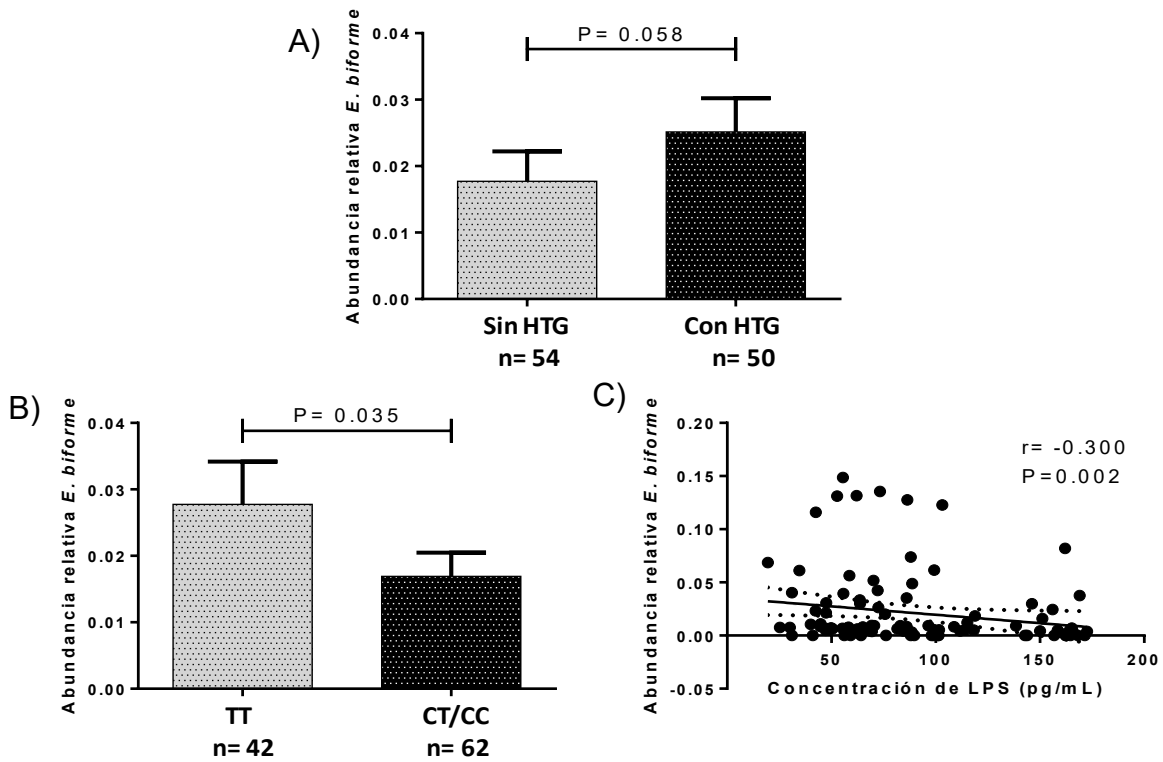


Fig. 17. Comparación de la abundancia relativa de *Eubacterium bifforme* en niños de la población completa. A) Comparación de la abundancia de *E. bifforme* en niños con y sin HTG. B) Abundancia de *E. bifforme* de acuerdo a los genotipos del SNP rs12137901. C) Correlación de *E. bifforme* con los niveles de LPS. Prueba estadística: U Mann-Whitney para variables categóricas y correlación de Spearman para variables continuas. P significativa < 0.05.

10. Discusión

La obesidad es una enfermedad compleja que tiene una alta tasa de mortalidad debido a las comorbilidades con las que se asocia [5]. El SM es un conjunto de anormalidades muy comunes en la obesidad que incrementa hasta cinco veces el riesgo de desarrollar DT2 y dos veces el riesgo de ECV [143]. Este síndrome se presenta como una combinación de alteraciones metabólicas: adiposidad central, dislipidemias, hipertensión y HGL [18]. Diversos estudios presentan que la población mexicana tiene una prevalencia de hasta el 30% de SM, principalmente por la alta frecuencia de la obesidad [17, 144]. En este estudio, la prevalencia de SM en los niños normopeso fue de 5.2%, consistente con reportes de niños México-americanos [145]. Por otro lado, un 60.9% de los niños con obesidad de la población de estudio presentaron SM, también consistente con reportes para niños y adolescentes mexicanos [144].

En cuanto a los rasgos del SM, los niveles bajos de HDLs y la HTG son los rasgos más prevalentes en la población de estudio, mientras que la HTA y la HGL son los menos frecuentes, consistente con estudios previos en población infantil mexicana [144]. Sin embargo, en los sujetos normopeso son muy frecuentes los niveles bajos de HDLs (~40%) y de HTG (~30%). Aunque aún faltan estudios prospectivos longitudinales que permitan identificar si estas alteraciones en niños con normopeso aumentan el riesgo de comorbilidades en la edad adulta [146].

10.1 Variantes genéticas en NLRP3 y su asociación con la obesidad y el Síndrome Metabólico.

Se sabe que la inflamación crónica está estrechamente relacionada con la obesidad, aunque

no es claro si ésta favorece su desarrollo o es una consecuencia [15]. Un número amplio de estudios apuntan a que el incremento en el tejido adiposo es el causante del proceso inflamatorio, ya que aumenta la producción de adipocinas, promoviendo la infiltración celular (principalmente macrófagos) e incrementando la producción de citocinas proinflamatorias [147, 148]. Sin embargo, algunos estudios sugieren que la inflamación precede a la obesidad, debido a que citocinas como TNF- α e IL-6 se han relacionado con la disminución de la expresión de leptina, adiponectina, además de inhibir la beta oxidación, favoreciendo el desarrollo de obesidad [149, 150]. En modelos animales de obesidad se ha observado que *Nlrp3* es un gen importante en el proceso inflamatorio y se asocia con la obesidad y alteraciones metabólicas [93]. Sin embargo, en este estudio no se encontró asociación entre las variantes genéticas analizadas de *NLRP3* y la obesidad. Debido a que en este estudio se analizaron variantes con una frecuencia >10%, no se puede excluir la participación de variantes raras, poco frecuentes o típicas de la población mexicana que pudieran estar asociadas con la obesidad.

Por otro lado, ya que NLRP3 requiere de una señal generada por alteraciones en la homeostasis metabólica para su activación [80,81], es interesante que se hayan encontrado SNPs en este gen asociados al SM y a algunos rasgos que lo componen. Uno de los más interesantes fue el SNP rs12137901, ubicado en una región intrónica en el extremo 5' del gen *NLRP3*, el cual se asoció con menor riesgo de presentar SM en los niños con obesidad. Además, esta variante se asoció con la HTG, aumentando el riesgo de HTG en los niños con normopeso y de manera contraria, disminuyendo el riesgo de HTG en los niños con obesidad. Estos hallazgos concuerdan con lo observado en modelos animales, en los que el inflamasoma de NLRP3 produce un efecto dependiente del estado nutricional del

organismo, ya que en condiciones fisiológicas la función de NLRP3 es promover el restablecimiento de la homeostasis metabólica, favoreciendo el recambio celular, manteniendo la homeostasis de glucosa e insulina, y favoreciendo el catabolismo de triglicéridos del organismo [79, 151]. Sin embargo, en un estado de activación crónica, como puede ser la obesidad o una dieta alta en grasa, la activación de NLRP3 puede condicionar a una menor sensibilidad a la insulina, mayores niveles de triglicéridos circulantes, entre otras alteraciones metabólicas [59, 93]. Esto sugiere que en humanos *NLRP3* también puede tener una función dependiente del estado nutricional del organismo.

Una vez que se probó la asociación del SNPs rs12137901 con el SM y la HTG en la población infantil, se buscó replicar esta asociación en una población de adultos, la cual ha tenido mayor tiempo de exposición a un medio ambiente obesogénico en comparación con la población infantil [152]. De manera interesante, el SNP rs12137901 se asoció con un riesgo incrementado de HTG en los adultos con normopeso, como se había observado en la población infantil. Sin embargo, en los adultos con obesidad no se observó un riesgo menor de HTG. Esto sugiere que en la exposición prolongada a factores ambientales, incluida la dieta y la actividad física podría modificar el efecto del SNP rs12137901 en los adultos con obesidad. Por ello, es que se requieren estudios prospectivos longitudinales que permitan comprobar el efecto de variantes genéticas en *NLRP3* en el SM, particularmente en la HTG.

En este sentido, la variante rs12137901 se asoció con el riesgo de desarrollar HTG futura en un grupo de niños con dos años de seguimiento, consistente con lo encontrado en los adultos con normopeso. Sin embargo, es necesario un estudio que pueda evaluar el efecto de la variante desde la niñez hasta la adultez, con el fin de evaluar la

influencia de factores como la dieta y la actividad física sobre los efectos de factores genéticos del individuo [146]. Así mismo, estos estudios permitirían probar si la presencia de esta variante es predictora de HTG en el adulto.

Aunque variantes genéticas en *NLRP3* han sido previamente asociadas a enfermedades como la enfermedad de gota y DT2 [153, 154], en nuestro conocimiento, éste es el primer estudio que muestra asociación de SNPs en *NLRP3*, con alteraciones metabólicas.

10.2 Efecto del SNP rs12137901 sobre la expresión del mensajero y la proteína de NLRP3.

El estudio de Paramel y colaboradores [134] identificó diversas variantes en el gen *NLRP3* que pueden modificar su expresión. Sin embargo, no considera al SNP rs12137901 que en el presente estudio se asoció con el SM y la HTG. Este SNP que se encuentra en el primer intrón de *NLRP3*, una región en la que se pueden unir factores de transcripción, por lo que podría generar cambios en la expresión de *NLRP3* [155]. De acuerdo con base GTex [156], el SNP rs12137901 se asocia con un aumento en la expresión de *NLRP3* en una línea celular de fibroblastos. Sin embargo, en el presente estudio no se encontraron diferencias significativas en la expresión de *NLRP3* con base en los genotipos del SNP rs12137901 en la población infantil completa, ni al estratificar por casos y controles. Esto puede deberse a que la expresión tanto del gen como de la proteína de NLRP3 se evaluó en leucocitos de sangre periférica, por lo que no se descarta que puedan observarse diferencias si se evalúa en tejido adiposo.

En cuanto a los niveles de proteína en leucocitos, se encontró que los genotipos del SNP rs12137901 no presentan niveles significativamente distintos de la proteína NLRP3 en la población completa de niños, ni en los casos y controles. Sin embargo, la proteína de NLRP3 se encontró incrementada en leucocitos de niños con obesidad en comparación de los niños con normopeso. Esto es consistente con estudios previos en los cuales los sujetos obesos presentan una concentración mayor de NLRP3 [59]. Posiblemente, debido a que en la obesidad hay una mayor cantidad de moléculas activadoras del inflamasoma de NLRP3 necesarias para su ensamblaje, como AGL, cristales de colesterol, altas concentraciones de glucosa, etcétera [59]. Estos hallazgos, contrastan con la falta de asociación entre los genotipos del SNP rs12137901 y la obesidad, sugiriendo que aunque la variante no modifica los niveles de proteína NLRP3, hay una clara influencia del estado nutricional sobre la modulación de sus niveles, por lo que continuar con los mismos hábitos alimenticios podría conducir al desarrollo de alteraciones metabólicas en la adultez.

En cuanto a la HTG, no se encontraron diferencias significativas al comparar la expresión del mensajero y los niveles de proteína de NLRP3 entre niños con y sin HTG. Esto sugiere que la activación del inflamasoma de NLRP3 no está relacionada necesariamente con los niveles de triglicéridos, lo cual contrasta con un estudio reciente en el que se mostró que el inflamasoma incrementa los niveles de triglicéridos en circulación como consecuencia de la RI, debido a que la activación de NLRP3 genera un aumento de IL-1 β , que bloquea a IRS-1, disminuyendo el aprovechamiento de glucosa y aumentando la insulina en sangre [60]. Lo que provoca la lipólisis del tejido adiposo, generando altas concentraciones de AGL, que al llegar al hígado se resintetizan en triglicéridos y son exportados en VLDLs al torrente sanguíneo, aumentando los niveles de triglicéridos en sangre, aunado a una menor beta

oxidación [157; Fig. 18].

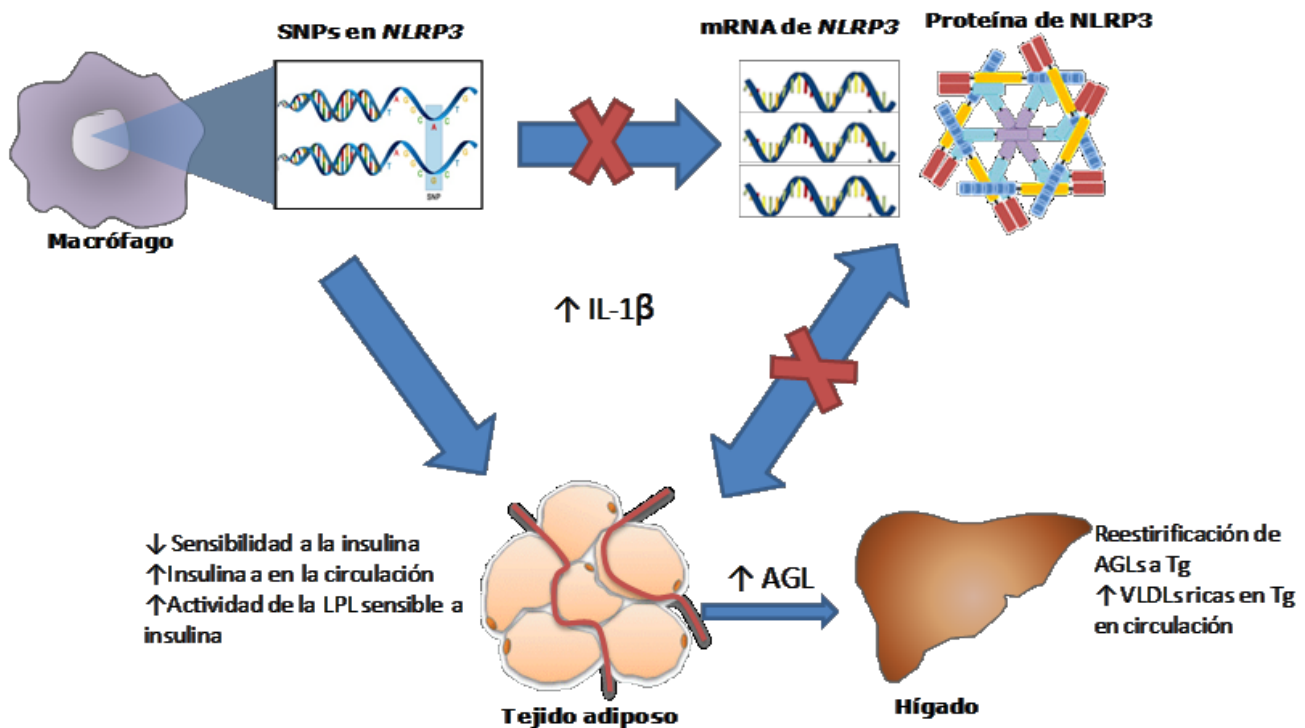


Fig 18. La activación de NLRP3, conduce a la producción de citocinas proinflamatorias como IL-1 β , la cual ha mostrado que puede inhibir a IRS-1 necesario para la señalización intracelular de la insulina, lo que puede conducir a RI, caracterizada por la elevación de los niveles de triglicéridos en sangre.

10.3. Los lipopolisacáridos como causa de las alteraciones metabólicas.

Se ha propuesto que NLRP3 está relacionado con la permeabilidad de la pared intestinal, debido a que de su activación depende la liberación de IL-18, una citocina que estimula a las células caliciformes para que se produzca moco y PAMs, útiles para mantener una MI saludable [88]. Por lo que la falta del gen *NLRP3* o variantes genéticas que alteren su funcionalidad podrían relacionarse con una mayor permeabilidad intestinal, lo cual conduce a un mayor paso de LPS y otros productos bacterianos al torrente sanguíneo [87, 89]. Además diversos estudios en modelos animales y en humanos presentan que los sujetos con obesidad tienen mayores niveles de LPS en circulación [158, 159]. Sin embargo, en este estudio la concentración de LPS entre niños con normopeso y obesidad, no se encontraron diferencias significativas, consistente con un estudio reciente en jóvenes mexicanos, en el

cual no se observaron diferencias en la concentración de LPS entre sujetos con normopeso y obesidad [160].

Por otro lado, los niños con HTG presentaron concentraciones mayores de LPS, lo que sugiere que los LPS pueden estar relacionados en la elevación de los niveles de triglicéridos. Estos hallazgos han sido previamente reportados en adultos, en los que se ha visto que la concentración de LPS correlaciona positivamente con los niveles de triglicéridos [159,161]. Se ha propuesto que la asociación entre LPS y triglicéridos, es debida a que los LPS activan a receptores como TLR-4, quienes en respuesta producen citocinas proinflamatorias (TNF- α e IL-6). Estas citocinas se asocian con la inhibición de IRS-1, un receptor necesario para la señalización de la insulina, por lo que su disminución puede condicionar a la presencia de RI, y a su vez a la elevación de triglicéridos en circulación [149, 150, 156; Fig. 19].

Además, en este estudio la expresión de *NLRP3* tiende a aumentar conforme se incrementan los niveles de LPS, lo cual es consistente con reportes previos, en los que se ha demostrado que los LPS son los principales activadores de la expresión de *NLRP3* [160]. Es de llamar la atención que los LPS correlacionan con los triglicéridos, pero los triglicéridos no correlacionan con la expresión del mensajero y la proteína de *NLRP3* [Fig.16]. Esto sugiere la participación de mecanismos en los que intervienen los LPS relacionados con los niveles de triglicéridos, pero que pudieran ser independientes de la activación de *NLRP3*, como la activación de TLR-4 [156]. O bien que la participación de que *NLRP3* en la etapa infantil sea modesta, pero que se puede volver relevante en la adultez [162].

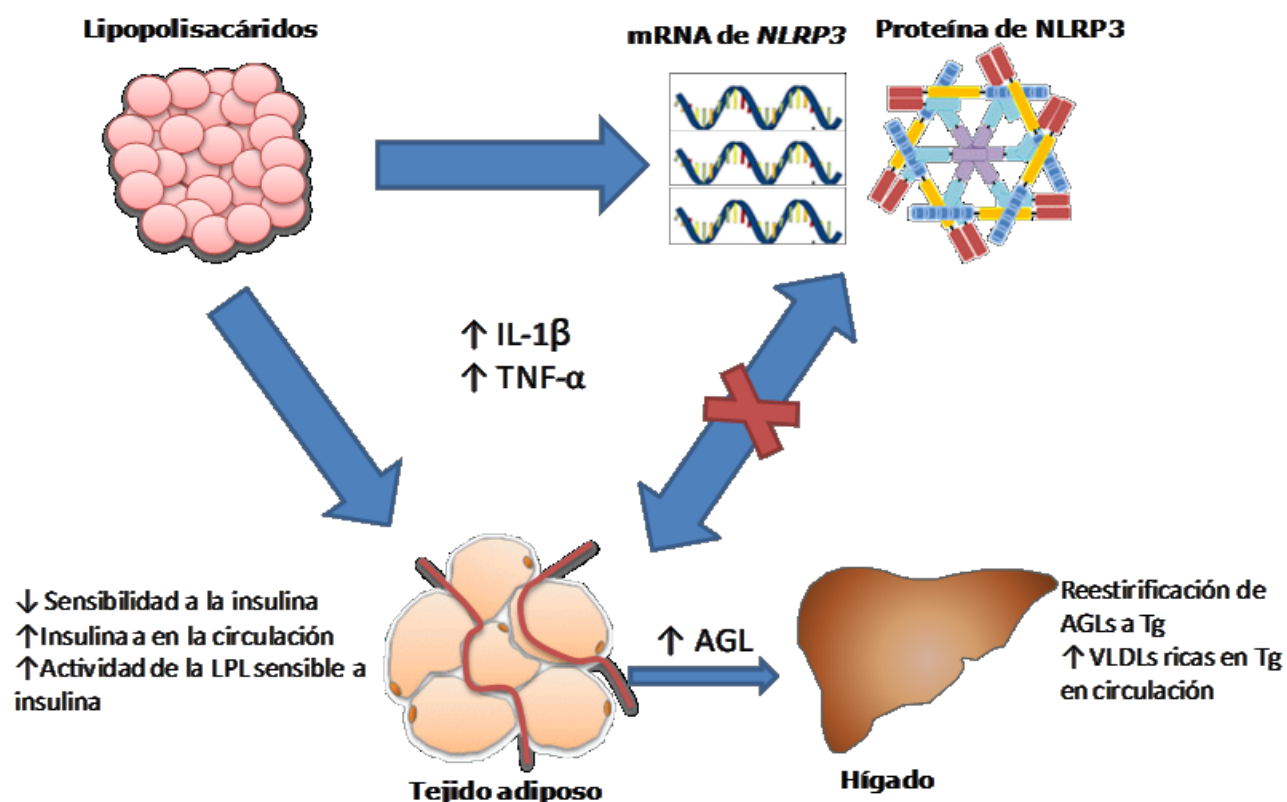


Fig. 19. Los LPS pueden modificar la expresión de NLRP3, además de que favorecen la producción de TNF- α , que al igual que IL-1 β puede inhibir a IRS-1 necesario para la señalización intracelular de la insulina, lo que puede conducir a RI, caracterizada por la elevación de los niveles de triglicéridos en sangre.

10.4 La microbiota intestinal y su relación con los niveles de LPS.

Los LPS son productos microbianos provenientes de la pared celular de las bacterias Gram negativo [133]. Se ha mostrado en diversos estudios que el incremento en los niveles de LPS en circulación van acompañados por cambios en la abundancia de bacterias de la microbiota intestinal, entre ellas el incremento del filo Proteobacteria [123, 161]. Sin embargo, en este estudio no se encontraron cambios significativos en la abundancia relativa de ninguna bacteria que estuvieran relacionados con los niveles de LPS. Esto sugiere que puede haber cambios sutiles en la microbiota intestinal que en conjunto pueden estar generando variación en la concentración de LPS en circulación. Sin embargo, a pesar de que los niveles de LPS se encuentran dentro de los rangos normales, hay una clara asociación entre la concentración de LPS y los niveles de triglicéridos, lo cual indica que inclusive pequeñas

variaciones en la concentración de LPS pueden generar alteraciones metabólicas.

Por otra parte, *Akkermansia muciniphila*, una bacteria conocida por tener una participación importante en la permeabilidad de la pared intestinal [163], tiene una menor abundancia en niños con HTG y el genotipo CT/CC del SNP rs12137901. Sin embargo, la abundancia de esta bacteria no correlacionó con los niveles de LPS, lo cual sugiere que puede haber otros mecanismos relacionados con la MI, que podrían estar asociados con alteraciones metabólicas. Por ejemplo el paso a circulación de metabolitos secundarios, como la trimetilamina, la cual aumenta el riesgo de ECV y acumulación de triglicéridos hepáticos al ser transformado a óxido de trimetilamina en el hígado [164].

11.0 Conclusiones.

Estudios en modelos animales presentan a *NLRP3* como un gen importante en el desarrollo de alteraciones metabólicas. En este estudio se identificó una asociación modesta del SNP rs12137901 con un riesgo mayor de HTG en los sujetos con normopeso de la población infantil y adulta. De manera importante, se evidenció la asociación del SNP rs12137901 con la presencia de HTG futura a dos años de seguimiento en una muestra de la población infantil. Sin embargo, estudios prospectivos que alcancen la edad adulta, son requeridos para establecer el valor predictivo de esta variante en el desarrollo de HTG.

De manera interesante, la concentración de LPS circulantes, puede estar relacionada con alteraciones metabólicas, incluso encontrándose en bajas cantidades e independientemente de si hay cambios en la microbiota intestinal que favorezcan el aumento de éstos. Por los hallazgos encontrados, parece ser que el aumento de los LPS en circulación se relaciona directamente con el metabolismo de los triglicéridos, posiblemente por mecanismos independientes a la activación del inflamasoma de *NLRP3*, principalmente por la activación de TLR-4 y la producción de TNF- α . Aunque sería indispensable la medición de citocinas en circulación para corroborar el mecanismo por el cual los LPS podrían estar generando alteraciones metabólicas.

Finalmente es importante notar que los niveles de proteína *NLRP3* se modulan dependiendo del estado nutricional, por lo que a pesar de que la genética no se asoció con la concentración de la proteína *NLRP3*, el mantener un estado de obesidad prolongado podría generar una sobreactivación del inflamasoma y cobrar relevancia en el desarrollo de alteraciones metabólicas en la etapa adulta. Por lo que es necesario corroborar estos

hallazgos en una población de adultos.

12. Referencias.

1. World Health Organization (2000). Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic. WHO Obesity Technical Report Series 894: World Health Organization Geneva, Switzerland.
2. National Obesity Observatory (2008). Body Mass Index as a measure of obesity. Association of Public Health Observatories.
3. Centers for Disease Control and Prevention (2002). 2000 CDC Growth Charts for United States: Methods and Development. *Vital and Health Statics*, 11 (246), 1-187.
4. Balkau B, Deanfield JE, Després JP, Bassand JP, Fox K, Smith SC, et al (2007). A Study of Waist Circumference, Cardiovascular Disease, and Diabetes Mellitus in 168 000 Primary Care Patients in 63 Countries. *Circulation*, 116, 1942-1951.
5. Prospective Study Collaboration (2009). Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. *Lancet*, 373, 1083-1096.
6. Goran MI, Ball, G and Cruz ML (2003). Obesity and Risk of Type 2 Diabetes and Cardiovascular Disease in Children and Adolescents. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88(4), 1417-1427.
7. Lloyd LJ, Landley-Evans SC and McMullen S (2012). Childhood obesity and risk of the adult metabolic syndrome: a systematic review. *International Journal of Obesity*, 36, 1-11.
8. World Health Organization (2016). Obesity and overweight. Fact sheet.
9. Kelly T, Yang W, Chen CS, Reynolds K, and He J (2008). Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. *International Journal of Obesity*, 32, 1431-1437.
10. OECD (2014). Obesity Update. 1-8.
11. <http://www.who.int/features/factfiles/obesity/es/> (01/Octubre/2016)
12. Gutiérrez JP, Rivera-Dommarco J, Shamah.Levy T, Villalpando-Hernández S, Franco A, Cuevas-Nasu L, et al (2012). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública.
13. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) (2014). Kilos de más, pesos de menos. Los costos de la obesidad en México. Instituto Mexicano para la Competitividad A.C. 1-47.
14. García-García E, De la Lata-Romero M, Kaufer-Horwitz M, Tusié-Luna MT, Calzada-León R, Vázquez Velázquez V (2009). La obesidad y el síndrome metabólico. Un reto para los Institutos Nacionales de Salud. *Revista de Investigación Clínica*, 61(4), 337-346.
15. Monteiro R and Azebedo I (2010). Chronic Inflammation in Obesity and the Metabolic Syndrome. *Mediators of Inflammation*. 1-10.
16. Bermúdez V, Rojas J, Añez R, Salazar J, Bello L, Toledo A (2014). Metabolic Syndrome

components combinations: evidence of asymmetric clustering determined by central obesity and homeostasis model assessment. *Síndrome Cardiometabólico*, 4(4), 100-107.

17. Rojas R, Aguilar-Salinas CA, Jiménez-Corona A, Shamah-Levy T, Rauda J, Ávila-Burgos L, et al. Metabolic syndrome in Mexican adults. Results from the National Health and Nutrition Survey 2006. *Salud Pública de México*, 52, S11-S18.

18. Adult Treatment Panel III (2002). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP). *Circulation*, 106, 3145-3421.

19. Kassi E, Pervanidou P, Kaltsas G, and Chrousos G. Metabolic syndrome: definitions and controversies. *BioMed Central*, 9, 1-13.

20. de Ferranti S, Gauvreau K, Ludwig DS, Neufeld EJ, Newburger JW, Rifai N (2004). Prevalence of the Metabolic Syndrome in American Adolescents. *Circulation*, 110, 2494-2497.

21. Yuan G, Al-Shali KZ, Hegele RA (2007). Hypertriglyceridemia: its etiology, effects and treatment. *Canadian Medical Association Journal*, 176(8), 1113-1120.

22. Ginsberg, HN (1998). Lipoprotein Physiology. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 27(3), 503-519.

23. Pejic RN and Lee DT (2006). Hypertriglyceridemia. *The Journal of the American Board of Family Medicine*, 19, 310-316.

24. Austin, MA (2000). Triglyceride, Small, Dense Low-density Lipoprotein, and the Atherogenic Lipoprotein Phenotype. *Current Atherosclerosis Reports*, 2, 200-207.

25. Fielding CJ and Fielding, PE (1982). Cholesterol Transport Between Cells and Body Fluids. *Medical Clinics of North America*, 66(2), 363-373.

26. Camont L, Chapman MJ, and Kintush A (2011). Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease. *Trends in Molecular Medicine*, 17(10), 594-603.

27. Salonen JT, Salonen R, Seppänen K, Rauramma R, and Tuomilehto J (1991). HDL, HDL₂, and HDL₃ Subfractions, and the Risk of Acute myocardial Infarction. *Circulation*, 84(1), 129-139.

28. Shepherd PR, and Kahn BB (1999). Glucose Transporters and Insulin Action. *The New England Journal of Medicine*, 341(4), 248-257.

29. Boucher J, Kleinridders A, and Kahn CR (2014). Insulin Receptor Signaling in Normal and Insulin-Resistant States. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6, 1-23.

30. Martyn JA, Kaneki M, and Yasuhara S (2008). Obesity-Induced Insulin Resistance and Hyperglycemia: Etiological Factors and Molecular Mechanisms. *Anesthesiology*, 109(1), 137-148.

31. Kostis JB. (2007). The Importance of Managing Hypertension and Dyslipidemia to Decrease Cardiovascular Disease. *Cardiovascular Drugs Therapy*, 21, 297-309.

32. Hsueh WA and Wyne K (2011). Renin-Angiotensin-Aldosterone System in Diabetes and Hypertension. *The Journal of Clinical Hypertension*, 13(4), 224-237.

33. Savoia C and Shiffrin EL (2006). Inflammation in hypertension. *Current Opinion in Nephrology and*

Hypertension, 15, 152-158.

34. Patel PS, Buras ED, and Balasubramanyam A (2013). The Role of Immune System in Obesity and Insulin Resistance. *Journal of Obesity*, 1-9.

35. Fontana L, Eagon JC, Trujillo ME, Scherer PE, and Klein S (2007). Visceral Fat Adipokine Secretion Is Associated With Systemic Inflammation in Obese Humans. *Diabetes*, 56, 1010-1013.

36. Després JP, Lemieux I, Bergeron J, Pibarot P, Mathieu P, Larose E, et al. Abdominal Obesity and the Metabolic Syndrome: Contribution to Global Cardiometabolic Risk. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27, 2276-2283.

37. Gregor MF and Hotamisligil GS (2011). Inflammatory Mechanisms in Obesity. *The Annual Review Immunology*, 29, 415-445.

38. Pereira SS, Alvarez-Leite JI (2014). Low-Grade Inflammation, Obesity, and Diabetes. *Current Obesity Reports*, 3, 422-431.

39. Jhonson AR, Milner JJ, and Makowski L (2012). The inflammation highway: metabolism accelerates inflammatory traffic in obesity. *Immunological Reviews*, 249(1), 218-238.

40. Valle M, Martos R, Gascón F, Cañete R, Zafra R, Morales R (2005). Low-grade systemic inflammation, hypoadiponectinemia and high concentration of leptin are present in very young obese children, and correlate with metabolic syndrome. *Diabetes Metabolism*, 31, 55-62.

41. Williams EP, Mesidor M, Winters K, Dubbert PM, and Wyatt SB (2015). Overweight and Obesity: Prevalence, Consequences and Causes of a Growing Public Health Problem. *Current Obesity Reports*, 4, 363-370.

42. Horton, TJ, Drougas H, Brachey A, Reed GW, Peters JC, and O Hill J (1995). Fat and carbohydrate overfeeding in humans: different effects on energy storage. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 62, 19-29.

43. Bleich SN, Ku R, and Wang YC (2011). Relative contribution of energy intake and energy expenditure to childhood obesity: a review of the literature and directions for future research. *International Journal of Obesity*, 35, 1-15.

44. Popkin, BM (2001). The Nutrition Transition and Obesity in the Developing World. *The Journal of Nutrition*, 131, 871-873.

45. Caballero B (2007). The Global Epidemic of Obesity: An Overview. *Epidemiologic Reviews*, 29, 1-5.

46. Sonnenburg JL and Bäckhed F (2016). Diet-microbiota interactions as moderators of human metabolism. *Nature*, 535, 56-64.

47. Silventoinen K, Rokholm B, Kaprio J, and Sorensen TI (2010). The genetic and environmental influences on childhood obesity; a systematic review of twin and adoption studies. *International Journal of Obesity*, 34, 29-40.

48. Naukkarinen J, Rissanen A, Kaprio J, and Pietiläinen KH (2012). Causes and consequences of obesity: the contribution of recent twin studies. *International Journal of Obesity*, 36, 1017-1024.

49. Walley AJ, Asher JE, and Froguel Philippe (2009). The genetic contribution to non-syndromic human obesity. *Nature Reviews Genetics*, 10, 431-442.
50. McCarty MI, Abecasis GR, Cardon LR, Goldstein DB, Little J, Ioannidis JP, et al (2008). Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. *Nature Reviews Genetics*, 9, 356-369.
51. Speliotes EK, Willer CJ, Berndt SI, Monda KL, Thorleifsson G, Jackson AU, et al (2010). Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. *Nature Genetics*, 42, 937-948.
52. Xia Q and Grant SF (2013). The genetics of human obesity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1281, 178-190.
53. Marti A, Moreno-Aliaga MJ, Hebebrand J, and Martínez JA (2004). Genes, lifestyles and obesity. *International Journal of Obesity*, 28, 29-36.
54. Chagnon YC, Rankinen T, Snyder EE, Weisnagel SJ, Pérusse L, and Bouchard C (2002). The Human Obesity Gene Map: The 2002 Update. *Obesity Research*, 11(3), 313-367.
55. Willer CJ, Speliotes EK, Loos RF, Li S, Lindfren CM, Heid IM, et al (2009). Six new loci associated with body mass index highlight a neuronal influence on body weight regulation. *Nature Genetics*, 41(1), 25-34.
56. van Rossum CT, Hoebee B, Seidell JC, Bouchard C, van Baak MA, de Groot CP, et al (2002). Genetic factors as predictors of weight gain in young adult Dutch men and women. *International Journal of Obesity*, 26, 517-528
57. Wärnberg J, Marcos A (2008). Low-grade inflammation and the metabolic syndrome in children and adolescents. *Current Opinion in Lipidology*, 19 (1), 11-15
58. Stienstra R, Tack CJ, Kanneganti TD, Joosten LA, and Netea MG (2012). The inflammasome Puts Obesity in the Danger Zone. *Cell Metabolism*, 15, 10-18.
59. Coll RC, O'Neill LA, and Schroder K (2016). Questions and controversies in innate immune research: what is the physiological role of NLRP3? *Cell Death Discovery*, 2, 1-5.
- 60.- Vandanmagsar B, Youm YH, Ravussin A, Galgani JE, Stafler K, Mynatt RL, et al (2011). The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nature Medicine*, 17(2), 179-188.
61. Latz E, Xiao TS, and Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nature Reviews Immunology*, 13, 397-411.
62. Iwasaki A and Medzhitov R (2015). Control of adaptive immunity by innate immune system. *Nature Immunology*, 16(4), 343-353.
63. Henao-Mejia J, Elinav E, Thaiss CA, and Flavell RA (2014). Inflammasomes and Metabolic Disease. *Annual Review of Physiology*, 76, 57-78.
64. Lavelle EC, Murphy C, O'Neill LA, and Creagh EM (2010). The role of TLRs, NLRs, and RLRs in mucosal innate immunity and homeostasis. *Mucosal Immunology*, 3(1), 17-28.

65. Conforti-Androni C, Ricciardi-Castagnoli P, and Mortellaro A (2011). The inflammasomes in health and disease: from genetics to molecular mechanisms of autoinflammation and beyond. *Cellular & Molecular Immunology*, 8, 135-145.
66. Lamkanfi M and Dixit VM (2014). Mechanisms and Functions of Inflammasomes. *Cell*, 157, 1013-1022.
67. Schroder K and Tschopp J. The Inflammasomes (2010). *Cell*, 140, 821-832.
68. Abderrazak A, Syrovets T, Couchie D, Hadri KE, Friguet B, Simet T, et al (2015). NLRP3 inflammasome: From a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and inflammatory diseases. *Redox Biology*, 4, 296-307.
69. Franchi L, Eigenbrod T, Muñoz-Planillo R, and Nuñez G. The inflammasome: A Caspase-1 Activation Platform Regulating Immune Responses and Disease Pathogenesis (2009). *Nature Immunology*, 10(3), 1-15.
70. He Y, Franchi L, and Nuñez Gabriel (2013). TLR Agonists Stimulate Nlrp3-Dependent IL-1 β Production Independently of the Purinergic P2X7 Receptor in Dendritic Cells and In Vivo. *The Journal of Immunology*, 190, 334-339.
71. Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M, et al (2006). Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature*, 440(9), 228-232.
72. Rajamäki K, Lappalainen J, Öörni K, Välimäki E, Matikainen S, Kovanen PT, et al (2010). Cholesterol Crystals Activate the NLRP3 Inflammasome in Human Macrophages: A Novel Link between Cholesterol Metabolism and Inflammation *PLoS ONE*, 5, 1-9.
73. De Nardo D and Latz E (2011). NLRP3 inflammasomes link inflammation and metabolic disease. *Trends in Immunology*, 32(8), 373-379.
74. Takeda K and Akira S (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology*, 17(1), 1-14).
75. Boaru SG, Borkham-Kamphorst E, Van de Leur E, Lehnen E, Liedtke C, Weiskirchen R (2015). NLRP3 inflammasome expression is driven by NF- κ B in cultured hepatocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 458, 700-706.
76. Guo H, Callaway JB, and Ting JP (2015). Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nature Medicine*, 21(7), 677-687.
77. Franchi L, Eigenbrod T, Muñoz-Planillo R, and Nuñez G (2009). The Inflammasome: A Caspase-1 Activation Platform Regulating Immune Responses and Disease Pathogenesis. *Nature Immunology*, 10(3), 1-15.
78. Guey B, Bodnar M, Manié SN, Tardivel A, and Petrilli V (2014). Caspase-1 autoproteolysis is differentially required for NLRP1b and NLRP3 inflammasome function. *PNAS*, 111(48), 17254-17259.
79. Sollberger G, Strittmatter GE, Garstkiewicz M, Sand J, and Beer HD (2014). Caspase-1: The inflammasome and beyond. *Innate Immunity*, 20(2), 115-125.
80. Medzhitov R (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454, 428-435.

81. Haneklaus M, O'Neill LA (2015). NLRP3 at the interface of metabolism and inflammation. *Immunological Reviews*, 265, 53-62.
82. Wen H, Ting JP, and O'Neill LA (2012). A role for the NLRP3 inflammasome in metabolic diseases did Warburg miss inflammation? *Nature Immunology*, 13(4), 352-357.
83. Stienstra R, Joosten LA, Koenen T, van Tits B, van Diepen JA, van den Berg SA, et al (2010). The Inflammasome-Mediated Caspase-1 Activation Controls Adipocyte Differentiation and Insulin Sensitivity. *Cell Metabolism*, 12, 593-605.
84. Jager J, Grémeaux T, Cormont M, Marchand-Brustel YL, and Tanti JF (2007). Interleukin-1 β -Induced Insulin Resistance in Adipocytes through Down-Regulation of Insulin Receptor Substrate-1 Expression. *Endocrinology*, 148(1), 241-251
85. Stienstra R, Saudale F, Duval C, Keshtkar S, Groener JE, van Rooijen N, et al (2010). Kupffer Cells Promote Hepatic Steatosis Via Interleukin-1 β -Dependent Suppression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α Activity. *Hepatology*, 51, 511-522.
86. Masters SL, Dunne A, Subramanian SL, Hull RL, Tannahil GM, Sharp FA, et al (2010). Activation of the NLRP3 inflammasome by islet amyloid polypeptide provides a mechanism for enhanced IL-1 β in type 2 diabetes. *Nature Immunology*, 11(10), 897-904.
87. Wetwell-Roper, Dai DL, Soukhatcheva G, Potter KJ, van Rooijen N, Ehses JA, et al (2011). IL-1 Blockade Attenuates Islet Amyloid Polypeptide-Induced Proinflammatory Cytokine Release and Pancreatic Islet graft Dysfunction. *The Journal of Immunology*, 187, 2755-2765.
88. Elinav E, Strowig T, Kau AL, Henao-Mejia J, Thaiss CA, Booth CJ, et al (2011). NLRP6 Inflammasome Regulates Colonic Microbial Ecology and Risk for Colitis. *Cell*, 145, 745-757.
89. Hand TW (2015). Interleukin-18: The Bouncer at the Mucosal Bar. *Cell* 163, 1310-1311.
90. Nowarski R, Jackson R, Gagliani N, Graham M, Elinav E, Flavell RA, et al (2015). Epithelial IL18 Equilibrium Controls Barrier Function in Colitis. *Cell*, 163, 1444-1456.
91. Matsuki T, Horai R, Sudo K, and Iwakura Y (2003). IL-1 Plays an Important Role in Lipid Metabolism by Regulating Insulin Levels under Physiological Conditions. *Journal of Experimental Medicine*, 198(6), 877-888
92. Somm E, Henrichot E, Pernin A, Juge-Aubry CE, Muzzin P, Dayer JM, et al (2005). Decreased Fat Mass in Interleukin-1 Receptor Antagonist-Deficient Mice. *Diabetes*, 54, 3503-3509.
93. García MC, Wernstedt I, Berndtsson A, Enge M, Bell M, Hultgren O, et al (2006). Mature-Onset Obesity in Interleukin-1 Receptor I Knockout Mice. *Diabetes*, 55, 1205-1213.
94. Stienstra R, van Diepen JA, Tack CJ, Zaki MH, van de Veerdonk FL, Perera D, et al (2011). Inflammasome is a central player in the induction of obesity and insulin resistance. *PNAS*, 108(37), 15324-15329.
95. Rathinam VA and Fitzgerald KA (2016). Inflammasome Complexes: Emerging Mechanisms and Effector Functions. *Cell*, 165, 792-800.
96. Kotas ME and Medzhitov R (2015). Homeostasis, Inflammation, and Disease Susceptibility. *Cell*, 160, 816-827.

97. Frank D, Robertson CE, Hamm CM, Kpadeh Z, Zhang T, Chen H, et al (2011). Disease phenotype and genotype are associated with shifts in intestinal-associated microbiota in inflammatory bowel diseases. *Inflammatory Bowel Disease*, 17(1), 1-12.
98. Khachatryan ZA, Ktsoyan ZA, Manukyan GP, Kelly D, Ghazaryan KA, Aminov RI (2008). Predominant Role of Host Genetics in Controlling the Composition of Gut Microbiota. *PLoS ONE*, 3(8), 1-16.
99. Hold GL, Smith M, Grange C, Watt ER, El-Omar EM, and Mukhopadhyay I (2014). Role of the gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: What have we learnt in the past 10 years? *World Journal of Gastroenterology*, 20(5), 1192-1210.
100. Serikov I, Russell SL, Antunes LC, and Finlay BB (2010). Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiological Reviews*, 90, 859-904.
101. Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, and Knight R (2012). Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*, 489, 220-230.
102. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, et al (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473, 174-180.
103. Wu GD, Chen J, Hoffman C, Bittinger K, Chen YY, Keilbaugh SA, et al (2011). Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes. *Science* 334(6052), 105-108.
104. Jeffery IA, Claesson MJ, and O'Toole PW (2012). Categorization of the gut microbiota: enterotypes or gradients? *Nature Reviews Microbiology*, 10, 591-592.
105. Rodríguez JM, Murphy K, Stanton C, Ross RP, Kober OI, Juge N, et al (2015). The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microbial Ecology in Health & Disease*, 26, 1-17.
106. Brown EM, Sadarangani M, and Finlay BB (2013). The role of the immune system in governing host-microbe interactions in the intestine. *Nature Immunology*, 7(14), 660-667.
107. Koenig, JE, Spor, A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, Knight R, et al (2011). Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *PNAS*, 108, 4578-4585.
108. Yassour M, Vatanen T, Siljander H, Hämäläinen AM, Härkönen T, Ryhänen SJ, et al (2016). Natural history of the infant gut microbiome and impact of antibiotic treatment on bacterial strain diversity and stability. *Science Translational Medicine*, 8, 1-11.
109. Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, et al (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *PNAS*, 101(44), 15718-15723.
110. Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, and Gordon JI (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *PNAS*, 102(31), 11070-11075.
111. Kasai C, Sugimoto K, Moritani I, Tanaka J, Oya Y, Inoue H (2015). Comparison of the gut microbiota composition between obese and non-obese individuals in a Japanese population, as analyzed by terminal restriction fragment length polymorphism and next-generation sequencing. *Bio Med Central Gastroenterology*, 15, 2-10.

112. Bervoets L, Van Hoorenbeeck K, Kortleven I, Van Noten C, Hens N, Vael C, et al (2013). Differences in gut microbiota composition between obese and lean children: a cross-sectional study. *Gut Pathogens*, 5, 1-10.
113. Harley IT and Karp CL (2012). Obesity and the gut microbiome: Striving for causality. *Molecular Metabolism*, 1, 21-31.
114. López-Contreras BE, Morán-Ramos, S, Villarruel-Vázquez R, Macías-Kauffer L, Villamil-Ramírez H, León-Mimila P, et al (2017) Composition of gut microbiota in obese and normal weight Mexican school-age children and its association with metabolic traits. *Pediatric Obesity*
115. Murugesan S, Nirmalkar K, Hoyo-Vadillo C, García-Espitia M, Ramírez-Sánchez D, García-Mena J (2017). Gut microbiome production of short-chain fatty acids and obesity in children. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 1-5.
116. Caporasso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, et al (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *PNAS*, 108, 4516-4522.
117. Li J, Jia H, Cai X, Zhong H, Feng Q, Sunagawa S, et al (2014). An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nature Biotechnology*, 32(8), 834-841.
118. Walters WA, Xu Z, Knight R (2014). Meta-analyses of human gut microbes associated with obesity and IBD. *FEBS Letters*, 588, 4223-4233.
119. Schloss P, Iverson KD, Petrosino JF, and Schloss SJ (2014). The dynamics of a family's gut microbiota reveal variations on a theme. *Microbiome*, 2, 1-13.
120. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunencko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, et al (2009). A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, 457, 480-484.
121. Goodrich JK, Waters JL, Poole AC, Sutter JL, Koren O, Blekhman R, et al (2014). Human Genetics Shape the Gut Microbiome. *Cell*, 159, 789-799.
122. Ussar S, Griffin NW, Bezy O, Bry L, Gordon JI, Kahn CR, et al (2015). Interactions between Gut Microbiota, Host Genetics and Diet Modulate the Predisposition to Obesity and Metabolic Syndrome. *Cell Metabolism*, 22, 1-15.
123. Org E, Parks BW, Joo JW, Emert B, Schwartzman W, Kand EY, et al (2015). Genetic and environmental control of host-gut microbiota interactions. *Genome Research* (Accepted Manuscript).
124. Lim MY, You HJ, Yoon HS, Kwon B, Lee JY, Lee S, et al (2016). The effect of heritability and host genetics on the gut microbiota and metabolic syndrome. *Gut*, 0, 1-8.
125. Levy M, Thaiss CA, Zeevi D, Amit I, Segal E, Elinav E, et al (2015). Microbiota-Modulated Metabolites Shape the Intestinal Microenvironment by Regulating NLRP6 Inflammasome Signaling. *Cell*, 163, 1428-1443.
126. Henao-Mejia J, Elinav E, Jin C, Hao L, Mehal WZ, Strowig T, et al (2012). Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature*, 482, 179-185.
127. Zaki HM, Boyd KL, Vogel P, Kastan MB, Lamkanfi M, and Kanneganti TD (2010). The NLRP3 Inflammasome Protects against Loss of Epithelial Integrity and Mortality during Experimental Colitis.

Immunity, 32, 379-391.

128. DiBaise JK, Frank DN, and Mathur R (2012). Impact of the Gut Microbiota on the Development of Obesity: Current Concepts. *The American Journal of Gastroenterology*, 1(1), 22-27.

129. Cani PD, Osto M, Geurts L, and Everard A (2012). Involvement of gut microbiota in the development of low-grade inflammation and type 2 diabetes associated with obesity. *Gut Microbes* 3, 279-288.

130. Cani PD, Bibiloni R, Fnauk C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, et al. Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice. *Diabetes*, 57, 1470-1481.

131. Boroni AP, Salles TS, Barbosa A, Gouveia MC, and Goncalves RC (2012). Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia. *British Journal of nutrition*, 108, 801-809.

132. Kim KA, Gu W, Lee IA, Joh EH, and Kim DH (2012). High Fat Diet-Induced Gut Microbiota Exacerbates Inflammation and Obesity in Mice via the TLR4 Signaling Pathway. *PLoS ONE*, 7(10), 1-11.

133. Bosshart H and Heinzelmann M. Targeting Bacterial Endotoxin (2007). *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1096, 1-17.

134. Paramel GV, Sirsjö A and Fransén K (2015). Role of Genetic Alterations in the *NLRP3* and *CARD8* Genes in Health and Disease. *Hindawi*, 1-10.

135. Lohman TG, Roche AG, martorell R (1988). Anthropometric standarization reference manual. Champaign, IL: Human Kinetics Book.

136 The fourth report on the diagnosis, evaluation, and treatment of high blood pressure in children and adolescents (2004). *Pediatrics*, 114, 555-586.

137. 1000 Genomes Project Consortium, Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, DePristo MA, Durbin RM, McVean GA, et al (2012). An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*, 491(7422), 56-65.

138. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira M AR, Bender D, Sham PC, et al (2007). PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *American Journal of Human Genetics*, 81(3), 559–575.

139. Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Huntley J, Fierer N, et al (2012). Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina Hiseq and Miseq parforms. *ISME J*, 6 (8), 1621-1624.

140. R. Muniyappa, S. Lee, H. Chen, and M. J. Quon (2008). Current approaches for assessing insulin sensitivity and resistance in vivo: advantages, limitations, and appropriate usage,” *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 294, 15-26.

141. Yoon JM (2014). Dyslipidemia in Children and adolescents: When and How to Diagnose and Treat? *Pediatric Gastroenterology Hepatology Nitrition*, 17 (2), 85-92.

142. Brahm A and Hegele RA. Hypertriglyceridemia (2013). *Nutrients*, 5, 981-1001.

143. Alexander CM, Landsman PB, Teutsch SM, Haffner SM (2003). NCEP-defined metabolic syndrome, diabetes, and prevalence of coronary heart disease among NHANES III participants age 50 years and older. *Diabetes*, 52, 1210-1214.
144. Castillo EH, Borges G, Tlavera JO, Orozco R, VargaAlemán C, Huitrón-Bravo G, et al (2007). Body Mass Index and the Prevalence of Metabolic Syndrome among Children and Adolescents in Two Mexican Population. *Journal of Adolescent Health*, 40 (6), 521-526.
145. S Hadjiyannakis (2005). The metabolic syndrome in children and adolescents. *Paediatric Child Health*, 10(1), 41-47.
146. Collings P, Westgate G, Väistö J, Winjdaele K, Atkin A, Haapala E, et al (2016). Cross-Sectional Associations of Objectively-Measured Physical Activity and Sedentary Time with Body Composition and Cardiorespiratory Fitness in Mid-Childhood: The PANIC Study. *Springer*, 1-12.
147. Greenberg AS and Obin MS (2006). Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 84, 461-465.
148. Wellen KE and Hotamisligil GS (2003). Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue, *Journal of Clinical Investigation*, 112, 1785-1788.
149. Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kom MJ, Caron M, Vidal H, et al (2006). Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *European Cytokine Network*, 17, 4-12.
150. Reilly SM and Satiel AR (2017). Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. *Nature Reviews Endocrinology*, 13 (11), 633-643.
151. van Diepen JA, Stienstra R, Vroegrijk IO, van den Berg SA, Salvatori D, Hooiveld GS, et al (2013). Caspase-1 deficiency in mice reduces intestinal triglyceride absorption and hepatic triglyceride secretion. *Journal of Lipid Research*, 54, 448-456.
152. Bearer CF (1995). Environmental Health Hazards: How Children Are Different from Adults. *Critical Issues For Children and Youths*, 5 (2), 11-26.
153. Deng J, Lin W, Chen Y, Wang X, Yin Z, Yao C, et al (2015). rs3806268 of *NLRP3* gene polymorphism is associated with the development of primary gout. *Internal Journal of Clinic Experimental Pathology*, 8 (10), 13747-13752.
154. Wang S, Fang F, Jin WB, Wang X, Zheng XS (2015). Investigation into the association between *NLRP3* gene polymorphism and susceptibility to type 2 diabetes mellitus. *Genetic Molecular Research*, 14 (4), 17447-17452.
155. <https://www.gtexportal.org/home/>, Septiembre 2015.
156. Nieto-Vazquez I, Fernández-Veledo S, Krämer DK, Vila-Bedmar R, Garcia-Guerra L, Lorenzo M (2008). Insulin resistance associated to obesity: the link TNF-alpha. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 114 (3), 1-10.
157. Mittendorfer B and Sidossis LS (2001). Mechanism for the increase in plasma triglyceride concentration after consumption of short-term, high-carbohydrate diets. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73 (3), 892-899.

158. Cani PD, Biblioni R, Knauf C, Wagen A, Neyrinck AM, Delzenne NM, et al (2008). Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice. *Diabetes*, 57, 1470-1481.
159. Erridge C, Attina T, Spickett CM, and Webb JD (2007). A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation. *American Journal of Clinical Nutrition*, 86, 1286-1292.
160. Radilla-Vázquez RB, Parra-Rojas I, Martínez-Hernández NE, Márquez-Sandoval YF, Illades-Aguilar B, Castro-Alarcón N (2016). Gut Microbiota and Metabolic Endotoxemia in Young Obese Mexican Subjects. *Obesity Facts*, 9, 1-11.
161. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica C, et al (2007). Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes*, 56, 1761-1772.
162. Gurung P, Li B, Malireddi RK, Lamankanfi M, Geiger TL, Kanneganti TD (2015). Chronic TLR Stimulation Controls NLRP3 Inflammasome Activation through IL-10 Mediated Regulation of NLRP3 Expression and Caspase-8 Activation. *Scientific Reports*, 5, 1-10.
163. Plovier H, Everard A, Druart C, Depommier C, Van Hul M, Geurts L, et al (2017). A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. *Nature Medicine*, 25, 107-113.
164. Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, Koeth R, Levison BS, DuGar B (2011). Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature*, 472, 57-63.

13. Anexos.

Anexo 1. Oligos, sondas y anticuerpos

Tabla 1 suplementaria. Oligos y sondas utilizados para expresión relativa de *NLRP3*

Gen	Primer		No. Sonda
NLRP3	Forward	TGA TGT TCT GTG AAG TGC TGA A	16
	Reverse	CGC ACT TTT TGT CTC ATA ATT GA	
HPRT	Forward	TGA CCT TGA TTT ATT TTG CAT ACC	73
	Reverse	CGA GCA AGA CGT TCA GTC CT	

Tabla 2 suplementaria. Anticuerpos utilizados para hibridación tipo Western

Anticuerpo	Clonalidad	Dilución	Compañía
Anti-NLRP3	Monoclonal	1:1,000	Abcam, Cambridge MA, USA
Anti- β -Actina	Monoclonal	1:50,000	GenTex, Irvine CA, USA
Anti-mouse	Monoclonal	1:10,000	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA

Tabla 3 suplementaria. Oligos utilizados para la amplificación de la región V4 del gen 16S ribosomal.

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

OLIGOS HPLC		
Nombre	Secuencia	Código de Barras
FWD_ILLUM	AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACT CTT TCC CTA CAC GAC GCT CTT CCG ATC T	
REV_BC27_ILLUM	CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT AAA GGA ATG TGA CTG GAG TTC AGA CGT GTG CTC TTC CGA TCT	AGGAAT
REV_BC25_ILLUM	CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT AAA TCA GTG TGA CTG GAG TTC AGA CGT GTG CTC TTC CGA TCT	ATCAGT
REV_BC23_ILLUM	CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT AAC CAC TCG TGA CTG GAG TTC AGA CGT GTG CTC TTC CGA TCT	CCACTC
REV_BC22_ILLUM	CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT AAC GTA CGG TGA CTG GAG TTC AGA CGT GTG CTC TTC CGA TCT	CGTACG

Anexo 2. Asociación de los SNPs en NLRP3 con los rasgos más prevalentes del MetS.

A) Análisis de asociación de los SNPs en NLRP3 con la HTG

Gen	SNP	Alelos	Cohorte completa n= 1,214			Niños delgados n=658			Niños obesos n= 556		
			RM	IC (95%)	P	RM	IC (95%)	P	RM	IC (95%)	P
NLRP3	rs12137901	C/T	0.914	0.775-1.292	0.998	1.547	1.084-2.209	0.016	0.572	0.385-0.850	0.006
	rs72771992	G/T	1.290	0.973-1.710	0.077	1.039	0.707-1.526	0.846	1.674	1.077-2.603	0.022
	rs4612666	C/T	1.011	0.776-1.317	0.936	1.166	0.706-1.656	0.253	0.658	0.438-0.989	0.044
	rs79348670	C/T	1.047	0.787-1.392	0.752	1.098	0.742-1.623	0.640	0.993	0.652-1.513	0.974
	rs10925027	A/G	0.814	0.619-1.069	0.138	1.032	0.708-1.505	0.868	0.632	0.415-0.961	0.032

B) Análisis de asociación de los SNPs en NLRP3 con las HDLs disminuidas

Gen	SNP	Alelos	Cohorte completa n= 1,214			Niños delgados n=658			Niños obesos n= 556		
			RM	IC (95%)	P	RM	IC (95%)	P	RM	IC (95%)	P
NLRP3	rs12137901	C/T	0.914	0.711-1.174	0.480	0.979	0.714-1.342	0.894	0.785	0.512-1.204	0.268
	rs72771992	G/T	1.339	1.012-1.773	0.041	1.032	0.728-1.463	0.859	2.265	1.335-3.844	0.002
	rs4612666	C/T	0.959	0.739-1.243	0.750	1.129	0.813-1.567	0.469	0.751	0.480-1.173	0.208
	rs79348670	C/T	1.405	1.056-1.870	0.020	1.268	0.887-1.812	0.193	1.771	1.073-2.922	0.025
	rs10925027	A/G	0.974	0.746-1.273	0.848	1.070	0.762-1.503	0.695	0.627	0.403-0.975	0.038

C) Análisis de asociación de los SNPs en NLRP3 con la percentila de la circunferencia de cintura elevada

Gen	SNP	Alelos	Cohorte completa n= 1,214			Niños delgados n=658			Niños obesos n= 556		
			RM	IC (95%)	Padj	RM	IC (95%)	Padj	RM	IC (95%)	Padj
NLRP3	rs12137901	C/T	1.070	0.736-1.556	0.722	1.822	0.730-4.547	0.199	0.914	0.577-1.446	0.701
	rs72771992	G/T	1.42	0.928-2.172	0.106	2.739	1.160-6.469	0.022	1.165	0.700-1.938	0.556
	rs4612666	C/T	1.004	0.681-1.479	0.985	0.996	0.409-2.425	0.993	1.054	0.657-1.691	0.828
	rs79348670	C/T	0.982	0.649-1.487	0.933	1.704	0.696-4.170	0.243	0.840	0.513-1.374	0.487
	rs10925027	A/G	1.007	0.675-1.503	0.972	2.044	0.680-6.142	0.203	0.893	0.546-1.460	0.653

Los datos muestran el resultado del análisis de asociación con el modelo dominante

RM= Razón de momios; IC= Intervalo de confianza

Prueba estadística: Regresión logística multinomial ajustada por pIMC, edad, sexo, y ancestría; P < 0.05

Anexo 3. Réplica en adultos de las asociaciones de los SNPs rs12137901 y rs72771992 con los rasgos del MetS.

A) Réplica de la asociación de los SNPs rs12137901 y rs72771992 con los rasgos del MetS en adultos

Gen	SNP	Alelos	Cohorte completa n= 1083			Adultos delgados n=494			Niños obesos n= 589		
			RM	IC (95%)	P	RM	IC (95%)	P	RM	IC (95%)	P
NLRP3	rs12137901	C/T	1.337	1.033-1.730	0.027	1.791	1.183-2.712	0.006	1.100	0.783-1.547	0.582
	rs72771992	G/T	1.016	0.753-1.372	0.916	1.029	0.682-1.552	0.892	0.980	0.628-1.528	0.928

Los datos muestran el resultado del análisis de asociación con los rasgos del SM en el modelo dominante

RM= Razón de momios; IC= Intervalo de confianza

Prueba estadística: Regresión logística multinomial ajustada por IMC, edad, sexo, y ancestría; P < 0.05

Anexo 4. Comparación de abundancia relativa de los taxones de la microbiota intestinal entre niños con y sin HTG.

Taxón	Población conjunta Tg> 100mg/dL				Niños normopeso Tg> 100mg/dL				Niños obesos Tg> 100mg/dL			
	No (n= 54)	Si (n= 50)	P	FDR	No (n= 38)	Si (n= 15)	P	FDR	No (n= 16)	Si (n= 35)	P	FDR
p_Actinobacteria	0.010 ± 0.018	0.015 ± 0.054	0.948	0.948	0.008 ± 0.016	0.030 ± 0.098	0.953	0.953	0.015 ± 0.023	0.008 ± 0.012	0.405	0.596
p_Bacteroidetes	0.663 ± 0.167	0.629 ± 0.203	0.307	0.511	0.668 ± 0.179	0.619 ± 0.233	0.430	0.940	0.651 ± 0.141	0.633 ± 0.192	0.700	0.700
p_Firmicutes	0.290 ± 0.154	0.317 ± 0.177	0.234	0.511	0.287 ± 0.167	0.289 ± 0.173	0.737	0.940	0.297 ± 0.124	0.330 ± 0.180	0.417	0.596
p_Proteobacteria	0.032 ± 0.037	0.037 ± 0.082	0.649	0.811	0.033 ± 0.043	0.061 ± 0.148	0.752	0.940	0.027 ± 0.021	0.027 ± 0.014	0.477	0.596
p_Verrucomicrobia	0.006 ± 0.018	0.002 ± 0.007	0.036	0.180	0.004 ± 0.011	0.001 ± 0.002	0.678	0.940	0.010 ± 0.029	0.002 ± 0.008	0.002	0.010
p_Actinobacteria_f_Bifidobacteriaceae	0.010 ± 0.018	0.015 ± 0.054	0.948	0.948	0.008 ± 0.016	0.030 ± 0.098	0.953	0.953	0.015 ± 0.023	0.008 ± 0.012	0.405	0.953
p_Bacteroidetes_f_Bacteroidaceae	0.414 ± 0.239	0.409 ± 0.246	0.902	0.948	0.402 ± 0.251	0.468 ± 0.255	0.418	0.782	0.443 ± 0.214	0.383 ± 0.241	0.330	0.943
p_Bacteroidetes_f_Porphyrionadaceae	0.019 ± 0.020	0.017 ± 0.015	0.876	0.948	0.021 ± 0.021	0.013 ± 0.009	0.186	0.782	0.016 ± 0.017	0.019 ± 0.016	0.239	0.943
p_Bacteroidetes_f_Prevotellaceae	0.186 ± 0.264	0.157 ± 0.228	0.567	0.920	0.202 ± 0.269	0.103 ± 0.230	0.364	0.782	0.147 ± 0.257	0.180 ± 0.227	0.792	1.000
p_Bacteroidetes_f_Rikenellaceae	0.016 ± 0.017	0.012 ± 0.012	0.352	0.774	0.017 ± 0.020	0.011 ± 0.013	0.286	0.782	0.012 ± 0.008	0.013 ± 0.012	0.935	1.000
p_Bacteroidetes_f_S24_7	0.004 ± 0.008	0.008 ± 0.017	0.087	0.435	0.004 ± 0.009	0.003 ± 0.006	0.767	0.887	0.004 ± 0.007	0.011 ± 0.020	0.310	0.943
p_Bacteroidetes_f_Barnesiellaceae	0.007 ± 0.012	0.005 ± 0.010	0.770	0.947	0.008 ± 0.013	0.003 ± 0.007	0.708	0.887	0.005 ± 0.006	0.006 ± 0.011	0.516	0.987
p_Bacteroidetes_f_Odoribacteraceae	0.003 ± 0.003	0.003 ± 0.003	0.696	0.928	0.003 ± 0.003	0.004 ± 0.004	0.843	0.887	0.003 ± 0.002	0.003 ± 0.003	0.839	1.000
p_Bacteroidetes_f_Paraprevotellaceae	0.013 ± 0.023	0.016 ± 0.026	0.644	0.920	0.010 ± 0.016	0.014 ± 0.015	0.269	0.782	0.020 ± 0.035	0.017 ± 0.030	0.700	1.000
p_Firmicutes_f_	0.033 ± 0.021	0.044 ± 0.043	0.332	0.774	0.030 ± 0.019	0.042 ± 0.038	0.430	0.782	0.038 ± 0.025	0.045 ± 0.045	1.000	1.000
p_Firmicutes_f_Clostridiaceae	0.006 ± 0.014	0.009 ± 0.027	0.242	0.691	0.004 ± 0.005	0.004 ± 0.006	0.374	0.782	0.010 ± 0.025	0.010 ± 0.032	0.968	1.000
p_Firmicutes_f_Lachnospiraceae	0.085 ± 0.047	0.101 ± 0.060	0.143	0.497	0.084 ± 0.051	0.105 ± 0.054	0.093	0.782	0.089 ± 0.039	0.099 ± 0.064	0.839	1.000
p_Firmicutes_f_Ruminococcaceae	0.139 ± 0.109	0.125 ± 0.080	0.639	0.920	0.143 ± 0.119	0.120 ± 0.095	0.580	0.887	0.130 ± 0.083	0.127 ± 0.074	0.951	1.000
p_Firmicutes_f_Veillonellaceae	0.023 ± 0.029	0.034 ± 0.034	0.067	0.435	0.022 ± 0.027	0.014 ± 0.014	0.385	0.782	0.024 ± 0.033	0.043 ± 0.036	0.054	0.540
p_Firmicutes_f_Erysipelotrichaceae	0.004 ± 0.006	0.005 ± 0.006	0.387	0.774	0.003 ± 0.005	0.003 ± 0.003	0.737	0.887	0.005 ± 0.007	0.006 ± 0.007	0.626	1.000
p_Proteobacteria_f_Alcaligenaceae	0.016 ± 0.016	0.016 ± 0.012	0.558	0.920	0.016 ± 0.014	0.015 ± 0.014	0.828	0.887	0.018 ± 0.019	0.016 ± 0.011	0.543	0.987
p_Proteobacteria_f_Desulfovibrionaceae	0.003 ± 0.005	0.002 ± 0.004	0.805	0.947	0.003 ± 0.005	0.002 ± 0.002	0.527	0.878	0.002 ± 0.003	0.003 ± 0.005	0.429	0.953
p_Proteobacteria_f_Enterobacteriaceae	0.011 ± 0.028	0.016 ± 0.083	0.149	0.496	0.013 ± 0.033	0.042 ± 0.152	0.295	0.782	0.007 ± 0.007	0.004 ± 0.005	0.201	0.943
p_Proteobacteria_f_Pasteurellaceae	0.001 ± 0.004	0.003 ± 0.007	0.074	0.435	0.002 ± 0.004	0.002 ± 0.003	0.396	0.782	0.001 ± 0.001	0.004 ± 0.009	0.109	0.727
p_Verrucomicrobia_f_Verrucomicrobiaceae	0.006 ± 0.018	0.002 ± 0.007	0.036	0.435	0.004 ± 0.011	0.001 ± 0.002	0.678	0.887	0.010 ± 0.029	0.002 ± 0.008	0.002	0.040

Taxón	Población conjunta Tg> 100mg/dL				Niños normopeso Tg> 100mg/dL				Niños obesos Tg> 100mg/dL			
	No (n= 54)	Si (n= 50)	P	FDR	No (n= 38)	Si (n= 15)	P	FDR	No (n= 16)	Si (n= 35)	P	FDR
f_Bifidobacteriaceae_g_Bifidobacterium	0.010 ± 0.018	0.015 ± 0.054	0.948	0.948	0.008 ± 0.016	0.030 ± 0.098	0.953	0.953	0.015 ± 0.023	0.008 ± 0.012	0.405	0.779
f_Bacteroidaceae_g_Bacteroides	0.414 ± 0.239	0.409 ± 0.246	0.902	0.930	0.402 ± 0.251	0.468 ± 0.255	0.418	0.835	0.443 ± 0.214	0.383 ± 0.241	0.330	0.779
f_Porphyromonadaceae_g_Parabacteroides	0.019 ± 0.020	0.017 ± 0.015	0.876	0.930	0.021 ± 0.021	0.013 ± 0.009	0.186	0.835	0.016 ± 0.017	0.019 ± 0.016	0.239	0.779
f_Prevotellaceae_g_Prevotella	0.186 ± 0.264	0.157 ± 0.228	0.567	0.814	0.202 ± 0.269	0.103 ± 0.230	0.364	0.835	0.147 ± 0.257	0.180 ± 0.227	0.792	0.901
f_Rikenellaceae_g_	0.016 ± 0.017	0.012 ± 0.012	0.352	0.774	0.017 ± 0.020	0.011 ± 0.013	0.286	0.835	0.012 ± 0.008	0.013 ± 0.012	0.935	0.964
f_S24_7_g_	0.004 ± 0.008	0.008 ± 0.017	0.087	0.574	0.004 ± 0.009	0.003 ± 0.006	0.767	0.939	0.004 ± 0.007	0.011 ± 0.020	0.310	0.779
f_Barnesiellaceae_g_	0.007 ± 0.012	0.005 ± 0.010	0.770	0.930	0.008 ± 0.013	0.003 ± 0.007	0.708	0.939	0.005 ± 0.006	0.006 ± 0.011	0.516	0.779
f_Odoribacteraceae_g_Odoribacter	0.003 ± 0.003	0.003 ± 0.003	0.696	0.919	0.003 ± 0.003	0.004 ± 0.004	0.843	0.939	0.003 ± 0.002	0.003 ± 0.003	0.839	0.923
f_Paraprevotellaceae_g_Paraprevotella	0.013 ± 0.023	0.016 ± 0.026	0.644	0.886	0.010 ± 0.016	0.014 ± 0.015	0.269	0.835	0.020 ± 0.035	0.017 ± 0.030	0.700	0.888
p_Firmicutes_f_g_	0.033 ± 0.021	0.044 ± 0.043	0.332	0.774	0.030 ± 0.019	0.042 ± 0.038	0.430	0.835	0.038 ± 0.025	0.045 ± 0.045	1.000	1.000
f_Clostridiaceae_g_Clostridium	0.003 ± 0.004	0.004 ± 0.007	0.219	0.657	0.003 ± 0.005	0.004 ± 0.005	0.364	0.835	0.003 ± 0.004	0.004 ± 0.008	0.670	0.884
f_Clostridiaceae_g_SMB53	0.003 ± 0.014	0.004 ± 0.026	0.118	0.615	0.001 ± 0.001	0.001 ± 0.001	0.333	0.835	0.007 ± 0.025	0.006 ± 0.031	0.477	0.779
f_Lachnospiraceae_g_	0.023 ± 0.017	0.028 ± 0.021	0.147	0.615	0.025 ± 0.019	0.037 ± 0.031	0.193	0.835	0.019 ± 0.012	0.024 ± 0.013	0.155	0.779
f_Lachnospiraceae_g_Blautia	0.009 ± 0.012	0.008 ± 0.009	0.520	0.814	0.011 ± 0.014	0.006 ± 0.004	0.252	0.835	0.006 ± 0.003	0.010 ± 0.011	0.761	0.901
f_Lachnospiraceae_g_Coproccoccus	0.001 ± 0.005	0.001 ± 0.003	0.876	0.930	0.002 ± 0.005	0.001 ± 0.003	0.921	0.950	0.001 ± 0.001	0.001 ± 0.002	0.350	0.779
f_Lachnospiraceae_g_Dorea	0.001 ± 0.001	0.003 ± 0.006	0.255	0.690	0.001 ± 0.001	0.002 ± 0.002	0.874	0.939	0.001 ± 0.001	0.003 ± 0.007	0.180	0.779
f_Lachnospiraceae_g_Lachnobacterium	0.002 ± 0.005	0.006 ± 0.014	0.394	0.808	0.002 ± 0.005	0.006 ± 0.021	0.465	0.853	0.003 ± 0.004	0.005 ± 0.010	0.372	0.779
f_Lachnospiraceae_g_Lachnospira	0.011 ± 0.010	0.015 ± 0.014	0.416	0.808	0.011 ± 0.012	0.011 ± 0.013	0.580	0.939	0.011 ± 0.006	0.016 ± 0.014	0.383	0.779
f_Lachnospiraceae_g_Roseburia	0.037 ± 0.030	0.040 ± 0.041	0.815	0.930	0.031 ± 0.023	0.042 ± 0.028	0.167	0.835	0.049 ± 0.039	0.040 ± 0.045	0.310	0.779
f_Ruminococcaceae_g_	0.046 ± 0.040	0.050 ± 0.033	0.272	0.690	0.048 ± 0.045	0.048 ± 0.038	0.722	0.939	0.040 ± 0.026	0.050 ± 0.032	0.301	0.779
f_Ruminococcaceae_g_Faecalibacterium	0.058 ± 0.048	0.057 ± 0.051	0.524	0.814	0.055 ± 0.043	0.059 ± 0.055	0.782	0.939	0.064 ± 0.059	0.056 ± 0.050	0.465	0.779
f_Ruminococcaceae_g_Ruminococcus	0.036 ± 0.088	0.018 ± 0.021	0.507	0.814	0.041 ± 0.100	0.013 ± 0.014	0.149	0.835	0.025 ± 0.048	0.021 ± 0.024	0.776	0.901
f_Veillonellaceae_g_Dialister	0.015 ± 0.025	0.027 ± 0.035	0.214	0.657	0.018 ± 0.028	0.007 ± 0.012	0.221	0.835	0.010 ± 0.014	0.035 ± 0.039	0.044	0.594
f_Veillonellaceae_g_Megamonas	0.003 ± 0.017	0.002 ± 0.004	0.040	0.574	0.000 ± 0.002	0.002 ± 0.006	0.108	0.835	0.008 ± 0.031	0.001 ± 0.004	0.322	0.779
f_Veillonellaceae_g_Phascolarctobacterium	0.004 ± 0.009	0.006 ± 0.010	0.886	0.930	0.004 ± 0.007	0.005 ± 0.009	0.722	0.939	0.005 ± 0.013	0.006 ± 0.011	0.919	0.964
f_Erysipelotrichaceae_g_	0.003 ± 0.002	0.003 ± 0.003	0.558	0.814	0.002 ± 0.002	0.003 ± 0.003	0.767	0.939	0.003 ± 0.003	0.003 ± 0.004	0.543	0.779
f_Erysipelotrichaceae_g_Eubacterium	0.001 ± 0.004	0.002 ± 0.004	0.058	0.574	0.001 ± 0.004	0.001 ± 0.001	0.258	0.835	0.002 ± 0.005	0.002 ± 0.005	0.521	0.779
f_Alcaligenaceae_g_Sutterella	0.016 ± 0.016	0.016 ± 0.012	0.558	0.814	0.016 ± 0.014	0.015 ± 0.014	0.828	0.939	0.018 ± 0.019	0.016 ± 0.011	0.543	0.779
f_Desulfovibrionaceae_g_Bilophila	0.001 ± 0.002	0.001 ± 0.001	0.810	0.930	0.001 ± 0.002	0.001 ± 0.000	0.813	0.939	0.001 ± 0.001	0.001 ± 0.001	0.584	0.803
f_Desulfovibrionaceae_g_Desulfovibrio	0.002 ± 0.004	0.001 ± 0.004	0.183	0.657	0.002 ± 0.004	0.001 ± 0.002	0.882	0.939	0.001 ± 0.002	0.002 ± 0.004	0.054	0.594
f_Enterobacteriaceae_g_	0.011 ± 0.028	0.016 ± 0.083	0.149	0.615	0.013 ± 0.033	0.042 ± 0.152	0.295	0.835	0.007 ± 0.007	0.004 ± 0.005	0.201	0.779
f_Pasteurellaceae_g_	0.001 ± 0.004	0.003 ± 0.007	0.074	0.574	0.002 ± 0.004	0.002 ± 0.003	0.396	0.835	0.001 ± 0.001	0.004 ± 0.009	0.109	0.779
f_Verrucomicrobiaceae_g_Akkermansia	0.006 ± 0.018	0.002 ± 0.007	0.036	0.574	0.004 ± 0.011	0.001 ± 0.002	0.678	0.939	0.010 ± 0.029	0.002 ± 0.008	0.002	0.066

Taxón	Población conjunta Tg> 100mg/dL				Niños normopeso Tg> 100mg/dL				Niños obesos Tg> 100mg/dL			
	No (n= 54)	Si (n= 50)	P	FDR	No (n= 38)	Si (n= 15)	P	FDR	No (n= 16)	Si (n= 35)	P	FDR
g_Bifidobacterium_s_	0.003 ± 0.004	0.008 ± 0.041	0.663	0.886	0.002 ± 0.003	0.021 ± 0.074	0.722	0.904	0.004 ± 0.005	0.003 ± 0.006	0.216	0.698
g_Bifidobacterium_s_adolescentis	0.007 ± 0.017	0.006 ± 0.016	0.765	0.886	0.006 ± 0.014	0.010 ± 0.025	0.843	0.904	0.011 ± 0.022	0.005 ± 0.009	0.919	0.958
g_Bacteroides_s_	0.320 ± 0.188	0.316 ± 0.201	0.886	0.886	0.309 ± 0.195	0.338 ± 0.199	0.650	0.904	0.347 ± 0.172	0.306 ± 0.204	0.477	0.767
g_Bacteroides_s_coprophilus	0.001 ± 0.006	0.005 ± 0.018	0.615	0.886	0.001 ± 0.008	0.007 ± 0.021	0.205	0.904	0.000 ± 0.000	0.004 ± 0.018	0.561	0.767
g_Bacteroides_s_eggerthii	0.012 ± 0.035	0.003 ± 0.005	0.777	0.886	0.005 ± 0.016	0.005 ± 0.009	0.737	0.904	0.029 ± 0.057	0.002 ± 0.002	0.077	0.539
g_Bacteroides_s_fragilis	0.003 ± 0.006	0.001 ± 0.002	0.111	0.569	0.003 ± 0.007	0.002 ± 0.003	0.843	0.904	0.003 ± 0.004	0.001 ± 0.002	0.049	0.454
g_Bacteroides_s_ovatus	0.022 ± 0.039	0.015 ± 0.017	0.585	0.886	0.021 ± 0.038	0.019 ± 0.021	0.722	0.904	0.025 ± 0.044	0.013 ± 0.015	0.320	0.751
g_Bacteroides_s_plebeius	0.007 ± 0.035	0.039 ± 0.099	0.007	0.294	0.010 ± 0.041	0.059 ± 0.123	0.044	0.904	0.000 ± 0.000	0.031 ± 0.087	0.009	0.189
g_Bacteroides_s_uniformis	0.048 ± 0.050	0.029 ± 0.032	0.122	0.569	0.052 ± 0.056	0.038 ± 0.043	0.678	0.904	0.039 ± 0.032	0.026 ± 0.027	0.123	0.621
g_Parabacteroides_s_	0.016 ± 0.020	0.015 ± 0.014	0.649	0.886	0.017 ± 0.021	0.010 ± 0.007	0.418	0.904	0.013 ± 0.017	0.017 ± 0.016	0.133	0.621
g_Parabacteroides_s_distasonis	0.003 ± 0.004	0.002 ± 0.003	0.326	0.775	0.004 ± 0.005	0.002 ± 0.003	0.554	0.904	0.003 ± 0.003	0.002 ± 0.003	0.417	0.767
g_Prevotella_s_copri	0.180 ± 0.258	0.157 ± 0.228	0.780	0.886	0.195 ± 0.261	0.103 ± 0.230	0.490	0.904	0.145 ± 0.258	0.180 ± 0.227	0.641	0.816
g_Prevotella_s_stercorea	0.006 ± 0.019	0.000 ± 0.000	0.825	0.886	0.007 ± 0.022	0.000 ± 0.000	0.621	0.904	0.002 ± 0.007	0.000 ± 0.000	0.583	0.767
f_Rikenellaceae_g_s_	0.016 ± 0.017	0.012 ± 0.012	0.352	0.778	0.017 ± 0.020	0.011 ± 0.013	0.286	0.904	0.012 ± 0.008	0.013 ± 0.012	0.935	0.958
f_S24_7_g_s_	0.004 ± 0.008	0.008 ± 0.017	0.087	0.569	0.004 ± 0.009	0.003 ± 0.006	0.767	0.904	0.004 ± 0.007	0.011 ± 0.020	0.310	0.751
f_Barnesiellaceae_g_s_	0.007 ± 0.012	0.005 ± 0.010	0.770	0.886	0.008 ± 0.013	0.003 ± 0.007	0.708	0.904	0.005 ± 0.006	0.006 ± 0.011	0.516	0.767
g_Odoribacter_s_	0.003 ± 0.003	0.003 ± 0.003	0.696	0.886	0.003 ± 0.003	0.004 ± 0.004	0.843	0.904	0.003 ± 0.002	0.003 ± 0.003	0.839	0.927
g_Paraprevotella_s_	0.013 ± 0.023	0.016 ± 0.026	0.644	0.886	0.010 ± 0.016	0.014 ± 0.015	0.269	0.904	0.020 ± 0.035	0.017 ± 0.030	0.700	0.840
p_Firmicutes_f_g_s_	0.033 ± 0.021	0.044 ± 0.043	0.332	0.775	0.030 ± 0.019	0.042 ± 0.038	0.430	0.904	0.038 ± 0.025	0.045 ± 0.045	1.000	1.000
g_Clostridium_s_	0.003 ± 0.004	0.004 ± 0.007	0.219	0.657	0.003 ± 0.005	0.004 ± 0.005	0.364	0.904	0.003 ± 0.004	0.004 ± 0.008	0.670	0.828
g_SMB53_s_	0.003 ± 0.014	0.004 ± 0.026	0.118	0.569	0.001 ± 0.001	0.001 ± 0.001	0.333	0.904	0.007 ± 0.025	0.006 ± 0.031	0.477	0.767
f_Lachnospiraceae_g_s_	0.023 ± 0.017	0.028 ± 0.021	0.147	0.569	0.025 ± 0.019	0.037 ± 0.031	0.193	0.904	0.019 ± 0.012	0.024 ± 0.013	0.155	0.651
g_Blautia_s_	0.009 ± 0.012	0.008 ± 0.009	0.520	0.886	0.011 ± 0.014	0.006 ± 0.004	0.252	0.904	0.006 ± 0.003	0.010 ± 0.011	0.761	0.881
g_Coproccoccus_s_eutactus	0.001 ± 0.005	0.001 ± 0.003	0.876	0.886	0.002 ± 0.005	0.001 ± 0.003	0.921	0.921	0.001 ± 0.001	0.001 ± 0.002	0.350	0.766
g_Dorea_s_	0.001 ± 0.001	0.003 ± 0.006	0.255	0.714	0.001 ± 0.001	0.002 ± 0.002	0.874	0.904	0.001 ± 0.001	0.003 ± 0.007	0.180	0.687
g_Lachnobacterium_s_	0.002 ± 0.005	0.006 ± 0.014	0.394	0.827	0.002 ± 0.005	0.006 ± 0.021	0.465	0.904	0.003 ± 0.004	0.005 ± 0.010	0.372	0.766
g_Lachnospira_s_	0.011 ± 0.010	0.015 ± 0.014	0.416	0.832	0.011 ± 0.012	0.011 ± 0.013	0.580	0.904	0.011 ± 0.006	0.016 ± 0.014	0.383	0.766
g_Roseburia_s_	0.037 ± 0.030	0.040 ± 0.041	0.815	0.886	0.031 ± 0.023	0.042 ± 0.028	0.167	0.904	0.049 ± 0.039	0.040 ± 0.045	0.310	0.751
f_Ruminococcaceae_g_s_	0.046 ± 0.040	0.050 ± 0.033	0.272	0.714	0.048 ± 0.045	0.048 ± 0.038	0.722	0.904	0.040 ± 0.026	0.050 ± 0.032	0.301	0.751
g_Faecalibacterium_s_prausnitzii	0.058 ± 0.048	0.057 ± 0.051	0.524	0.886	0.055 ± 0.043	0.059 ± 0.055	0.782	0.904	0.064 ± 0.059	0.056 ± 0.050	0.465	0.767
g_Ruminococcus_s_	0.036 ± 0.088	0.018 ± 0.021	0.507	0.886	0.041 ± 0.100	0.013 ± 0.014	0.149	0.904	0.025 ± 0.048	0.021 ± 0.024	0.776	0.881
g_Dialister_s_	0.015 ± 0.025	0.027 ± 0.035	0.214	0.657	0.018 ± 0.028	0.007 ± 0.012	0.221	0.904	0.010 ± 0.014	0.035 ± 0.039	0.044	0.454
g_Megamonas_s_	0.003 ± 0.017	0.002 ± 0.004	0.040	0.560	0.000 ± 0.002	0.002 ± 0.006	0.108	0.904	0.008 ± 0.031	0.001 ± 0.004	0.322	0.751
g_Phascalarctobacterium_s_	0.004 ± 0.009	0.006 ± 0.010	0.886	0.886	0.004 ± 0.007	0.005 ± 0.009	0.722	0.904	0.005 ± 0.013	0.006 ± 0.011	0.919	0.958
f_Erysipelotrichaceae_g_s_	0.003 ± 0.002	0.003 ± 0.003	0.558	0.886	0.002 ± 0.002	0.003 ± 0.003	0.767	0.904	0.003 ± 0.003	0.003 ± 0.004	0.543	0.767
g_Eubacterium_s_biforme	0.001 ± 0.004	0.002 ± 0.004	0.058	0.569	0.001 ± 0.004	0.001 ± 0.001	0.258	0.904	0.002 ± 0.005	0.002 ± 0.005	0.521	0.767
g_Sutterella_s_	0.016 ± 0.016	0.016 ± 0.012	0.558	0.886	0.016 ± 0.014	0.015 ± 0.014	0.828	0.904	0.018 ± 0.019	0.016 ± 0.011	0.543	0.767
g_Bilophila_s_	0.001 ± 0.002	0.001 ± 0.001	0.810	0.886	0.001 ± 0.002	0.001 ± 0.000	0.813	0.904	0.001 ± 0.001	0.001 ± 0.001	0.584	0.767
g_Desulfovibrio_s_	0.002 ± 0.004	0.001 ± 0.004	0.183	0.641	0.002 ± 0.004	0.001 ± 0.002	0.882	0.904	0.001 ± 0.002	0.002 ± 0.004	0.054	0.454
f_Enterobacteriaceae_g_s_	0.011 ± 0.028	0.016 ± 0.083	0.149	0.569	0.013 ± 0.033	0.042 ± 0.152	0.295	0.904	0.007 ± 0.007	0.004 ± 0.005	0.201	0.698
f_Pasteurellaceae_g_s_	0.001 ± 0.004	0.003 ± 0.007	0.074	0.569	0.002 ± 0.004	0.002 ± 0.003	0.396	0.904	0.001 ± 0.001	0.004 ± 0.009	0.109	0.621
g_Akkermansia_s_muciniphila	0.006 ± 0.018	0.002 ± 0.007	0.036	0.560	0.004 ± 0.011	0.001 ± 0.002	0.678	0.904	0.010 ± 0.029	0.002 ± 0.008	0.002	0.084

