



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE LOS ÁCIDOS BILIARES, LAS  
BACTERIAS INTESTINALES Y LA PRESENCIA DEL SÍNDROME METABÓLICO  
EN POBLACIÓN INFANTIL MEXICANA**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**Mancera Hurtado Yesenia Itzel**

**ASESOR DEL TEMA**

**Dra. Morán Ramos Sofía**



**Ciudad Universitaria, CD. MX., 2022**



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.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**     **Profesor:** CAMACHO ARROYO IGNACIO

**VOCAL:**           **Profesor:** MALDONADO MANJARREZ LUIS ÁNGEL

**SECRETARIO:**   **Profesor:** MORÁN RAMOS SOFÍA

**1er. SUPLENTE:** **Profesor:** MARTIN FUENTES RUTH EDITH

**2° SUPLENTE:**   **Profesor:** CERBÓN CERVANTES MARCO ANTONIO

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Unidad de Genómica de Poblaciones aplicada a la Salud, INMEGEN Periférico Sur No. 4809, Col. Arenal Tepepan, C.P. 14510, Alcaldía Tlalpan, en México, CDMX

## **ASESOR DEL TEMA:**

Dra. Morán Ramos Sofía

## **SUSTENTANTE (S):**

Mancera Hurtado Yesenia Itzel

## Índice

<b>Lista de abreviaturas</b> .....	<b>5</b>
<b>Lista de Figuras</b> .....	<b>8</b>
<b>Lista de tablas</b> .....	<b>9</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>10</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>13</b>
<b>Antecedentes</b> .....	<b>15</b>
<b>Características del Síndrome Metabólico</b> .....	<b>15</b>
Definición y diagnóstico del Síndrome Metabólico.....	15
Epidemiología.....	16
Etiología.....	17
Fisiopatología.....	18
<b>Los ácidos biliares y su influencia en el metabolismo</b> .....	<b>25</b>
Funciones y características de los AB.....	25
Los AB y su papel como moléculas de señalización.....	27
Los AB y su relación con el SM.....	30
Relación entre los AB y las bacterias intestinales.....	31
<b>Las bacterias intestinales y su relación con el SM.</b> .....	<b>33</b>
Composición y funciones de las bacterias intestinales.....	33
Alteraciones en la composición bacteriana intestinal y el SM.....	35
<b>Relación entre los AB, las bacterias intestinales y el metabolismo.</b> .....	<b>37</b>
<b>Relación de las bacterias intestinales y los AB con alteraciones metabólicas en población pediátrica</b> .....	<b>37</b>
<b>Justificación</b> .....	<b>40</b>
<b>Hipótesis</b> .....	<b>41</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>41</b>
Objetivos particulares.....	41
<b>Metodología</b> .....	<b>42</b>
Población de estudio.....	42

<b>Criterios de selección .....</b>	<b>42</b>
<b>Datos antropométricos .....</b>	<b>42</b>
<b>Datos clínicos y bioquímicos .....</b>	<b>43</b>
<b>Clasificación del SM infantil .....</b>	<b>44</b>
<b>Análisis de la composición de los AB .....</b>	<b>44</b>
<b>Análisis de la composición de las bacterias intestinales .....</b>	<b>45</b>
<b>Análisis estadístico .....</b>	<b>49</b>
<b><i>Resultados y discusión.....</i></b>	<b>51</b>
<b>Características clínicas de la población.....</b>	<b>51</b>
<b>Diferencias en el perfil sérico de AB y su relación con el SM.....</b>	<b>53</b>
<b>Caracterización de las bacterias intestinales .....</b>	<b>57</b>
<b>Estudio de la composición de las bacterias intestinales a nivel taxonómico.....</b>	<b>59</b>
<b>Relación entre la microbiota intestinal y factores asociados al SM. ....</b>	<b>62</b>
<b>Relación entre las bacterias intestinales y los AB .....</b>	<b>63</b>
<b><i>Conclusiones .....</i></b>	<b>68</b>
<b><i>Perspectivas.....</i></b>	<b>69</b>
<b><i>Referencias .....</i></b>	<b>71</b>
<b><i>Apéndice (Contenido adicional de trabajo).....</i></b>	<b>84</b>
<b>Anexo 1: Influencia del sexo en factores metabólicos y en la composición de los AB .....</b>	<b>84</b>
<b>Anexo 2: Relación entre los factores metabólicos y los AB.....</b>	<b>86</b>
<b>Anexo 3: Relación entre los factores metabólicos y taxones pertenecientes al orden Clostridiales .....</b>	<b>86</b>

## Lista de abreviaturas

<b>Abreviaturas</b>	<b>Significado</b>
<b>12<math>\alpha</math>-OH</b>	12 $\alpha$ -Hidroxilados
<b>A(G)C</b>	Ácido Glicocólico
<b>A(G)DC</b>	Ácido Glicodesoxicólico
<b>A(G)LC</b>	Ácido Glicolitocólico
<b>A(G)QDC</b>	Ácido Glicoquenodesoxicólico
<b>A(G)UDC</b>	Ácido Glicoursodesoxicólico
<b>A(T)C</b>	Ácido Taurocólico
<b>A(T)DC</b>	Ácido Taurodesoxicólico
<b>A(T)LC</b>	Ácido Taurolitocólico
<b>A(T)QDC</b>	Ácido Tauroquenodesoxicólico
<b>AB</b>	Ácidos Biliares
<b>AC</b>	Ácido Cólico
<b>ADC</b>	Ácido Desoxicólico
<b>AGCC</b>	ácidos Grasos de Cadena Corta
<b>AGL</b>	Ácidos grasos libres
<b>Akt</b>	Proteína cinasa B
<b>ALC</b>	Ácido Litocólico
<b>ALT</b>	Alanino aminotransferasa
<b>Ang II</b>	Angiotensina II
<b>AP-1</b>	Activador de proteína 1
<b>Apo</b>	Apolipoproteína
<b>AQDC</b>	Ácido Quenodesoxicólico
<b>ASBT</b>	Transportador de ácidos biliares apical dependiente de sodio
<b>AST</b>	Aspartato aminotransferasa
<b>AUDC</b>	Ácido Ursodesoxicólico
<b>BSEP</b>	Bomba de exportación de sales biliares
<b>CETP</b>	Proteína de transferencia de éster de colesterol
<b>c-HDL</b>	Colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad
<b>c-LDL</b>	Colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad
<b>CYP27A1</b>	Esterol-27-hidroxilasa

<b>CYP7A1</b>	Enzima limitante de velocidad colesterol 7 $\alpha$ -hidroxilasa
<b>CYP8B1</b>	Esterol 12 $\alpha$ -hidroxilasa
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>DM2</b>	Diabetes Mellitus tipo 2
<b>FDR</b>	False discovery rate
<b>FGF</b>	Factor de crecimiento de fibroblastos
<b>FOXO1</b>	Forkhead box clase O-1
<b>FXR</b>	Receptor nuclear farnesoide X
<b>GLP-1</b>	Péptido similar a glucagón 1
<b>HOMA-IR</b>	Evaluación del modelo homeostático de resistencia a la insulina
<b>HSB</b>	Hidrolasas de sales biliares
<b>HSDH</b>	Hidroxiesteroide deshidrogenasa
<b>IKK<math>\beta</math></b>	Inhibidor del factor nuclear kappa-B cinasa
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IMC</b>	Índice de masa corporal
<b>IRS</b>	Sustrato de receptor de insulina
<b>JNK</b>	Cinasas c-Jun N-terminal
<b>LDA</b>	Análisis Discriminante Lineal
<b>LPL</b>	Lipoproteína lipasa
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa
<b>NF-K<math>\beta</math></b>	Factor nuclear $\kappa$ B
<b>NTCP</b>	Cotransportador de sodio/taurocolato
<b>OST<math>\alpha/\beta</math></b>	Transportador de solutos orgánicos heterotriméricos
<b>OTU</b>	Unidades Taxonómicas Operacionales
<b>PAD</b>	Presión arterial Diastólica
<b>PAS</b>	Presión arterial Sistólica
<b>PcR</b>	Proteína C reactiva
<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol-3-cinasa
<b>PKC</b>	Proteína cinasa C
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	Receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas

<b>PYY</b>	Péptido YY
<b>QIIME</b>	Quantitative Insights Into Microbial Ecology
<b>RE</b>	Retículo endoplásmico
<b>RI</b>	Resistencia a la Insulina
<b>SHP</b>	Par de dímeros pequeños
<b>SM</b>	Síndrome Metabólico
<b>SPSS</b>	Statistical Package for the Social Sciences
<b>TG</b>	Triglicéridos
<b>TGR-5</b>	Receptor de membrana acoplado a proteína G Takeda, receptor de proteína G-5
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>VLDL</b>	Lipoproteínas de muy baja densidad

## Lista de Figuras

<i>Figura 1. Principales factores asociados al desarrollo del SM.....</i>	<i>16</i>
<i>Figura 2. Vías de señalización de la Insulina .....</i>	<i>19</i>
<i>Figura 3. Principales tejidos en los que participa la insulina .....</i>	<i>20</i>
<i>Figura 4. Vías de señalización alteradas en presencia de la resistencia a la insulina en músculo e hígado. ....</i>	<i>21</i>
<i>Figura 5. Alteración de la resistencia a la insulina hepática en el metabolismo de los lípidos .....</i>	<i>22</i>
<i>Figura 6. Principales mecanismos fisiopatológicos del SM .....</i>	<i>24</i>
<i>Figura 7. Síntesis de los AB en humanos.....</i>	<i>26</i>
<i>Figura 8. Circulación enterohepática mediada por los principales transportadores .....</i>	<i>27</i>
<i>Figura 9. Principales funciones que modulan los receptores de los AB de acuerdo a su localización en diferentes órganos .....</i>	<i>30</i>
<i>Figura 10. Metabolismo microbiano de los AB .....</i>	<i>33</i>
<i>Figura 11. Principales efectos benéficos que realizan los AGCC producidos por las bacterias intestinales .....</i>	<i>35</i>
<i>Figura 12. Alteración en la señalización de insulina debido a los efectos inflamatorios inducidos por LPS .....</i>	<i>36</i>
<i>Figura 13. Análisis de la composición de los AB .....</i>	<i>45</i>
<i>Figura 14. Descripción de la amplificación realizada a la región V4 del gen 16S ribosomal RNA (rRNA) .....</i>	<i>47</i>
<i>Figura 15. Pasos generales realizados en la secuenciación realizada por Illumina MiSeq. ....</i>	<i>48</i>
<i>Figura 16. Esquema general de la metodología empleada. ....</i>	<i>50</i>
<i>Figura 17. Diferencias en la concentración de los distintos grupos de AB .....</i>	<i>54</i>
<i>Figura 18. Influencia de la RI en el aumento de los AB 12<math>\alpha</math>-OH y el ADC.....</i>	<i>56</i>
<i>Figura 19. Gráficas de correlación entre los AB 12<math>\alpha</math>-hidroxilados y el ADC en relación a los parámetros metabólicos que presentaron una asociación significativa.....</i>	<i>57</i>

<b>Figura 20. Gráficas de las diferencias de diversidad <math>\alpha</math> entre el grupo sin SM y con SM.</b>	<b>59</b>
<b>Figura 21. Análisis discriminante lineal (LDA) para evaluar el tamaño del efecto (LEfse), para el estudio de los taxones diferenciados en el grupo sin SM y para el grupo con SM.</b>	<b>61</b>
<b>Figura 22. Análisis de correlación parcial entre los principales taxones diferenciados y los factores de riesgo asociados al SM.</b>	<b>63</b>
<b>Figura 23. Análisis de la correlación entre los AB diferenciados y la diversidad alfa. ..</b>	<b>64</b>
<b>Figura 24. Análisis de correlación de Spearman entre las bacterias enriquecida y los principales AB diferenciados .....</b>	<b>65</b>
<b>Figura 25. Eje SM-Bacterias intestinales-AB.....</b>	<b>69</b>
<b>Figura 26. Futuras perspectivas terapéuticas.....</b>	<b>70</b>

#### **Lista de tablas**

<b>Tabla 1. Estado nutricional en población infantil según los valores de referencia establecidos por la CDC.....</b>	<b>43</b>
<b>Tabla 2. Criterios diagnósticos utilizados en la determinación del SM.....</b>	<b>44</b>
<b>Tabla 3. Descriptivos de la población en el grupo control y en los casos. ....</b>	<b>52</b>
<b>Tabla 4. Análisis de los AB entre el grupo control y el grupo de muestra .....</b>	<b>55</b>

## Resumen

**Antecedentes.** El Síndrome Metabólico (SM) es un grupo de factores de riesgo cardiovascular que están asociados con la resistencia a la insulina (RI) y son impulsados por factores subyacentes. Estos factores comienzan cada vez más en la niñez y están asociados con una alta probabilidad de futuras enfermedades crónicas. Para la determinación del SM infantil existen diversas definiciones en donde la mayoría de los criterios diagnósticos lo asocian con la presencia de 3 o más de los 5 componentes que son: obesidad central, concentraciones elevadas de triglicéridos (TG), bajos niveles de Colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad (c-HDL), presión arterial elevada (sistólica o diastólica) y niveles de glucosa elevados (Burguete-García & Valdés-Villalpando, 2014). Aunque el SM se debe a múltiples factores, se plantea que la disbiosis de las bacterias intestinales, y una composición alterada de los ácidos biliares (AB) puede estar involucrada en la fisiopatología de la enfermedad. Los AB se sintetizan en el hígado a partir del colesterol, generando principalmente ácido cólico (AC) y el ácido quenodesoxicólico (AQDC). Después estos se conjugan, con la finalidad de ser secretados en el duodeno, donde las bacterias intestinales residentes los transforman mediante diferentes reacciones, produciendo principalmente los AB secundarios que son el ácido desoxicólico (ADC) y ácido litocólico (ALC). Además, los AB llevan a cabo acciones de señalización mediante receptores membranales (TGR5) y nucleares (FXR), los cuales se expresan en el hígado y el intestino, así como en otros órganos donde los AB influyen en la regulación del metabolismo de la glucosa, los lípidos y la homeostasis energética (Ridlon et al., 2014). Por ejemplo, en estudios previos el aumento de los AB 12 $\alpha$ -hidroxilados (12 $\alpha$ -OH), se asoció con características clave de la RI, que incluyen niveles más altos de insulina, glucosa y TG, así como concentraciones de c-HDL más bajo (Haeusler et al., 2013). Por otro lado, la alteración en el equilibrio de las bacterias intestinales provoca un estado de disbiosis, el cual se ha asociado con la disminución de bacterias productoras de ácidos grasos de cadena corta, así con un estado de endotoxemia el cual contribuye a una mayor inflamación y está asociado a la RI principal factor del SM (Fan & Pedersen, 2021). De igual forma se ha reportado que la disminución de la diversidad de las bacterias intestinales en población infantil está asociada con estados metabólicos alterados como la obesidad, la RI y el SM (Boulangé et al., 2016). Con base en esto se plantea que una disbiosis de las bacterias intestinales, particularmente una menor diversidad, así como la alteración en la composición de los AB, principalmente en el aumento de los AB 12 $\alpha$ -OH (AC, ADC y sus formas conjugadas), están asociados a la presencia de SM en población infantil.

El presente trabajo tuvo como objetivo analizar las relaciones que existen entre los AB circulantes, la composición bacteriana intestinal y la presencia del SM en población infantil mexicana.

**Metodología.** Se realizó un estudio de caso-control en un total de 100 niños (58 controles sin presencia de SM y 42 casos con presencia de SM). Los niños fueron seleccionados a partir de una cohorte de niños escolares mexicanos (10-13 años). Se realizó análisis de parámetros antropométricos, clínicos y bioquímicos, así como la determinación del perfil de los AB en suero empleando cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS / MS). Para el análisis de la composición bacteriana intestinal se realizó la secuenciación de la región hipervariable V4 del gen 16S rRNA. Para el análisis estadístico se emplearon los programas de Rstudio y SPSS. De acuerdo a la normalidad de las variables se realizó la prueba correspondiente: prueba de t-Student para muestras independientes o U-Mann Whitney. Además, se realizaron correlaciones parciales entre las variables utilizando la prueba de Spearman o Pearson según fuera el caso.

**Resultados.** Al comparar los grupos no se encontraron diferencias significativas en el sexo ni en la edad, sin embargo, el grupo con SM mostró una diferencia significativa en los factores de riesgo característicos del SM: aumentando significativamente circunferencia de cintura ( $p=4.3 \times 10^{-9}$ ), percentil de PAS ( $p=0.001$ ), percentil de PAD ( $p=6.9 \times 10^{-5}$ ), glucosa en ayuno ( $p=0.043$ ), TG séricos ( $p=3.6 \times 10^{-14}$ ) y disminuyendo c-HDL ( $p=3.9 \times 10^{-9}$ ). Además, en otros rasgos metabólicos asociados al SM, hubo un aumento significativo: particularmente, en el percentil de IMC ( $p=3. \times 10^{-8}$ ), el peso ( $p=1.2 \times 10^{-6}$ ), así como en parámetros indicadores de RI como el HOMA-IR ( $p=3.9 \times 10^{-9}$ ) y el índice TG/HDL ( $p=2.45 \times 10^{-15}$ ). Además, se observó que en los niños con SM había un aumento significativo principalmente en 3 grupos de AB: los AB secundarios que incrementaron en un 26.79% ( $p=0.032$ ), los AB  $12\alpha$ -OH en un 34.40% ( $p=0.006$ ) y los AB totales en un 36.48% ( $p=0.035$ ), dentro de estos grupos el ADC fue el único que tuvo un aumento significativo del 115.98% ( $p=0.002$ ). Al evaluar la asociación entre AB diferenciados y los diferentes rasgos particulares del SM, se observó que principalmente el ADC y los AB  $12\alpha$ -OH presentaban un mayor número de correlaciones significativas. El ADC se correlacionó positivamente con los TG séricos ( $\rho=0.322$ ,  $p=0.002$ ), el índice TG/HDL ( $\rho=0.361$ ,  $p=0.0004$ ) y negativamente con el c-HDL ( $\rho=-0.290$ ,  $p=0.021$ ). En cuanto a los AB  $12\alpha$ -OH se correlacionaron positivamente con el índice TG/HDL ( $\rho=0.246$ ,  $p=0.018$ ), los TG séricos ( $\rho=0.233$ ,  $p=0.025$ ) y el HOMA-IR ( $\rho=0.236$ ,  $p=0.024$ ). En el análisis de las bacterias intestinales, al analizar la diversidad  $\alpha$  se encontró que en los niños con SM había

una disminución significativa en el índice de Shannon ( $p=0.001$ ), la riqueza de Chao ( $p=0.006$ ) y las OTUs (Unidades Operacionales Taxonómicas) observadas ( $p=0.007$ ) en comparación con el grupo control. Además, en el grupo con SM se encontraron enriquecidos principalmente los taxones: *Bacteroidetes*, *Bacteroidales*, *Gammaproteobacterias* y *Megamonas*. Llama la atención que, al analizar la relación entre los taxones diferenciados y los factores metabólicos asociados con el SM, principalmente los taxones enriquecidos en el grupo control se correlacionaron negativamente con el índice de TG /c-HDL, particularmente un género no identificado perteneciente al orden *Clostridiales* fue el que presentó un mayor número de correlaciones significativas y negativas con los parámetros metabólicos evaluados. También se analizó la relación entre los taxones enriquecidos en los grupos de estudio y los AB diferenciados donde se observó que principalmente los AB 12 $\alpha$ -OH ( $\rho=-0.209$ ,  $p=0.045$ ) y el ADC ( $\rho=-0.276$ ,  $p=0.007$ ) se correlacionaron negativamente con el género no identificado perteneciente al orden *Clostridiales*.

**Conclusiones.** Se encontró que la RI un importante factor asociado al SM infantil, influye en el aumento de los AB 12 $\alpha$ -OH y el ADC y estos a su vez podrían contribuir a la fisiopatología de la enfermedad. Además, la presencia de RI puede condicionar a una disbiosis caracterizada por una menor diversidad y una alteración de la composición bacteriana, que a su vez está relacionada con los niveles de AB, los cuales están recíprocamente involucrados en la modulación de la composición bacteriana intestinal.

## Introducción

En México el Síndrome Metabólico (SM) es un problema de salud pública, que está asociado con un alto riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares y Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2), las cuales son las principales causas de mortalidad en población adulta mexicana (Peña-Espinoza et al., 2017). De acuerdo con un meta-análisis realizado por *Gutiérrez-Solis et al.*, la prevalencia del SM en adultos mexicanos, varía del 31% al 54%, dependiendo del criterio diagnóstico utilizado. Llama la atención que la prevalencia reportada en México fue superior a la reportada en Estados Unidos (34.2%) y en América latina (24.9%) (Gutiérrez-Solis et al., 2018). En población pediátrica mexicana los pocos estudios que se han realizado reportan que puede variar desde 2.4-45.9%, debido a que no hay una definición consenso y existen diferentes puntos de corte para su diagnóstico (Peña-Espinoza et al., 2017). La patogenia del SM es compleja y aún no está completamente clara. Aunque la RI y la obesidad juegan un papel importante en la fisiopatología de este padecimiento, de manera reciente se ha planteado que las alteraciones en la composición bacteriana intestinal y en el perfil de los AB podrían ser parte de los mecanismos patogénicos.

Se sabe que las bacterias intestinales juegan un papel importante en la salud humana, ya que están involucradas en la digestión, la homeostasis del sistema inmunológico y en la producción de metabolitos (ácidos grasos de cadena corta, AB, etc.) los cuales participan en procesos metabólicos importantes. Por lo que una disbiosis de las bacterias intestinales está asociada con la alteración de procesos fisiológicos importantes y con el desarrollo de ciertas enfermedades crónicas como la obesidad y la DM2 (Festi et al., 2014).

Por otro lado, la alteración en el perfil de los AB, interviene en sus funciones como moléculas de señalización de diferentes receptores los cuales participan en el metabolismo de la glucosa y de los lípidos. Además, en algunos estudios se ha observado que padecimientos como la RI alteran el perfil de los AB (McGlone & Bloom, 2019).

Si bien, tanto los AB como las bacterias intestinales participan en la regulación de procesos metabólicos, aún está poco estudiado cómo estos factores podrían estar involucrados con el desarrollo del SM debido a que resulta complicado establecer una relación causal entre estos factores.

Debido a las complicaciones metabólicas que conlleva el desarrollo del SM en edades cada vez más tempranas, surge la necesidad de investigar más a fondo cómo estos factores fisiopatológicos poco convencionales podrían estar asociados con el SM, por lo que este

estudio será de gran relevancia para investigaciones posteriores que permitan un análisis más detallado del SM, así como el desarrollo de futuras intervenciones y tratamientos para esta afección.

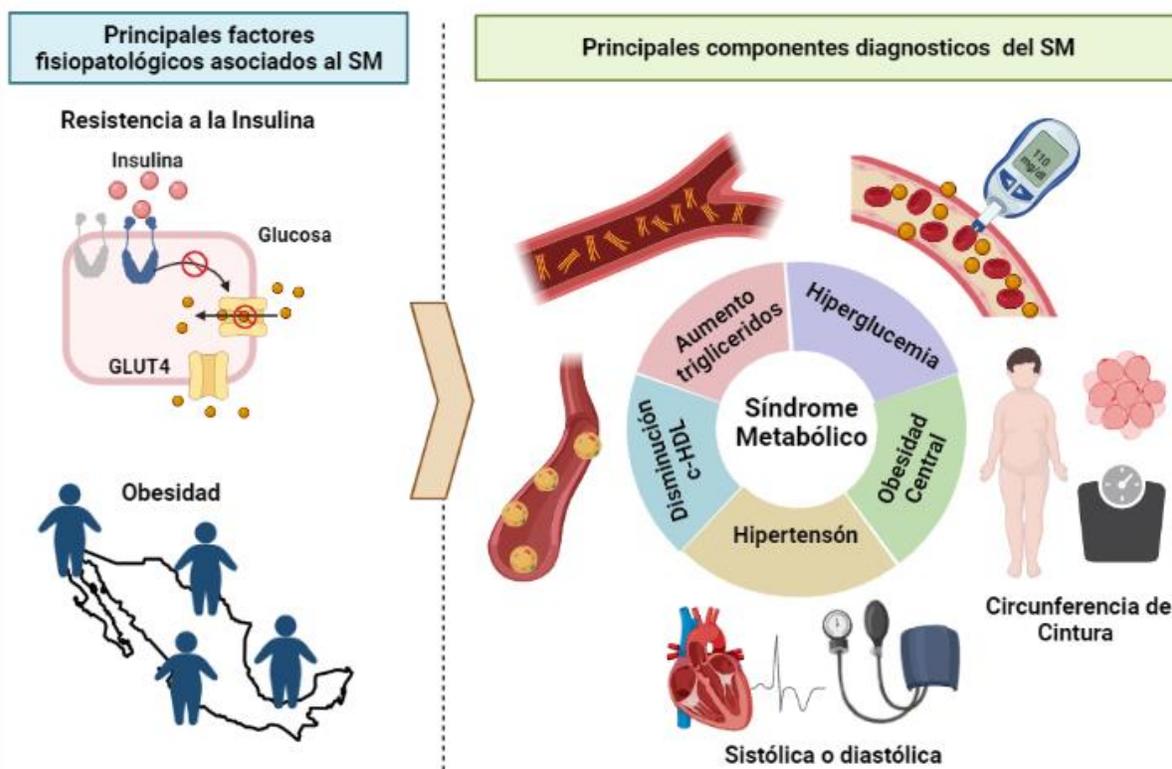
## Antecedentes

### Características del Síndrome Metabólico

#### Definición y diagnóstico del Síndrome Metabólico

El Síndrome Metabólico (SM) es un conjunto de factores metabólicos asociados a la resistencia a la insulina (RI), la obesidad visceral, la inflamación sistémica y la disfunción celular. La presencia del SM puede llevar al desarrollo de enfermedades cardiovasculares y metabólicas, de tal modo que su detección y prevención resultan de suma importancia. Actualmente esta serie de complicaciones se presentan con más frecuencia en la población infantil, llevando a complicaciones más severas como Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2), desde edades tempranas (Rochlani et al., 2017). La definición del SM ha evolucionado conforme al paso del tiempo y ha ido cambiando de acuerdo a las investigaciones realizadas. En población adulta, organizaciones como la Organización Mundial de la Salud (OMS), el Programa Nacional de Educación sobre el Colesterol (NCEP III), la Fundación Internacional de Diabetes (IDF) y el Instituto Nacional del Corazón, los Pulmones y la Sangre (NHLBI), han establecido diversas definiciones para el SM (Al-Hamad & Raman, 2017; Wittcopp & Conroy, 2016). En población infantil el SM no se ha caracterizado bien en términos de criterios, prevalencia o implicaciones clínicas. Aunque existen diversas definiciones y son similares, estas difieren en el punto de corte para varios parámetros. En resumen, estas establecen como SM, aquellos que presenten 3 o más de los 5 factores de riesgo que son; obesidad central, concentraciones elevadas de triglicéridos (TG), niveles bajos de colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad (c-HDL), presión arterial elevada y niveles de glucosa elevados (Figura 1), (Burguete-García & Valdés-Villalpando, 2014).

Entre las principales causas por las que es difícil establecer una definición del SM en población pediátrica se encuentran: la ausencia de una definición consenso en población adulta, el aumento de la RI debido a la pubertad lo que puede producir cambios en procesos metabólicos, además de que de acuerdo a la edad y sexo pueden ocurrir cambios en factores metabólicos como el perfil de lípidos o la adiposidad central, los cuales dificultan establecer un conjunto de valores para su diagnóstico y definición (Wittcopp & Conroy, 2016).



**Figura 1. Principales factores asociados al desarrollo del SM** (Creado en BioRender.com)

## Epidemiología

La prevalencia del SM presenta una amplia variación en todo el mundo debido a factores como la edad, sexo, raza/etnia y criterios diagnósticos utilizados, entre otros. Independientemente de los criterios empleados, la prevalencia de SM es alta y está aumentando en todas las sociedades occidentales, probablemente como resultado de la epidemia de obesidad (Kassi et al., 2011). En población adulta mexicana se encontró que la frecuencia del SM osciló entre el 31-54% dependiendo del criterio diagnóstico utilizado (Gutiérrez-Solis et al., 2018), la cual fue mayor a la reportada en Estados Unidos (34.2%) y en América Latina (24.9%). Además de acuerdo a datos del INEGI, se estimó que un 40% de las muertes en México se deben a alguna enfermedad relacionada con el SM, como lo son, la DM2 (15%), enfermedades isquémicas del corazón (13.4%), enfermedades del hígado (5.4%) y eventos cerebrovasculares (5.2%) (Esteban Aceves Fonseca et al., 2019). En cuanto a la prevalencia del SM en población pediátrica mexicana existen pocos informes al respecto, debido a que no hay una definición consenso y existen diferentes puntos de corte para su diagnóstico, por lo que la prevalencia del SM puede variar en la muestra poblacional. Por ejemplo: en un estudio realizado en el 2015 por *Romero-Velarde E et al.*, en pacientes de la División de Pediatría del Hospital Civil de Guadalajara, conformado por 120 niños y adolescentes con obesidad y con una edad promedio de 10.6 años, la prevalencia fue de 37.5 a 54.5% (Romero-Velarde et al., 2016). En otro estudio

realizado en el 2016 por *Ávila-Curiel A et al.*, que incluyó a 1017 niños escolares del Estado de México, con edades de 6-12 años, se encontró una prevalencia del SM de 43.9% utilizando los criterios del NCEP-ATP III y adaptados por Cook y colaboradores (Ávila et al., 2018). Por otra parte, en un estudio realizado en el 2017 por *Pena-Espinoza et al.*, en 508 niños de 9 a 13 años, de la Ciudad de México, se encontró que la prevalencia del SM en población infantil fue de 2.4-45.9% de acuerdo al criterio utilizado, donde el porcentaje más alto se obtuvo utilizando los criterios de Ferranti y el porcentaje más bajo se obtuvo con los criterios de Weiss. Además, se observó que los componentes más frecuentes fueron bajas concentraciones de c-HDL, concentraciones elevadas de TG y obesidad central, sin embargo, cabe mencionar que las concentraciones elevadas de TG y bajas de c-HDL son característicos de la población mexicana (Peña-Espinoza et al., 2017). Con base en estos estudios, la prevalencia del SM en México se ha estudiado en diferentes regiones del país y puede variar ya sea por los criterios utilizados, la población analizada o la región establecida, sin embargo, la frecuencia del SM en población infantil va en aumento y con ello los riesgos en la salud que conlleva, por lo que es de suma importancia su comprensión (Romero-Velarde et al., 2016).

## **Etiología**

Se piensa que el SM puede estar asociado a múltiples factores causales, incluidos la genética y el origen étnico. Por un lado, la predisposición a la RI y a la obesidad pueden estar contribuyendo a la expresión del fenotipo del SM. Además, se ha reportado una mayor prevalencia del SM en hispanos, en comparación con caucásicos y afroamericanos (Weiss et al., 2013; Huang, 2009; Park et al., 2003).

Dentro de los factores ambientales que se han visto correlacionados con la presencia del SM, está el estrés del entorno en el que se vive, la falta de sueño, las características socioeconómicas y el estilo de vida. Por ejemplo, diferentes estudios han asociado la inactividad física con el desarrollo del SM, pues se ha observado que esta afecta la sensibilidad a la insulina en el músculo esquelético y además puede contribuir al desarrollo de obesidad. De igual forma, los factores dietarios se han correlacionado con el desarrollo del SM, principalmente patrones dietéticos occidentales, que se caracterizan por una mayor ingesta de carnes procesadas, grasas saturadas, granos refinados, sal y azúcares, así como de un bajo consumo de frutas y verduras (Cena & Calder, 2020). El consumo excesivo de fructosa, por ejemplo, a través de bebidas azucaradas, está asociado con el desarrollo del padecimiento, pues podría estar generando una menor sensibilidad a la insulina y una mayor acumulación de ácidos grasos en la circulación (Weiss et al., 2013; Huang, 2009).

Otros factores asociados al desarrollo del SM, son el consumo de ciertos medicamentos. Por ejemplo, algunos antipsicóticos como la clozapina, los antirretrovirales utilizados contra el VIH, así como medicamentos utilizados para las alergias, la depresión y la inflamación pueden inducir aumento de peso, cambios en la presión arterial y alteraciones en los niveles de glucosa en sangre, entre otros. Además, algunas enfermedades también se han asociado como factores de riesgo en el desarrollo del SM, tal es el caso del síndrome de ovario poliquístico, cálculos en los riñones y algunas enfermedades respiratorias (Wittcopp & Conroy, 2016; Weiss et al., 2013; Huang, 2009; Park et al., 2003).

### **Fisiopatología**

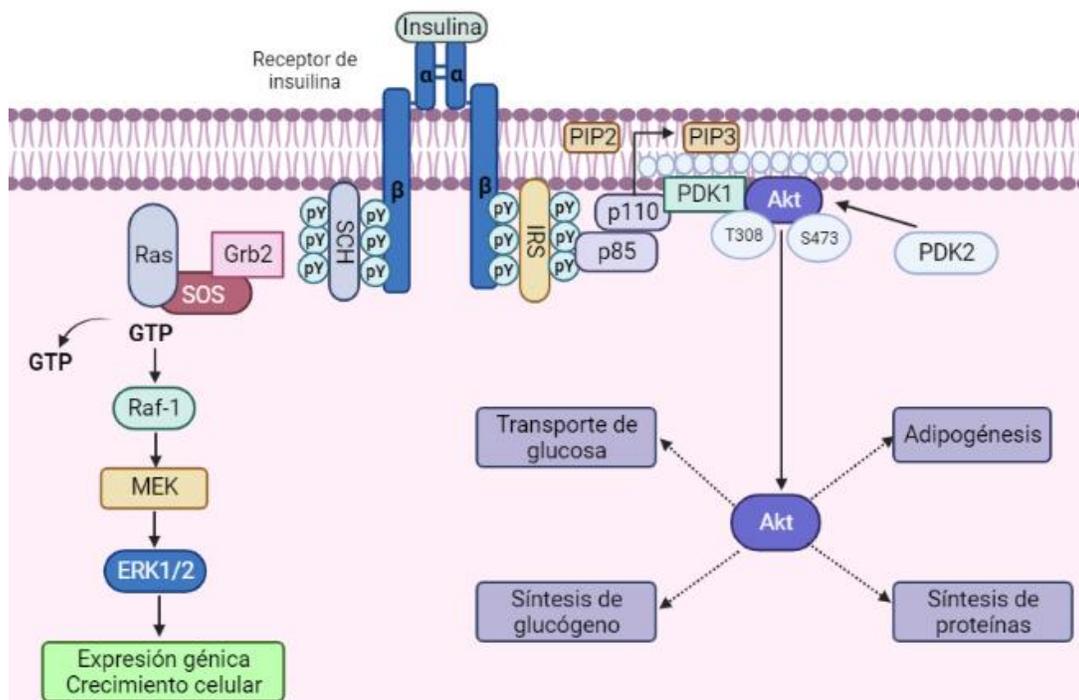
Los mecanismos patogénicos del SM son complejos y aún no están completamente claros. Sin embargo, la RI, la obesidad, el estrés oxidativo, la inflamación, la activación de vías neurohumorales y la adiposidad visceral se han asociado con su desarrollo (Rochlani et al., 2017). Además, se plantea que cambios en la composición de las bacterias intestinales, así como alteraciones en el metabolismo de los ácidos biliares (AB) también puede contribuir a la enfermedad.

### **Resistencia a la insulina.**

#### **Principales funciones de la insulina**

La insulina es una hormona polipeptídica, secretada por las células  $\beta$  pancreáticas. La insulina inicia sus acciones biológicas a través de su unión a receptores específicos. El receptor de insulina, una glucoproteína integral de membrana, ubicado principalmente en tejidos como hígado, músculo esquelético y tejido adiposo, está formado por 2 subunidades  $\alpha$  y dos subunidades  $\beta$ . La subunidad  $\alpha$  se encuentra en la parte extracelular de la membrana y contiene los sitios de unión a la insulina, mientras que la subunidad  $\beta$  contiene una porción extracelular, transmembranal y una intracelular donde se encuentra situado el dominio tirosina cinasa. Al unirse la insulina a la subunidad  $\alpha$  del receptor, provoca cambios conformacionales que activan la subunidad  $\beta$  provocando la autofosforilación de residuos de Tirosina. Los residuos autofosforilados son reconocidos por proteínas adaptadoras, particularmente por el sustrato de receptor de insulina (IRS), el cual forma complejos moleculares y desencadena cascadas de señalización intracelular. La mayoría de las acciones reguladas por la insulina se llevan a cabo principalmente por dos vías: la vía de la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K)/Akt, en la cual se llevan a cabo la mayor parte de sus acciones metabólicas y es la principal vía afectada cuando ocurre la RI, y por otro lado se encuentra la vía de las cinasas activadas por

mitógeno/Ras (MAPK/Ras), en la cual la insulina regula los efectos mitógenos y de expresión genética (Figura 2); (Olivares Reyes & Arellano Plancarte, 2008; Gutiérrez-Rodelo et al., 2017; Savage et al., 2007).

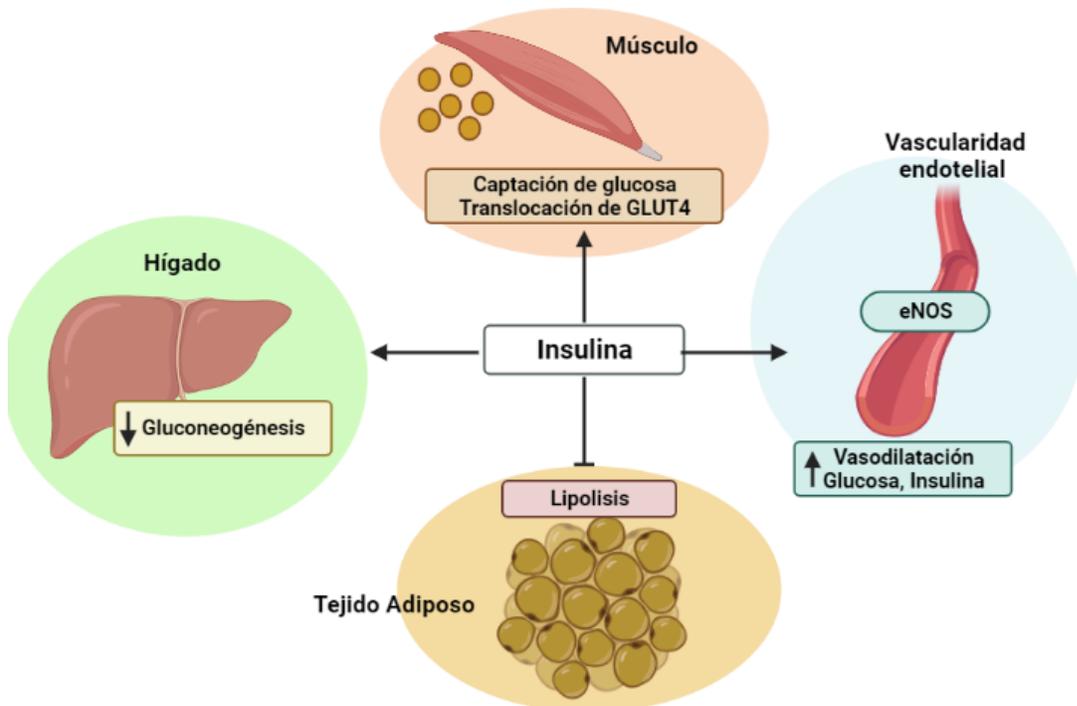


**Figura 2. Vías de señalización de la Insulina** (Creado en BioRender.com). Una vez que se une la insulina a su receptor, ocurre una serie de autofosforilaciones que activan a las proteínas adaptadoras IRS y SCH. IRS está mediando funciones metabólicas a partir de la vía de la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K)/Akt. Mientras que SCH media las funciones de proliferación y crecimiento celular mediante la vía de las cinasas activadas por mitógeno/Ras (MAPK/Ras). Proteína unida al receptor del factor de crecimiento 2 (Grb2), difosfato de guanosina (GDP), trifosfato de guanosina (GTP), factor recambiador de nucleótidos de guanina Son of Sevenless (SOS), cinasa regulada extracelularmente (ERK), cinasa dependiente de fosfoinositidos (PDK2), proteína cinasa B (Akt), (Olivares Reyes & Arellano Plancarte, 2008; Gutiérrez-Rodelo et al., 2017).

La insulina juega un papel importante en varios procesos metabólicos en diferentes tejidos (Figura 3). Por ejemplo, en el músculo esquelético y en el tejido adiposo, la insulina ayuda a la captación de glucosa a través de la translocación del transportador GLUT4 y en el tejido adiposo además inhibe la lipólisis. En el hígado, la insulina disminuye la gluconeogénesis, a través de la cinasa Akt que fosforila al factor transcripcional FoxO1 (forkhead box clase O-1), disminuyendo la expresión de genes implicados en la producción de glucosa, principalmente

fosfoenolpiruvato carboxicinasas y glucosa 6-fosfatasa, de igual forma, en el hígado la insulina también participa en la lipogénesis de novo (Huang, 2009; Savage et al., 2007).

Además la insulina influye en la vascularidad endotelial ya que mediante la vía (PI3K)/Akt, se activa la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), aumentando la producción de óxido nítrico (NO) provocando el aumento del flujo sanguíneo local en los tejidos y con ello aumentando la vasodilatación y el suministro de glucosa e insulina (Huang, 2009). Sin embargo, una menor actividad de Akt disminuye la fosforilación de eNOS, conduciendo a la pérdida del efecto vasodilatador de la insulina.



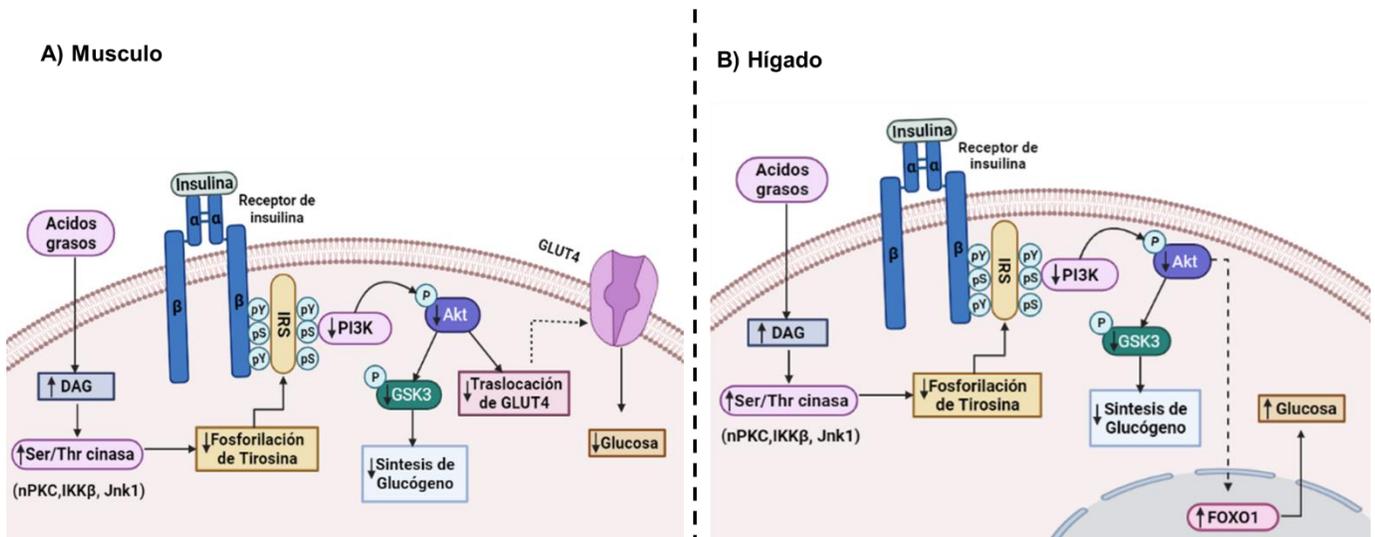
**Figura 3. Principales tejidos en los que participa la insulina** (Creado en BioRender.com)

### **Alteraciones en las funciones de la insulina**

La RI se ha asociado con un estado en el cual las células de los músculos, del tejido adiposo y el hígado no responden de manera adecuada a la insulina, dando como resultado el aumento de la glucosa hepática, una disminución del transporte de glucosa en músculo esquelético y adipocitos, así como alteraciones en el metabolismo de lípidos particularmente en hígado y tejido adiposo. En el SM, la RI se ha propuesto como uno de los principales mecanismos fisiopatológicos, que en parte es impulsado por el exceso de ácidos grasos, derivado de la falta de inhibición de la lipólisis que además es mediada por la insulina (Rochlani et al., 2017; McCracken et al., 2018; Savage et al., 2007).

La disminución de síntesis de glucógeno y el transporte de glucosa en el músculo esquelético se debe a la acumulación de lípidos, lo que resulta en un aumento de intermediarios como el Diacilglicerol (DAG), la acumulación de derivados de acil-CoA, o el aumento de intermediarios inflamatorios. Esto produce una disminución en la fosforilación de Tirosinas de IRS-1 y la inhibición de la PI3K, alterando la señalización de la insulina y sus funciones en el músculo esquelético, como la translocación del transportador de glucosa (GLUT4).

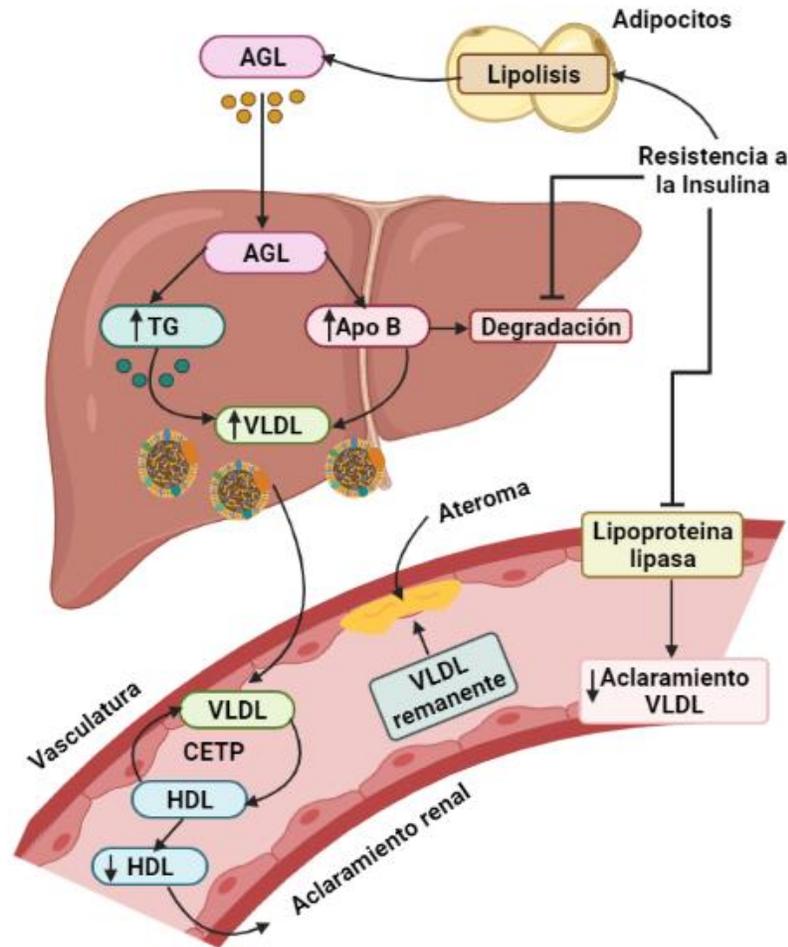
Por otro lado, en un estado de RI la acumulación de ácidos grasos libres (AGL) en el hígado, también promueve la producción de metabolitos como el DAG, que activan a la proteína cinasa C y con ello la fosforilación de serina / treonina de IRS-1, disminuyendo la activación de Akt, lo que conlleva a la producción de glucosa hepática a través de FoxO1 (Figura 4), (Huang, 2009; Savage et al., 2007).



**Figura 4. Vías de señalización alteradas en presencia de la resistencia a la insulina en músculo e hígado.** (Creado en BioRender.com). La acumulación de ácidos grasos libres provoca un aumento de intermediarios lipídicos como el Diacilglicerol (DAG), activando cinasas de serina como IKKβ o Jnk1 que disminuyen la fosforilación de tirosina en IRS, disminuyendo la actividad de Akt, donde dependiendo del tejido: A) En el músculo, provoca una disminución en la translocación del transportador GLUT4 y B) En hígado, conlleva a un aumento de la expresión de FOXO1 y a la gluconeogénesis. Proteína cinasa B (Akt), FOXO1 (forkhead box clase O-1), fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K), proteína cinasa C (PKC), inhibidor del factor nuclear kappa-B cinasa (IKKβ), cinasas c-Jun N-terminal (Jnk-1).

Además, la acumulación de los AGL en el hígado, promueve el ensamblaje y secreción de VLDL, lo que resulta en un aumento de los triglicéridos. Los triglicéridos en VLDL se transfieren a las HDLs y LDLs a través de la acción de la proteína de transferencia de éster de colesterol

(CETP). Formando tanto HDL como LDL enriquecidas en triglicéridos. El HDL enriquecido se elimina más rápido, provocando así su disminución en circulación. (Figura 5). Aunado a esto en un estado de RI, se produce la inhibición de la degradación de Apo B, lo que contribuye al aumento en la síntesis de VLDL (Rochlani et al., 2017; McCracken et al., 2018; Savage et al., 2007; Semenkovich, 2006).



**Figura 5. Alteración de la resistencia a la insulina hepática en el metabolismo de los lípidos** (Creado en BioRender.com). Al inicio de la resistencia a la insulina los AGL aumentan debido a los efectos supresores de la insulina en la inhibición de la lipólisis, los AGL se transportan al hígado, donde la alteración en la señalización de la insulina disminuye la degradación de Apo B. Aumentando la síntesis y secreción de VLDL y TG. De igual forma la inhibición de la lipoproteína lipasa contribuye a disminuir la velocidad de aclaramiento de VLDL, esta se metaboliza en lipoproteínas remanentes que pueden conducir a la formación de un ateroma. Además, la VLDL transfiere sus TG a las HDL. El HDL enriquecido en TG es eliminado más rápidamente, provocando una disminución en los niveles en circulación. Apolipoproteína B (Apo B), ácidos grasos libres (AGL), triglicéridos (TG), proteína de transferencia de éster de colesterol (CETP). (Huang, 2009; Semenkovich, 2006).

## **Activación neurohumoral**

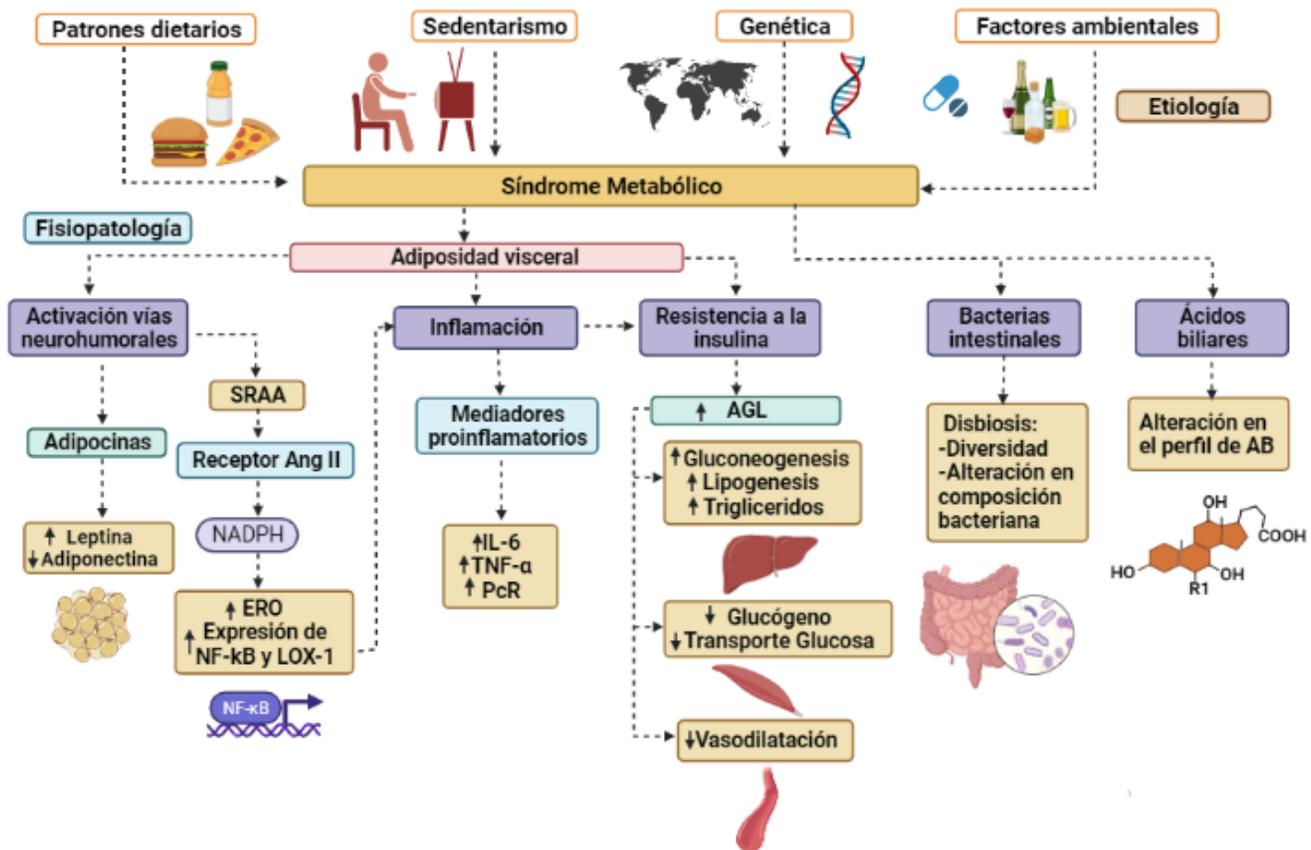
Dentro de los mecanismos fisiopatológicos del SM se incluyen las funciones endócrinas e inmunes de los adipocitos. Alteraciones en las adipocinas liberadas por el tejido adiposo se han asociado con el desarrollo del SM. Una de estas adipocinas es la leptina la cual está involucrada en el control de la ingesta de alimentos, en la sensibilidad a la insulina, en el metabolismo de los lípidos, en la homeostasis energética y en la activación de células inmunitarias como Th1, esto principalmente a través de funciones neuroendócrinas. El aumento de esta adipocina se ha asociado a la presencia de obesidad, RI y como un marcador del SM (Ghadge & Khaire, 2019). Por el contrario, la adiponectina, una adipocina antiinflamatoria implicada en la sensibilización de la insulina, participa en la mejora de la oxidación de lípidos y la vasodilatación, ya que estimula la fosforilación de eNOS. También participa en la inhibición de procesos aterogénicos mediante la inhibición de TNF- $\alpha$ . En contraste su disminución se ha asociado a la presencia de obesidad, DM2 y el SM (Rochlani et al., 2017; McCracken et al., 2018).

Otra vía neurohumoral que contribuye al desarrollo del SM es la activación del sistema renina-angiotensina (SRA). La activación del SRA, conlleva a la formación de la Angiotensina II (Ang II), la cual se ha visto aumentada en factores asociados al SM, como la RI y la obesidad. La Ang II es una de las principales hormonas efectoras del sistema renina-angiotensina y está implicada en procesos fisiológicos como la regulación de la presión arterial y la vasoconstricción. Sin embargo, también se ha asociado con procesos inflamatorios, de disfunción endotelial, hipertensión e insuficiencia cardíaca. Además a partir de la activación del receptor tipo 1, la Ang II activa la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH), promoviendo la producción de especies reactivas de oxígeno, que están implicadas en la inflamación vascular y la hipertensión (Figura 6), (Rochlani et al., 2017; McCracken et al., 2018). Además, Ang II participa en la RI a través de la alteración en la señalización de IRS-1 (Vaněčková et al., 2014; Mehta & Griendling, 2007).

## **Vías de inflamación**

El SM se ha asociado con un estado proinflamatorio que contribuye con algunas manifestaciones clínicas del padecimiento. Algunos de los mediadores proinflamatorios involucrados son la interleucina 6 (IL-6), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y la proteína C reactiva (PcR). Por ejemplo, el TNF- $\alpha$ , se ha asociado con la RI y la obesidad. Particularmente el TNF- $\alpha$  es secretado por los macrófagos dentro del tejido adiposo, en respuesta a un aumento de la masa del tejido adiposo y puede influir en la fosforilación e

inactivación de receptores de insulina en este tejido. Esto promueve la lipólisis y con ello el aumento de AGL los cuales inhiben la liberación de adiponectina y están involucrados en el desarrollo de la RI. Además, el TNF- $\alpha$  en conjunto con la IL-6 influyen en la presencia de RI, mediante la activación de las rutas de la MAPK, la proteína quinasa C y en la degradación del sustrato del IRS-1 (Rochlani et al., 2017; McCracken et al., 2018; Kassi et al., 2011). La IL-6 es una citocina producida por el tejido adiposo, los leucocitos y las células endoteliales, es una citocina proinflamatoria la cual también participa en la respuesta hepática de fase aguda, contención de patógenos o reclutamiento de mecanismos de defensas. Además, la IL-6 regula la producción del principal mediador en la respuesta hepática de fase aguda, que es la PcR. Debido a esta relación la IL-6 y la PcR se han asociado como marcadores de inflamación, los cuales se han observado aumentados en niños y adolescentes con obesidad y SM (Figura 6), (Wisse, 2004; Pradhan et al., 2001).



**Figura 6. Principales mecanismos fisiopatológicos del SM** (Creado en BioRender.com). Ácidos Grasos Libres (AGL), Sistema Renina angiotensina-aldosterona (SRAA), Proteína C Reactiva (PcR), Receptor 1 de lipoproteína de baja densidad oxidada similar a lectina (LOX-1), nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH), (Rochlani et al., 2017).

## **Los ácidos biliares y su influencia en el metabolismo**

Los AB son moléculas endocrinas que además de facilitar la absorción de nutrientes liposolubles regulan numerosos procesos metabólicos involucrados en la homeostasis de la glucosa y de los lípidos. Las acciones de señalización de los AB están mediadas a través de receptores específicos unidos a la membrana y nucleares. Estos receptores no solo se expresan en tejidos dentro de la circulación enterohepática como el hígado y el intestino, sino también en otros órganos donde los AB ejercen sus acciones sistémicas y pueden influir en la presencia del SM (McGlone & Bloom, 2019).

### **Funciones y características de los AB**

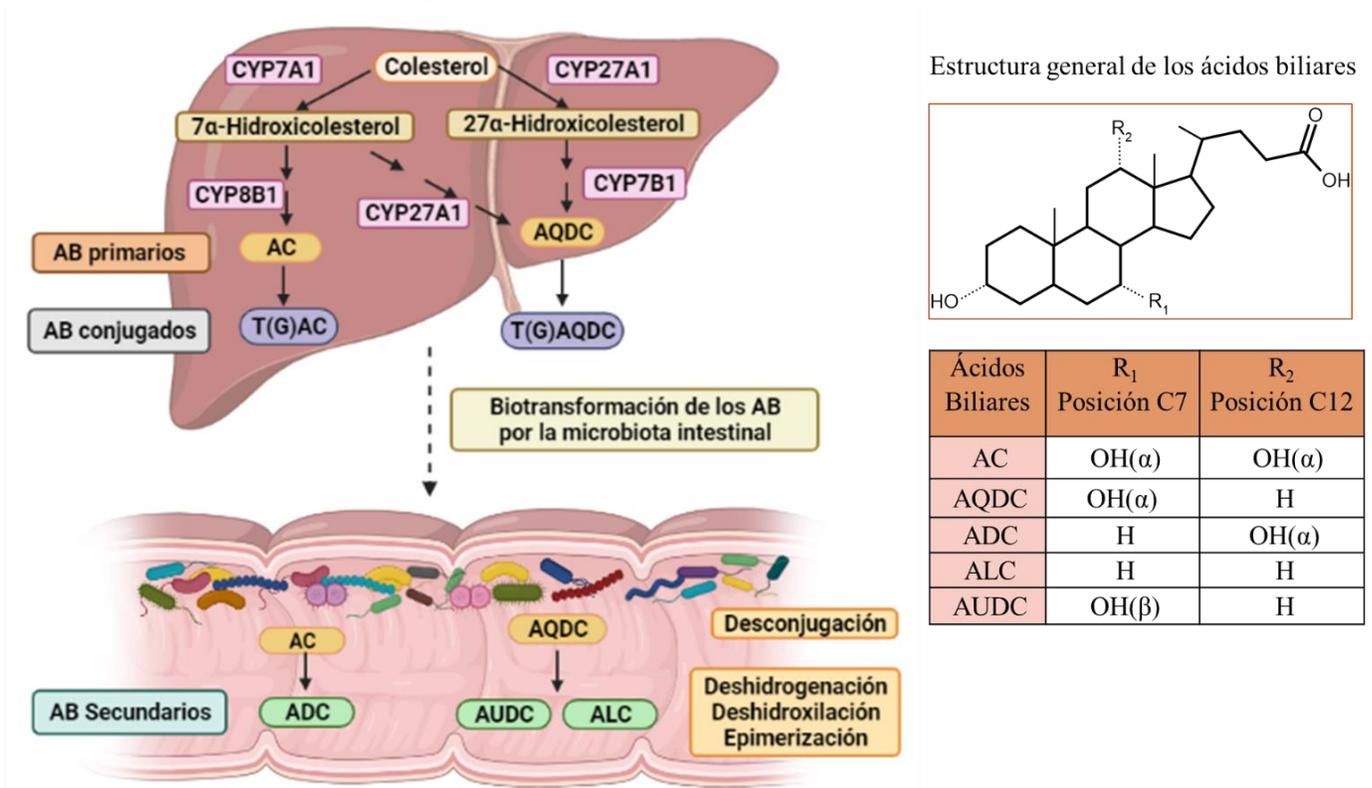
#### **Síntesis de los AB**

Los AB son moléculas anfipáticas planas que presentan una cadena lateral terminal con un grupo carboxilo. Estas moléculas se derivan del colesterol y son sintetizadas por los hepatocitos mediante la acción de aproximadamente 14 enzimas. De acuerdo a las características químicas de los diferentes tipos de AB estos van a presentar diferente polaridad y solubilidad (Ridlon et al., 2006).

La síntesis de los AB particularmente en humanos, se produce mediante dos vías; la vía clásica se inicia por la enzima limitante de velocidad colesterol 7 $\alpha$ -hidroxilasa (CYP7A1) generando ácido cólico (AC) y el ácido quenodesoxicólico (AQDC), mientras que en la vía alternativa es iniciada por la esteroil-27-hidroxilasa (CYP27A1) generando principalmente AQDC. Además, la expresión de la esteroil 12 $\alpha$ -hidroxilasa (CYP8B1) determina la proporción de AC a AQDC y la hidrofobicidad de los AB, ya que el CYP8B1 está involucrado en la formación del AC. Los AB sintetizados en el hígado, a partir del colesterol, se clasifican como AB primarios (Figura 7), (Wahlström et al., 2016; McGlone & Bloom, 2019).

Dentro del hígado, los AB primarios a través de su carboxilo de la cadena lateral terminal se conjugan (amidan) con glicina (G) o taurina (T), cuya proporción varía entre mamíferos. Esta conjugación es importante debido a que aumenta la solubilidad de los AB primarios, para poder ser secretados en la bilis y almacenados en la vesícula biliar hasta que se secretan en el intestino, donde los AB conjugados recién secretados están altamente concentrados en la luz del intestino delgado (McGlone & Bloom, 2019). Una vez dentro del intestino, las bacterias intestinales residentes biotransforman los AB primarios a partir de modificaciones enzimáticas, que incluyen la eliminación, oxidación o epimerización de los grupos hidroxilos. Por ejemplo, la eliminación de un grupo hidroxilo en C7 del AC y el AQDC produce el ácido desoxicólico

(ADC) y el ácido litocólico (ALC) respectivamente. Además, otro ácido biliar secundario deriva de la conversión microbiana es el ácido ursodesoxicólico (AUDC) el cual se forma a través de la isomerización  $7\alpha / \beta$  del ácido biliar primario AQDC. Las biotransformaciones realizadas por las bacterias intestinales son las responsables de la producción de los principales AB secundarios en humanos (Figura 7), (Wahlström et al., 2016; Ridlon et al., 2006).



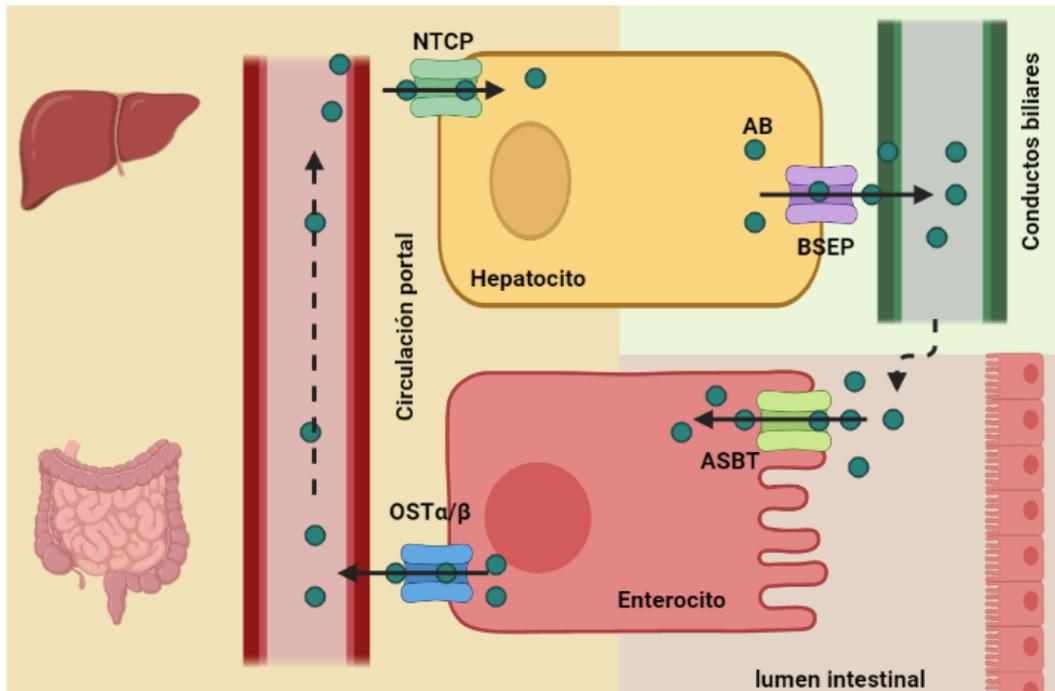
**Figura 7. Síntesis de los AB en humanos** (Creado en BioRender.com). Ácido cólico (AC), Ácido quenodesoxicólico (AQDC), Ácido litocólico (ALC), Ácido desoxicólico (ADC), Ácido ursodesoxicólico.(AUDC). (Wahlström et al., 2016)

### Circulación y transporte

Una vez realizada la síntesis de los AB en el hígado estos se secretan en los conductos biliares a través de la bomba de exportación de sales biliares (BSEP) y se almacenan en la vesícula biliar, para su posterior secreción hacia el intestino. Durante la ingesta de alimento la colecistoquinina provoca la contracción y vaciado de la vesícula biliar, ocasionando la secreción de bilis a través de los conductos biliares hacia el intestino donde los AB realizan una de sus principales funciones la cual consiste en ayudar en la emulsificación y absorción de nutrientes. Los AB se someten a recirculación enterohepática, un proceso que implica la absorción pasiva de AB conjugados y no conjugados, son captados por los enterocitos ileales a través del transportador de ácidos biliares apical dependiente de sodio (ASBT). Estos son secretados a la circulación portal por el transportador de solutos orgánicos heterotriméricos

(OST $\alpha/\beta$ ) expresado en la membrana basolateral de los enterocitos. Posteriormente son capturados en los hepatocitos por el polipéptido cotransportador de sodio/taurocolato (NTCP) Figura 8 (Wahlström et al., 2016; Ridlon et al., 2006).

La mayoría de los AB (95%) secretados viajan a la circulación enterohepática para ser reabsorbidos, solo el 5% es secretado en las heces. Este ciclo se repite aproximadamente de 4 a 10 veces en el día de acuerdo a las características dietarias. Una pequeña fracción de los AB que se encuentran dentro de la circulación portal, pasan a la circulación periférica, lo que permite la señalización de los AB en diferentes tejidos (Winston & Theriot, 2019).



**Figura 8. Circulación enterohepática mediada por los principales transportadores** (Creado en BioRender.com). Bomba de exportación de sales biliares (BSEP), Transportador de ácidos biliares apical dependiente de sodio (ASBT), Transportador de solutos orgánicos heterotriméricos (OST $\alpha/\beta$ ), Polipéptido cotransportador de sodio/taurocolato (NTCP).

### Los AB y su papel como moléculas de señalización

Los AB además de tener propiedades de emulsificación y solubilización sobre los lípidos luminales, actúan como moléculas de señalización, produciendo múltiples efectos metabólicos. Los dos principales receptores de AB implicados en la regulación del metabolismo son el receptor nuclear farnesoide X (FXR) y el receptor de membrana acoplado a proteína G Takeda, receptor de proteína G-5 (TGR5), (McGlone & Bloom, 2019).

## Los AB y su receptor FXR

El receptor FXR es un factor de transcripción nuclear, que forma un complejo con el receptor X retinoico y luego se une a las regiones promotoras de genes. El FXR se expresa en gran medida en el hígado y el intestino humano, así como en los riñones, las glándulas suprarrenales, el músculo liso vascular, el tejido adiposo blanco y las células inmunitarias. Existen 4 isoformas que se expresan diferencialmente en los tejidos y estas varían de acuerdo a su estimulación con los AB. En diversas investigaciones se menciona que los principales agonistas naturales de FXR son AQDC > AC > ALC > ADC, en orden de potencia decreciente, sin embargo, estos resultados no son contundentes, debido a que su potencia varía en diferentes estudios y, por otro lado, el AUCD se ha reportado que actúa como un antagonista. El FXR es fundamental para el ciclo de retroalimentación homeostática-negativa, que regula la síntesis y distribución de AB, además, tiene efectos metabólicos beneficiosos en múltiples sistemas. En el hígado, la activación de FXR incrementa la expresión del par de dímeros pequeños (SHP) por sus siglas en inglés, el cual inhibe la expresión de CYP7A1 y con ello disminuye la síntesis de AB. Además, SHP también está involucrado en la captación de AB de la circulación portal realizada por el transportador NTCP. De igual forma, FXR regula otros transportadores de AB ya que aumenta la expresión BSEP incrementando la salida de los AB del hígado hacia los conductos biliares, asimismo FXR está involucrado en la regulación del transportador OST $\alpha/\beta$ . Además, la activación SHP inhibe al CYP8B1 el cual está implicado en la producción de los AB 12 $\alpha$ -hidroxilados (12 $\alpha$ -OH), disminuyendo la proporción de AC a AQDC. Sin embargo, la disminución de AC estimula la activación de CYP7A1, por lo que la regulación de los AB es un complejo circuito de retroalimentación negativa (McGlone & Bloom, 2019; Wahlström et al., 2016).

En los enterocitos, la activación de FXR está involucrada en la producción y secreción de FGF15/19 (Factor de crecimiento de fibroblastos 19/ ortólogo en ratones FGF15). Este a través de la circulación portal activa al receptor 4 del factor de crecimiento fibroblástico hepático (FGFR4), el cual también inhibe a CYP7A1 (McGlone & Bloom, 2019; Chávez-Talavera et al., 2017).

Además, el FXR en los hepatocitos, participa en la expresión de genes implicados en el metabolismo y transporte de los lípidos, actuando sobre la lipogénesis hepática y la secreción de lipoproteínas. Por ejemplo, disminuye la expresión de la apolipoproteína CIII que participa en la inhibición de la lipoproteína lipasa (LPL), mientras que aumenta la expresión de la apolipoproteína CII (activador de la LPL). Además, FXR reprime la expresión de la

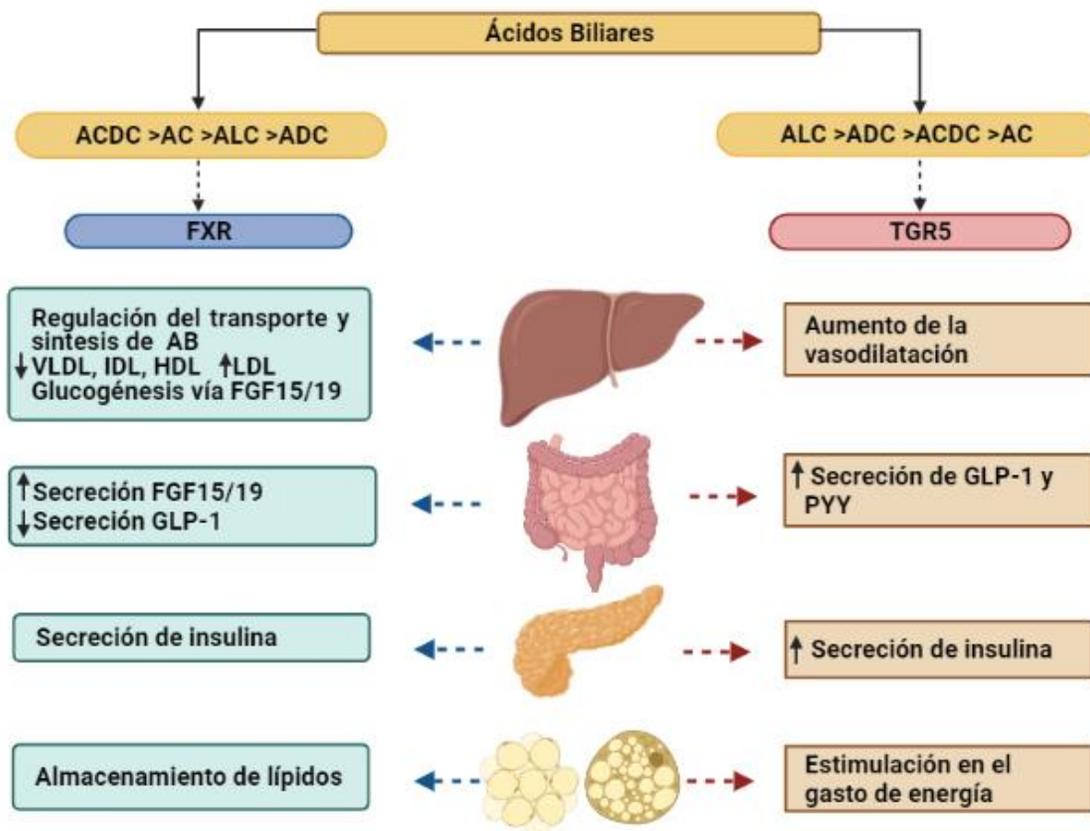
apolipoproteína B, disminuyendo la secreción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). De igual forma disminuye la expresión de la apolipoproteína Apo A1, el cual es el principal componente proteico del colesterol de alta densidad (HDL), por lo que los niveles de c-HDL disminuyen (McGlone & Bloom, 2019; Claudel et al., 2002; Chávez-Talavera et al., 2017).

El FXR está implicado en el metabolismo de la glucosa, ya que en los hepatocitos participa en la regulación de la gluconeogénesis al suprimir a través de SHP enzimas involucradas en la vía. En los enterocitos el FXR además de participar en la secreción de FGF15/19 está involucrado en el aumento de captación de glucosa. Además, en las células L enteroendocrinas la activación del FXR se asocia a la disminución de secreción de GLP-1 (McGlone & Bloom, 2019; Chávez-Talavera et al., 2017).

### **Los AB y su receptor TGR5**

El TGR5 es un receptor de AB ubicado en la membrana celular, es un receptor transmembranal acoplado a proteína G, se expresa principalmente en hígado, intestino, vesícula biliar, tejido adiposo, páncreas, bazo y sistema nervioso. Los AB activan a TGR5 con diferentes potencias (ALC > ADC > AQDC > AC), su activación conduce a la señalización intracelular de adenilato ciclasa y AMP-cíclico, así como el aumento o disminución de los niveles de calcio (McGlone & Bloom, 2019; Chávez-Talavera et al., 2017).

La unión de AB a TGR5 también regula el metabolismo de la glucosa, debido a que la activación de TGR5 aumenta la secreción de GLP-1 en las células L enteroendocrinas, promoviendo la secreción de insulina y disminuyendo los niveles de glucosa. Además, está involucrado en la respuesta inmune, ya que inhibe la producción de citocinas proinflamatorias. Por otro lado, en el tejido adiposo marrón, TGR5 incrementa el gasto de energía, mediante la activación de la yodotironina desyodasa tipo 2, que convierte la tiroxina inactiva en 3,5,3'-triyodotironina activa, Figura 9 (McGlone & Bloom, 2019; Chávez-Talavera et al., 2017).



**Figura 9. Principales funciones que modulan los receptores de los AB de acuerdo a su localización en diferentes órganos** (Creado en BioRender.com). AB: ácidos biliares, SHP: pequeño heterodímero asociado, VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad, LDL: Lipoproteína de baja densidad, HDL: Lipoproteína de alta densidad, FGF15/19: factor de crecimiento de fibroblastos, PYY: péptido YY.

### Los AB y su relación con el SM

Los AB están involucrados en diversas funciones metabólicas y la alteración en el perfil de estos se ha vinculado con el desarrollo de enfermedades. Dentro de los factores asociados al SM, principalmente en la RI y en la obesidad se ha observado una alteración en la composición de los AB. Por ejemplo, el aumento de los AB  $12\alpha$ -OH (AC, ADC y sus formas conjugadas) se han asociado con mayor RI y con factores relacionados como el aumento en los niveles de TG, glucosa, glucagón y niveles de c-HDL más bajos (Haeusler et al., 2013). Aunado a esto, en individuos obesos y diabéticos se ha observado un aumento de los AB, particularmente de los secundarios como el ADC y el ALC (Tsuei et al., 2014). Sin embargo, se desconoce si el aumento en la proporción de AB  $12\alpha$ -OH en relación a las formas no hidroxiladas es causa o consecuencia de la RI. Esto podría deberse a que la presencia de RI, promueve una mayor activación de FOXO1, el cual activa el CYP8B1, principal citocromo involucrado en la

producción de este tipo de AB (Haeusler et al., 2013). De forma interesante, en un estudio realizado en ratones el aumento en la producción de subtipos de AB más hidrófobos como el ADC se asoció con un incremento del estrés en el retículo endoplásmico que a su vez podría interferir con la señalización a la insulina (Zaborska et al., 2018). También se ha observado que un alto grado de hidrofobicidad de los AB secundarios se ha asociado con una mayor producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, provocando un aumento en el estrés oxidativo y daño al DNA (Tsuei et al., 2014).

### **Relación entre los AB y las bacterias intestinales.**

El metabolismo de los AB realizado por las bacterias intestinales es determinante para su composición. Como ya se describió las bacterias intestinales transforman los AB presentes en el intestino mediante diversas reacciones, como la hidrólisis de AB conjugados por hidrolasas de sales biliares (HSB), la  $7\alpha$ -deshidroxilación, la oxidación y la epimerización (Figura 10), (Winston & Theriot, 2019).

### **Desconjugación**

La desconjugación se refiere a la hidrólisis enzimática del enlace N-acilamina que une a los AB con la taurina o glicina. Esta se produce a través de las hidrolasas de sales biliares (HSB), que se encuentra activa principalmente en 3 phylum: *Firmicutes* (30%), *Bacteroidetes* (14,4%) y *Actinobacteria* (8,9%). Dentro de estos, los principales géneros involucrados son: *Clostridium* (*Firmicutes*), *Bacteroides* (*Bacteroidetes*), *Lactobacillus* (*Firmicutes*), *Bifidobacterium* (*Actinobacteria*) y *Enterococcus* (*Firmicutes*). Aunque aún no se conoce claramente la función fisiológica de este proceso se ha observado que las HSB podrían contribuir en la disminución del efecto antimicrobiano producido por las sales biliares, además se ha planteado que la desconjugación podría servir como ventaja nutricional para la obtención de carbono y nitrógeno para algunas especies (Ridlon et al., 2006; Winston & Theriot, 2019). Es importante considerar, que se ha observado que bacterias Gram-negativas presentan una mayor tolerancia a las sales biliares que las bacterias Gram-Positiva. Particularmente presentan un menor grado de sensibilidad al Oxgall que es un medio de cultivo que contiene bilis bovina y es utilizado para evaluar la tolerancia a la bilis de manera *in vitro*. Además, se ha encontrado que bacterias como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* y *Campylobacter* son aisladas de la bilis o de la vesícula biliar (Ridlon, Harris, et al., 2016).

## **Oxidación y epimerización.**

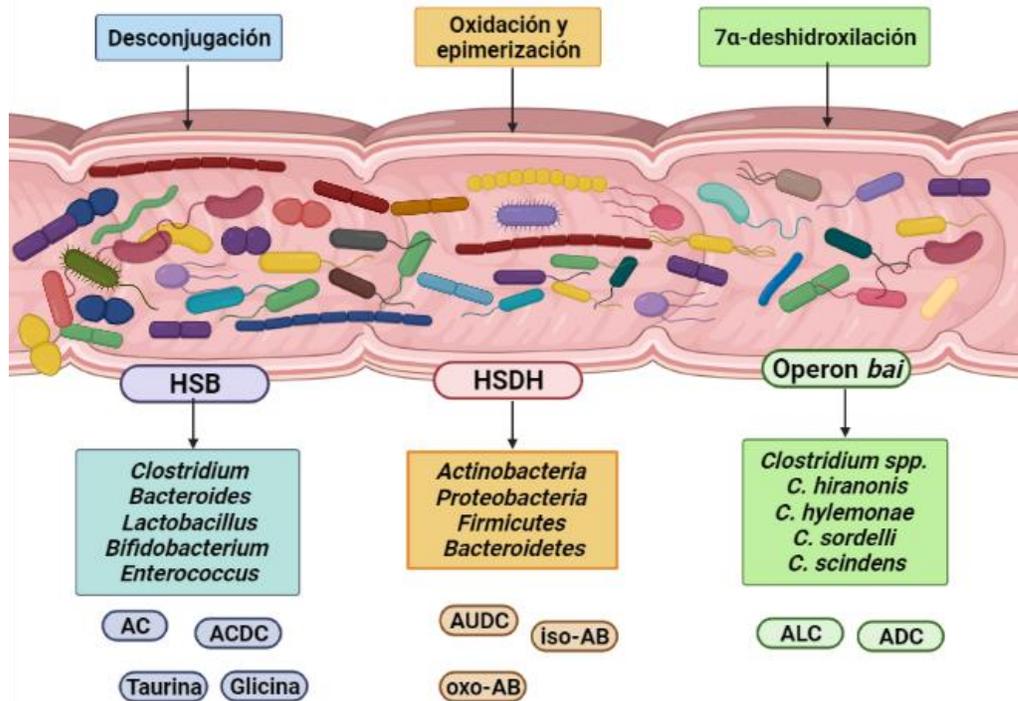
La oxidación y epimerización de los grupos 3 $\alpha$ , 7 $\alpha$  y 12 $\alpha$  en los grupos hidroxilo de los AB se llevan a cabo por la hidroxisteroide deshidrogenasa (HSDH) expresada por las bacterias intestinales principalmente pertenecientes a los phylum *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Bacteroidetes*. La epimerización es un cambio reversible en la estereoquímica de la configuración  $\alpha$  y  $\beta$  de los grupos hidroxilos con la generación intermedia de un ácido oxobiliar. En cuanto a la oxidación (expulsión H<sub>2</sub>) y reducción (inserción H<sub>2</sub>) de los grupos hidroxilo de los AB por HSDH, esta dependerá del potencial redox del medio ambiente. En resumen, la deshidrogenación puede cumplir funciones relacionadas con la generación de energía, así como disminuir las concentraciones de los AB más hidrófobos que reducen el efecto bactericida de los BA al transformar DCA y LCA en iso-DCA e iso-LCA (epímeros 3 $\beta$ -OH) (Ridlon et al., 2006).

## **Deshidroxilación**

A diferencia de la desconjugación que es realizada por un amplio grupo de bacterias, la 7 $\alpha$ -deshidroxilación es realizada por un reducido grupo de especies anaerobias que representan menos del 0.025% del microbioma intestinal total y el 0.0001% del microbiota colónico total. Entre los principales taxones involucrados están *Clostridium spp.* (*C. hiranonis*, *C. hylemonae*, *C. sordelli* y *C. scindens*), pertenecientes al phylum *Firmicutes*. A diferencia de la epimerización y oxidación, la 7 $\alpha$ -deshidroxilación suele realizarse solamente en AB libres por lo que la eliminación de glicina y taurina de los AB conjugados a través de las HSB necesita ser realizada previamente para que ocurra la 7 $\alpha$ -deshidroxilación. Además, el proceso de la 7 $\alpha$ -deshidroxilación comprende una serie de reacciones llevadas a cabo por bacterias con genes inducibles por ácidos biliares (*bai*), que finalmente llevan a la producción de los AB secundarios ya mencionados (Ridlon et al., 2006; Winston & Theriot, 2019).

El metabolismo microbiano de los AB participa en un aumento de la diversidad, así como en la regulación de la hidrofobicidad de los AB, lo que contribuye a su eliminación fecal (5%), (Ridlon et al., 2006).

Con base esto podemos establecer que la relación entre los AB y las bacterias intestinales no es unidireccional. Ya que tanto como los AB pueden modificar la composición de las bacterias intestinales debido a sus características antimicrobianas, como las bacterias intestinales pueden inducir la biotransformación de los AB (Wahlström et al., 2016).



**Figura 10. Metabolismo microbiano de los AB** (Creado en BioRender.com). Hidrolasas de sales biliares (HSB), hidroxiesteroide deshidrogenasa (HSDH). Ácido cólico (AC), Ácido quenodesoxicólico (AQDC), Ácido litocólico (ALC), Ácido desoxicólico (ADC), Ácido ursodesoxicólico.(AUDC).

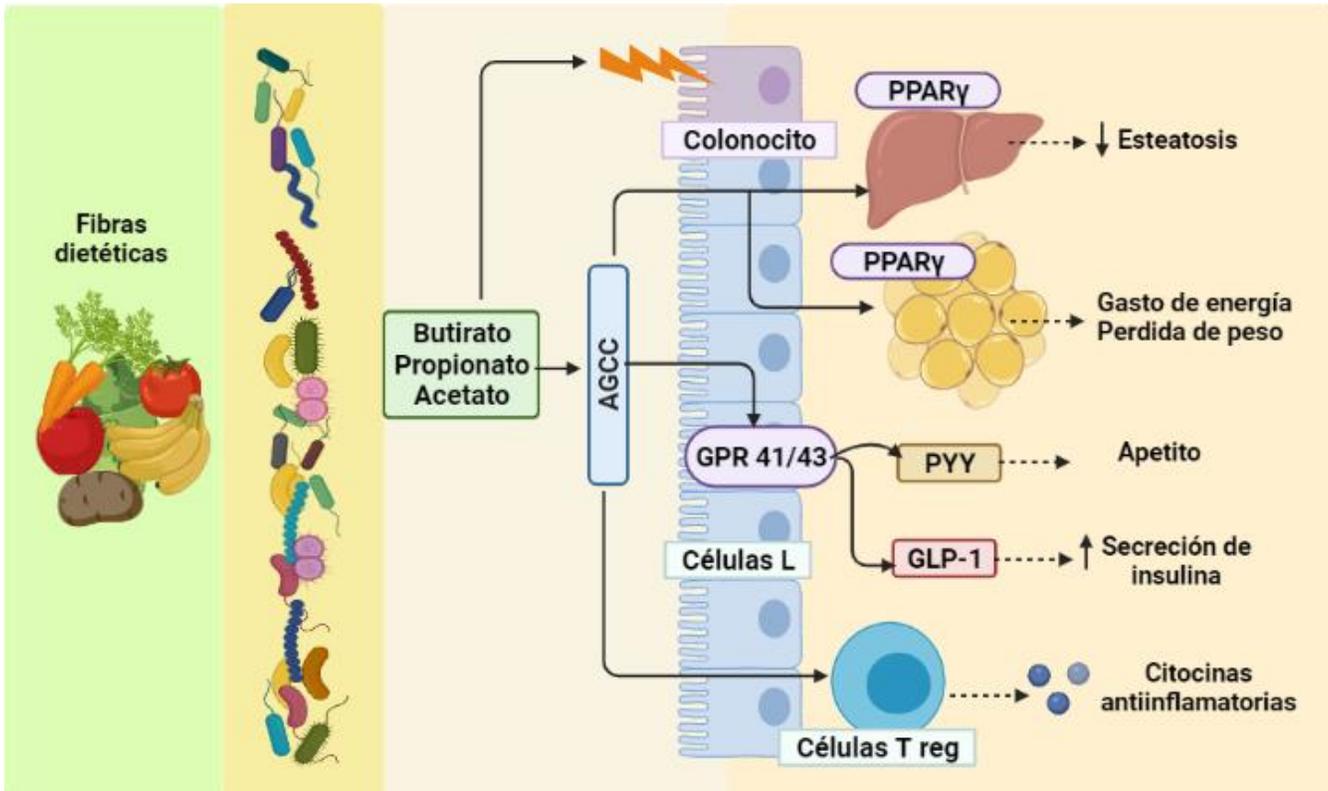
### Las bacterias intestinales y su relación con el SM.

#### Composición y funciones de las bacterias intestinales.

El intestino alberga una población compleja y diversa de microorganismos, se estima que son aproximadamente  $10^{14}$  los que colonizan el tracto gastrointestinal. La comunidad intestinal bacteriana está constituida principalmente por 6 phylum de bacterias: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria* y *Verrucomicrobia*, de los cuales los más abundantes resultan ser los phylum *Bacteroidetes* y *Firmicutes* (Hollister et al., 2015; Zhang et al., 2015). La microbiota intestinal es dinámica, la colonización comienza desde antes del nacimiento y a lo largo de la vida va cambiando su composición de acuerdo a las características del hospedero y puede ser modulada por la dieta, la higiene, el consumo de antibióticos, así como otros: factores ambientales o del estilo de vida (Zhang et al., 2015; Boulangé et al., 2016). Estos factores juegan un papel importante en la diversidad bacteriana intestinal, la cual depende de la riqueza taxonómica, de la abundancia relativa y de la distribución que presenta. Por lo general, una diversidad mayor es característica de comunidades bacterianas sanas (Nazir et al., 2019; Huttenhower et al., 2012; Fan & Pedersen, 2021). Además, las bacterias intestinales participan en diferentes funciones importantes dentro

del organismo, como el mantenimiento de la integridad de la barrera intestinal, evitan que patógenos y antígenos entren en el tejido y contribuyen a la homeostasis del sistema inmunológico. Como parte del proceso de fermentación de las fibras dietéticas las bacterias intestinales producen ácidos grasos de cadena corta (AGCC), principalmente propionato, acetato y butirato. El acetato es producido principalmente por bacterias intestinales anaerobias, mientras que el butirato y el propionato por diferentes tipos de bacterias. Por ejemplo, *Eubacterium rectale*, *Eubacterium hallii*, *Faecalibacterium prausnitzii* y *Ruminococcus bromii*, son de los principales productores de butirato, por otra parte, *Akkermansia muciphilla* es uno de los principales productores de propionato (Zhang et al., 2015; Thursby & Juge, 2017). Los AGCC son la principal fuente de energía de las células intestinales, sin embargo, su función no solo se limita a nutrirlas (Morrison & Preston, 2016). Los AGCC, principalmente el butirato, participan en la activación del Receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR $\gamma$ ), el cual modula el metabolismo de los lípidos a través del gasto energético, la disminución de peso y la reducción en la acumulación de TG (Fan & Pedersen, 2021; Schoeler & Caesar, 2019). Otra función de los AGCC es la inhibición de citocinas inflamatorias como IL-6. Además, estos se pueden unir a receptores acoplados a proteína G, que se expresan en células L, provocando el aumento de la secreción de GLP-1 y péptido YY (PYY) que contribuyen a un mayor gasto energético, una menor ingesta de alimentos y mejora en el metabolismo de la glucosa (Fan & Pedersen, 2021; Schoeler & Caesar, 2019). De manera individual los AGCC tienen diferentes funciones, por ejemplo, el butirato actúa como molécula antiinflamatoria, ayuda a regular el sistema inmune, atenúa la translocación bacteriana, ayuda a mejorar la función de la barrera intestinal y es la principal fuente de energía de los colonocitos. El propionato ayuda a los tejidos a responder a la insulina y actúa sobre las funciones de las células  $\beta$  pancreáticas (Figura 11) (Fan & Pedersen, 2021; Morrison & Preston, 2016; Schoeler & Caesar, 2019).

Las bacterias intestinales, también participan en la producción de ciertos metabolitos como la vitamina B12 y el folato el cual es producido principalmente por bacterias del género *Bifidobacterium*. Participa en procesos de síntesis y reparación del DNA, además de la producción de vitamina K que favorece a la circulación (Fan & Pedersen, 2021).



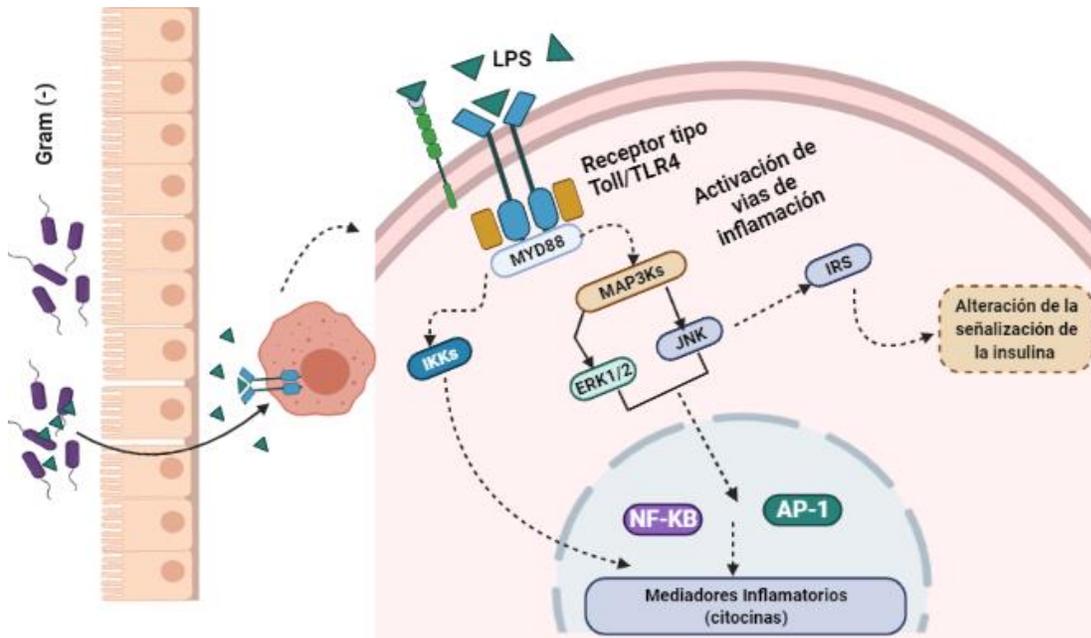
**Figura 11. Principales efectos benéficos que realizan los AGCC producidos por las bacterias intestinales** (Creado en BioRender.com).

### Alteraciones en la composición bacteriana intestinal y el SM.

Cuando las funciones mencionadas anteriormente se ven interrumpidas debido a la alteración en el equilibrio de la microbiota intestinal, se le conoce como *disbiosis* (Thursby & Juge, 2017). De acuerdo con esto las bacterias intestinales juegan un papel fundamental en la homeostasis fisiológica por lo que su alteración puede estar asociada al desarrollo de diferentes enfermedades. La disbiosis puede caracterizarse por una disminución en la diversidad, o pérdida de taxones benéficos. Por ello la disbiosis se ha asociado con afecciones metabólicas como la inflamación producida por lipopolisacáridos (LPS), RI y la obesidad, componentes implicados en el desarrollo del SM (Boulangé et al., 2016; P.-X. Wang et al., 2020).

Según diversos estudios, un cambio en la composición bacteriana, se ha asociado con la presencia de alteraciones metabólicas. Por ejemplo, en diferentes investigaciones en personas con obesidad la proporción de *Firmicutes* se ha encontrado aumentada en comparación con la de los *Bacteroidetes*. Sin embargo, estos resultados no han sido contundentes, debido a que también se ha observado que el aumento de los *Bacteroidetes* está asociado con la presencia de obesidad. *Schwartz et al.* infieren que más allá de la proporción *Bacteroidetes/Firmicutes* estas variaciones están asociadas a la cantidad de AGCC producidos por las bacterias

intestinales, así como a la influencia de factores ambientales (Schwiertz et al., 2010). Sin embargo, el aumento de bacterias Gram-negativas como *Bacteroidetes* y *Proteobacterias*, está altamente asociado a procesos inflamatorios, obesidad y RI, debido a que este tipo de bacterias contienen un LPS en su membrana. El LPS se une a receptores tipo Toll 4 (TLR4), los cuales activan cinasas de serina (JNK, IKKs) y al TNF- $\alpha$  induciendo la fosforilación de serinas de IRS-1 y provocando alteraciones en la señalización de la insulina (Figura 12) (Boulangé et al., 2016; Saad et al., 2016).



**Figura 12. Alteración en la señalización de insulina debido a los efectos inflamatorios inducidos por LPS** (Creado en BioRender.com). Activador de proteína 1 (AP-1), Factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B).

Se ha encontrado que, en adultos con SM, especies del género *Bacteroides* y *Ruminococcus* como *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron* y el subgrupo *R. flavefaciens*, así como la especie *Parabacteroides distasonis*, se encontraron disminuidos. Estas tienen una importante actividad sacarolítica, lo que puede causar una disminución en la producción de AGCC como el propionato y el acetato (Santos-Marcos et al., 2019). Además, la disminución de este último conlleva a una reducción en las bacterias beneficiosas que consumen este metabolito como *F. prausnitzii* y *E. rectale* y que son importantes productoras de butirato. Otra bacteria productora de butirato es el género *Roseburia*, cuya disminución se ha asociado con la presencia de DM2 en adultos. También la disminución de *Bifidobacterium*, implicada en la disminución de la translocación bacteriana y en la mejora de la barrera intestinal se ha relacionado con una dieta alta en lípidos y con el sobrepeso (Wang et al., 2020; Santos-Marcos et al., 2019).

## **Relación entre los AB, las bacterias intestinales y el metabolismo.**

Los AB y las bacterias intestinales están involucradas en la regulación de diferentes funciones metabólicas, por lo que una composición alterada de los AB y la disbiosis bacteriana, se ha asociado con la presencia de enfermedades como obesidad, cáncer y DM2 y podría estar involucrada con la presencia del SM. Se ha observado que una dieta alta en grasa aumenta la secreción de AB y altera la composición de la microbiota intestinal, tanto en animales obesos como en personas con DM2 (Tsuei et al., 2014; Yokota et al., 2012). Además, en ratones con una dieta alta en grasas se observó que el aumento del ácido taurocólico estaba asociado al incremento excesivo de *Bilophila wadsworthia*, un patobionte asociado a la colitis ulcerosa (M. L. Chen et al., 2019). Se ha encontrado que el aumento en los niveles del AC provoca un cambio en la composición bacteriana intestinal aumentando el phylum *Firmicutes* particularmente el grupo *XIVa* del género *Clostridium*, los cuales a su vez provocaron el aumento de los AB secundarios, debido a que son sus principales productores (Tsuei et al., 2014; Ridlon et al., 2014). Por otro lado, la suplementación con ADC en ratones provocó inflamación intestinal y un aumento en los *Bacteroidetes* (Xu, Shen, et al., 2021). Además, la desregulación de los AB también se ha asociado con el aumento de la translocación bacteriana al alterar la función de barrera en el intestino (Tsuei et al., 2014). Sin embargo, aún no hay los suficientes estudios que nos permitan comprender la relación entre los AB, las bacterias intestinales y su influencia con el SM.

## **Relación de las bacterias intestinales y los AB con alteraciones metabólicas en población pediátrica**

En población infantil, existe una limitada información en relación a la composición de las bacterias intestinales en presencia del SM. Entre las investigaciones realizadas, el estudio de *Del Chierico et al.*, en jóvenes con obesidad, de 9 a 18 años observó que en aquellos con mayor riesgo de SM existía una mayor abundancia de los taxones *Coriobacteriaceae* y *Prevotella* y una menor abundancia de *Ocillospira* y *Parabacteroides distasonis*. Además de que individuos con factores asociados al SM, en particular la RI y una mayor presión arterial diastólica presentaron una disminución significativa de la diversidad  $\alpha$  (Del Chierico et al., 2021). De forma consistente en un estudio realizado por *Orsso et al.*, en niños de 10-16 años, se encontró una asociación negativa entre mayores niveles de HOMA-IR y la diversidad y riqueza de especies (Orsso et al., 2021).

Adicionalmente, la bacteria *Akkermansia muciniphila* que es degradadora de mucina, lo que influye en la restauración de la mucosa intestinal y que se ha relacionado con un aumento de

la sensibilidad a la insulina, se observó disminuida en niños con sobrepeso (Santos-Marcos et al., 2019).

En México, son muy escasos los estudios reportados sobre la composición de las bacterias intestinales en población infantil y su relación con el SM. En un estudio realizado por *Maya-Lucas et al.*, en niños de 9-11 años se observó que los niños con obesidad presentaban una microbiota intestinal dominada por el enterotipo *Prevotella spp.* y un aumento en la abundancia del género *Methanobrevibacter* (Maya-Lucas et al., 2019). Además, en la investigación realizada por *Murugesan et al.*, en niños de 9 a 11 años con presencia de obesidad, se encontró un aumento en la abundancia de *Faecalibacterium sp.*, *Lachnospiraceae* y *Roseburia sp.*, pertenecientes al phylum *Firmicutes* (Murugesan et al., 2015). De igual forma en el estudio realizado por *López-Contreras et al.*, en niños con obesidad entre 6-12 años, no se observó una diferencia significativa en la proporción de *Firmicutes/Bacteroidetes*, pero sí un aumento principalmente del taxón *Bacteroides eggerthii* (López-Contreras et al., 2018). En otro estudio realizado por *Nirmalkar et al.*, en adolescentes (12-18 años) y niños (6-11 años) con obesidad, que además presentaban SM y RI, se encontró un aumento de los géneros *Collinsella* y *Prevotella* en adolescentes y un aumento del género *Lactobacillus* y la familia *Coriobacteriaceae* en niños (Nirmalkar et al., 2018). Además, en el estudio de *Vazquez-Moreno et al.*, realizado a niños obesos en diferentes regiones del país (Ciudad de México y Oaxaca) se encontraron asociados con obesidad los taxones *Fusicatenibacter*, *Romboutsia*, *Ruminococcaceae*, *Ruminiclostridium*, *Blautia*, *Clostridium*, *Anaerostipes* e *Intestinibacter* en niños de la Ciudad de México y los taxones *Bacteroides*, *Alistipes* y *Clostridium* se encontraron asociados con los TG principalmente en niños del estado de Oaxaca (Vazquez-Moreno et al., 2021).

Los estudios realizados en población infantil mexicana, se enfocaron en la presencia de disbiosis asociada a la obesidad o RI. Es importante destacar que los resultados son pocos consistentes, si bien se presenta una composición bacteriana alterada, no se ha encontrado una firma bacteriana específica asociada a estas enfermedades. Por ello, se requieren más estudios que ayuden a entender la influencia de la microbiota intestinal en la presencia de alteraciones metabólicas en nuestra población infantil.

En relación al estudio de los AB en población pediátrica, si bien se han asociado como marcadores de ciertas enfermedades, la información aún es escasa. En un estudio reciente realizado por *Jahnel et al.*, se observó que la composición de los niños de 6-11 era muy similar a los sujetos mayores de 11 años, también se observó que había un aumento de los AB

secundarios con la edad en particular del ADC. De igual forma se ha observado que la composición de los AB puede cambiar con ciertas enfermedades (Jahnel et al., 2015). En un estudio realizado por *Higgins et al.*, en adolescentes con obesidad se reportó una disminución de los AB no 12 $\alpha$ -hidroxilado postprandiales (Higgins et al., 2019). También en un estudio realizado por *Montagnana et al.*, se informó sobre el aumento de los AB totales y conjugados con glicina en niños y adolescentes que presentaron esteatosis hepática (Montagnana et al., 2020). Sin embargo, hasta el momento no se han reportado estudios en los que se realice su caracterización en presencia del SM en población infantil.

Aunque diferentes factores tanto ambientales, genéticos y dietarios están involucrados en el desarrollo del SM, la relación que existe entre el perfil de los AB y la composición de las bacterias intestinales en presencia del SM no es completamente clara. Por otro lado, el aumento en la prevalencia del SM y la presencia de este padecimiento cada vez a edades más tempranas, en particular, en la población infantil mexicana, hace que sea de suma importancia comprender la asociación entre el SM y las alteraciones en la composición tanto de los AB, como de las bacterias intestinales.

## Justificación

El incremento en la prevalencia del SM en población infantil mexicana es un problema de salud, que conlleva al desarrollo enfermedades como DM2 y enfermedad cardiovascular las cuales son las principales causas de muerte a nivel nacional (Peña-Espinoza et al., 2017). Por ello, es de suma importancia comprender los factores fisiopatológicos asociados al SM.

Debido a la relación bilateral entre los AB y las bacterias intestinales y los procesos metabólicos en los que están implicados, recientemente se ha planteado que ambos factores podrían estar involucrados en la fisiopatología del SM.

De acuerdo con lo reportado en algunos estudios, la RI y la DM2 se han asociado con el aumento de los AB 12 $\alpha$ -OH comparado con las formas no hidroxiladas (Haeusler et al., 2013). Además en personas con obesidad el aumento de los AB totales circulantes se asoció con el IMC y los TG (Agus et al., 2021). Aunque se ha evaluado la asociación con componentes importantes del SM en población infantil no hay estudios enfocados en el análisis de este padecimiento.

Por otro lado, aunque la alteración en la composición de las bacterias intestinales se ha asociado con factores del SM en población infantil, los estudios enfocados en población pediátrica mexicana son escasos. En un estudio previo de nuestro grupo de investigación, el cual fue realizado en niños de 6-12 años, se encontró que los niños con RI presentaron una menor diversidad, además en niños con obesidad se encontró una mayor abundancia del taxón *Bacteroides eggerthii* (López-Contreras et al., 2018).

De acuerdo con lo anterior, analizar la relación entre los AB, las bacterias intestinales y el SM, es de gran relevancia, debido a la alta prevalencia del SM en población pediátrica mexicana. Aunque es una problemática compleja y multifactorial, los hallazgos de este estudio podrían servir como referencia para estudios posteriores que permitan un análisis más detallado con la finalidad de desarrollar futuros tratamientos preventivos y terapéuticos.

## **Hipótesis**

Un estado de disbiosis, particularmente una menor diversidad bacteriana, así como la alteración en la composición de los AB, principalmente en el aumento de los AB 12 $\alpha$ -OH, están asociados a la presencia de SM en población infantil.

## **Objetivos**

**Objetivo general.** Analizar las relaciones que existen entre los AB circulantes, las bacterias intestinales y la presencia del SM en población infantil mexicana.

### **Objetivos particulares.**

- Analizar las diferencias en los niveles circulantes de AB en presencia y ausencia de SM.
- Analizar las diferencias en la composición bacteriana intestinal en presencia y ausencia del SM.
- Evaluar la asociación entre la composición de las bacterias intestinales y los AB circulantes.

## Metodología

### Población de estudio

Estudio de caso-control para la presencia de SM en un total de 100 niños (58 controles sin presencia de SM y 42 casos con presencia de SM). Para este estudio transversal se utilizaron los datos de un estudio previo realizado en el Instituto Nacional de Medicina Genómica. Los niños fueron seleccionados a partir de una cohorte de niños escolares mexicanos (6-13 años) que fueron reclutados de un campamento de verano para hijos de empleados de la Secretaría de Salud de México entre 2013 y 2015.

### Criterios de selección

- Criterios de inclusión
  - Consentimiento informado firmado por padres o tutores.
  - Edad entre 10-13 años.
  - Para el estudio de los casos, cumplir con los valores de referencia de los criterios para la clasificación del SM en niños.
- Como criterio de exclusión
  - Para el análisis de las bacterias intestinales, se eliminaron aquellos niños que hubieran reportado un consumo de antibióticos 3 meses antes de la prueba o el mismo día de esta.
- Criterios de eliminación
  - Niños sin muestra de suero disponible para el análisis de AB.
  - Niños sin muestra fecal para el análisis de secuenciación.

### Datos antropométricos

Las medidas obtenidas fueron talla, peso y circunferencia de cintura, de acuerdo con la metodología empleada por *Martínez Medina, 2020*. El índice de masa corporal IMC se calculó como el peso corporal dividido por la altura al cuadrado ( $\text{kg/m}^2$ ). Después de calcular el IMC se obtiene el percentil a partir de gráficas o tablas de referencia en niños y adolescentes, las cuales están establecidas por los Centros de Control de Enfermedades (*Acerca del índice de masa corporal para niños y adolescentes | Peso Saludable | DNPAO | CDC, 2020*) según su edad y sexo. De acuerdo con el percentil obtenido en las tablas de crecimiento se definió su estado nutricional (Tabla 1).

**Tabla 1. Estado nutricional en población infantil según los valores de referencia establecidos por la CDC.**

<b>Estado nutricional</b>	<b>Rango de percentil.</b>
<b>Bajo peso</b>	< percentil 5
<b>Peso saludable</b>	De percentil 5 a <percentil 85
<b>Sobrepeso</b>	Entre >Percentil 85 y <percentil 95
<b>Obeso</b>	≥percentil 95

**Datos clínicos y bioquímicos**

- Datos clínicos.

Para los datos obtenidos de la presión arterial en los niños, de acuerdo a su edad y sexo, se realizaron los percentiles y se clasificaron de acuerdo a los valores de referencia establecidos por American Academy of Pediatrics (Flynn et al., 2017) para niños de 10-13 años.

- Análisis bioquímico.

Se realizó una toma de muestra de sangre periférica, en un tubo de gel activador de coagulación para extraer el suero, tras un ayuno previo de 8-12 horas. Las determinaciones se realizaron en el Departamento de Endocrinología y Metabolismo del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Los valores de glucosa en ayuno, insulina, niveles séricos de triglicéridos y colesterol fueron determinados por métodos enzimáticos, el c-HDL se determinó por el método de precipitación (fosfotungstato + Mg<sup>2+</sup>). La alanina transaminasa ALT y el aspartato transaminasa AST, mediante kits colorimétricos, el LDL se determinó mediante la diferencia entre Colesterol total y c-HDL. La sensibilidad a la insulina se estimó con la evaluación del modelo de homeostasis para la resistencia a la insulina (HOMA-IR), a través de la siguiente ecuación:  $HOMA-R = \frac{Insulina (mU/ml) \times glucemia basal (mmol/l)}{22.5}$ . El índice de TG/c-HDL fue calculado dividiendo las concentraciones de triglicéridos entre las de c-HDL y el punto de corte que se consideró fue de un valor de índice TG/c-HDL >3 para riesgo cardiovascular, dislipidemia y RI (Hannon et al., 2006; Baez-Duarte et al., 2017; Martínez Medina, 2020).

## Clasificación del SM infantil

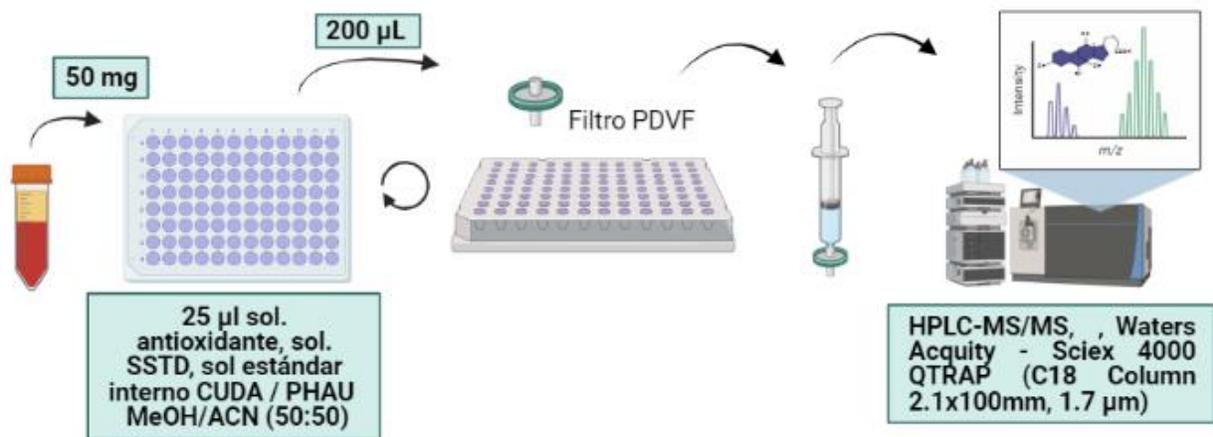
Con base a los criterios establecidos por *Ferranti et al.* (Burguete-García & Valdés-Villalpando, 2014). Se establecieron los valores de referencia para los 5 factores de riesgo (Tabla 2), asignando como SM a aquellos que presentaron 3 o más de estos factores:

**Tabla 2. Criterios diagnósticos utilizados en la determinación del SM**

Factor de riesgo	Valores de referencia
<b>Glucosa en ayuno</b>	>110 mg/dl
<b>Obesidad central</b>	CC $\geq$ percentil 75 para edad y sexo
<b>Triglicéridos</b>	$\geq$ 100 mg/dl
<b>c-HDL</b>	< 50 mg/dl
<b>Presión arterial</b>	(sistólica o diastólica) $\geq$ percentil 90 para edad, sexo y talla

## Análisis de la composición de los AB

Para el análisis de los AB las muestras de suero recolectadas se enviaron al West Coast Metabolomics Center, en la Universidad de California Davis EUA, en donde la cuantificación se realizó por análisis de metabolómica dirigida a los AB por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS / MS). Brevemente, a una alícuota de 50  $\mu$ l, se le añadió 25  $\mu$ l de solución antioxidante, 25  $\mu$ l de la solución de estándar sustituto SSTD, 25  $\mu$ l de la solución de estándar interno CUDA / PHAU y se añadió metanol (MeOH) y acetonitrilo (ACN), ambos de grado LCMS en una proporción 50:50 en un pocillo para llegar a un volumen final de 250 $\mu$ l. Además, a la placa se le añadió los blancos ( solución antioxidante, CUDA / PHAU en MeOH: ACN con un vol. Final de 250  $\mu$ l), los controles: IS Check (solución antioxidante, SSTD, CUDA / PHAU en MeOH: ACN con un vol. Final de 250  $\mu$ l) y el control Utak (50  $\mu$ l Utak Serum, solución antioxidante, CUDA / PHAU en MeOH: ACN con un vol. Final de 250 $\mu$ l). La placa se agitó en un vórtex y se centrifugó durante 5 min, se tomaron 200  $\mu$ L aproximadamente del sobrenadante y se colocaron en una placa con filtro PDVF, esta se cubrió y se almacenó para su posterior análisis en el Sistema LC-MS (Figura 13), Waters Acquity - Sciex 4000 QTRAP (C18 Column 2.1x100mm, 1.7  $\mu$ m), el cual se ajustó y se realizó la preparación de las curvas estándar. Se cuantificaron 23 AB, tanto primarios (AQDC, AC,  $\alpha$ -AMC,  $\beta$ -AMC); conjugados (A(T)C, A(G)C, A(T)QDC, A(G)QDC, A(T)DC, A(G)DC, A(T)LC, A(G)LC,  $\alpha$ -A(T)MC,  $\beta$ -A(T)MC,  $\alpha$ -A(G)MC,  $\beta$ -A(G)MC,  $\omega$ -A(T)MC,  $\omega$ -A(G)MC, A(T)UDC, A(G)UDC, ATDHC); y secundarios (AUDC, ALC, ADC), tomando en cuenta un límite de detección (LD) de un valor de 0.2 nM.



**Figura 13. Análisis de la composición de los AB** (Creado en Biorender.com).

### **Análisis de la composición de las bacterias intestinales**

Las muestras de heces fueron recolectadas en casa con la ayuda de los padres y fueron colocadas en un recipiente de plástico estéril. Las muestras se almacenaron en casa donde se mantuvieron en refrigeración por un tiempo máximo de 12 horas. Posterior a esto fueron transportadas con la debida refrigeración al Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), donde se prepararon alícuotas de 200 mg y se almacenaron a -70 °C, de acuerdo con la metodología utilizada por *López-Contreras et al.*, (López-Contreras et al., 2018). Posteriormente se realizó la extracción de DNA de acuerdo al protocolo establecido por el QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Inc.; Hilden, Alemania). La cuantificación se realizó utilizando el nanofotómetro (Thermo Scientific NanoDrop 2000c). Después se realizó la amplificación de la región hipervariable V4 del gen 16S ribosomal RNA (rRNA) y los amplicones se purificaron (Agencourt AMPure) y cuantificaron (kit Qubit dsDNA High Sensitivity Assay Kits y el fluorómetro Qubit 3.0) para su posterior secuenciación a través de la plataforma Illumina MiSeq 2x250. Estos procesos se describen con más detalle a continuación.

- **Extracción de DNA de muestras fecales**

Se pesaron aproximadamente entre 120-180 mg de muestra fecal, y se añadieron a un tubo de microcentrífuga de 2 ml, la extracción del ADN de muestras fecales se realizó de acuerdo al protocolo del estuche DNA Stool Mini Kit Qiagen. A la muestra se le añadió un Búffer de ASL (lisis) y se colocó en el vórtex hasta homogeneizarse. Después fueron colocadas en el termociclador por 5 min, se volvieron a homogeneizar y se centrifugaron a 13000 rpm/1 min. Se tomó una alícuota de 1.2 ml del sobrenadante y se añadió el Búffer InhibiTex para eliminar contaminantes. Esta mezcla se volvió a homogeneizar y centrifugar, para poder tomar 1.5 ml del sobrenadante al cual se le añadió 15 µl de

proteinasas K, para eliminar contaminantes e inactivar nucleasas, posteriormente se tomó 200 µl y se colocaron en un nuevo tubo al cual se le añadieron 200 µl de Búffer AL, esta mezcla se homogeneizó. Después estos fueron incubados por 30 min en un termociclador a 70°C, posterior a esto se centrifugó y se les añadió 200 µl de etanol y, por último, se volvió homogeneizar.

En columnas de centrifugado se añadió el contenido obtenido anteriormente, y se centrifugó por 1 min, desechando el tubo con el filtrado, y se colocó la columna de centrifugado en un nuevo tubo de recolección, donde se añadió 500 µl de Búffer de AW1 se centrifugó, se desechó el tubo de recolección con el filtrado y la columna de centrifugación se pasó a un tubo de recolección de 2 ml, este proceso también se realizó con 500 µl de Búffer AW2, sin embargo, la columna de centrifugación se colocó en un tubo de 1.5 ml y se le añadió 200 µl de Búffer AE directamente a la membrana de la columna, permitiendo la elución del DNA.

- **Cuantificación de DNA de las muestras extraídas**

Esta se realizó en nanofotómetro Thermo Scientific NanoDrop 2000c, se colocaron 2 µl de cada muestra y se utilizó como blanco el Búffer de AE. Posteriormente se realizó la precipitación y resuspensión para aquellas que no lograran la concentración adecuada, tuvieran una concentración de 50 ng/µl.

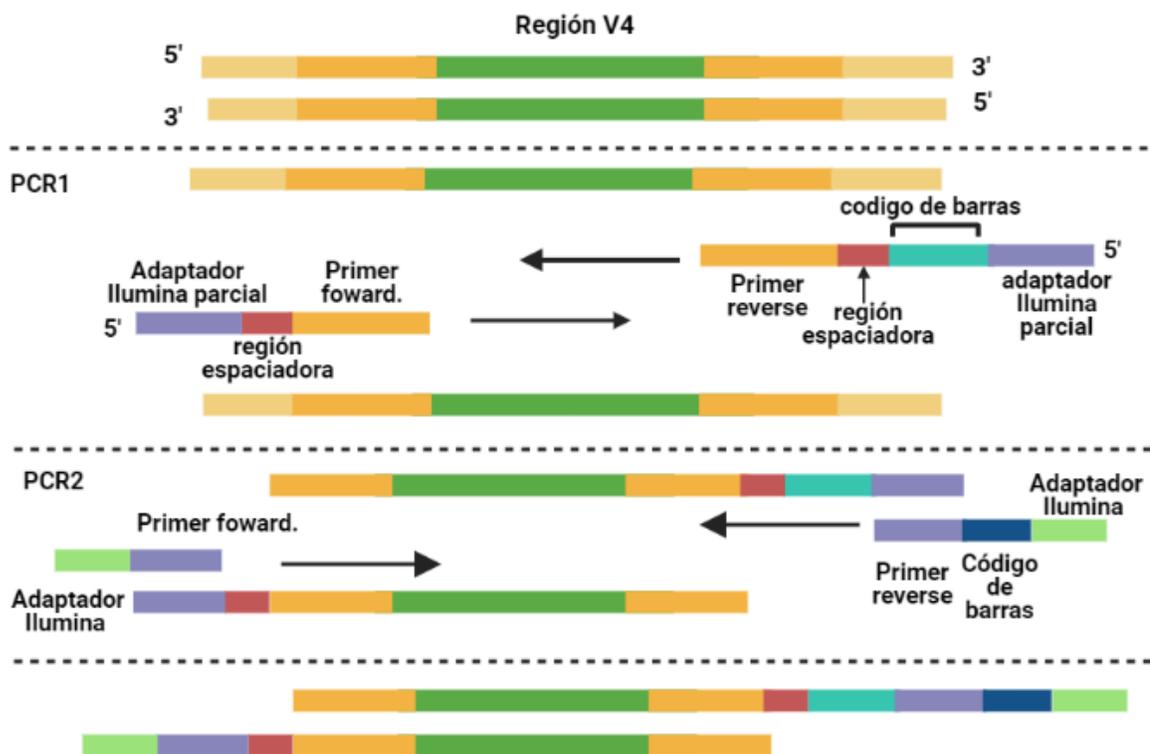
- **Amplificación de la región hipervariable V4 del gen 16S ribosomal RNA (rRNA).**

La secuenciación del gen 16S rRNA se usa ampliamente para caracterizar la diversidad taxonómica de comunidades microbianas, debido a que está presente en casi todas las bacterias, además su estructura y función se ha conservado con el paso del tiempo (Abellan-Schneyder et al., 2021). El gen 16S rRNA consta de 9 regiones hipervariables intercaladas con regiones conservadas. Para la determinación taxonómica, es suficiente con la secuenciación de las regiones hipervariables, en lugar de la longitud completa del gen. La región hipervariable V4 en la mayoría especies bacterianas tiene 254 pb aproximadamente, para su secuenciación se construyen cebadores de las regiones conservadas especialmente 515F and 806R, es comúnmente usada para estudios de composición taxonómica y diversidad, además sus objetivos principales son las bacterias y arqueas, también produce un amplicón de tamaño apropiado para su secuenciación (Apprill et al., 2015).

Después de la extracción del DNA, se procedió con la amplificación, la cual consistió en una Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR (del inglés Polymerase Chain Reaction; PCR1), donde se emplearon los oligos: 515F (5´ G TGC CAG CMG CCG CGG

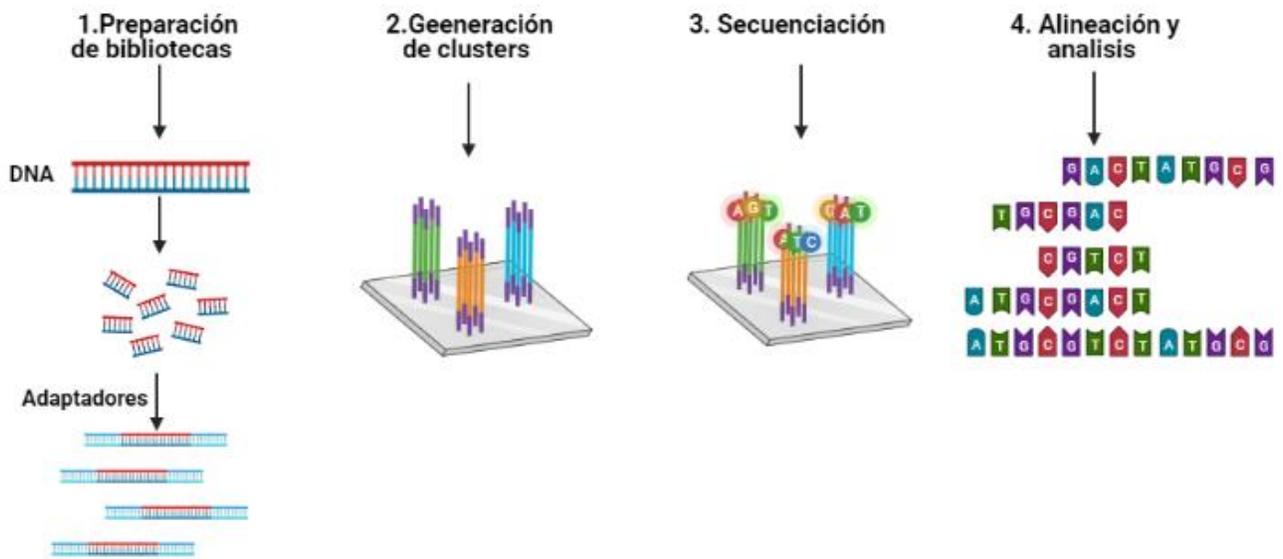
TAA 3'; 19 pb) y 806R (5'GG ACT ACH VGG GTW TCT AAT 3'; 20 pb). Este último contenía los códigos de barras para su identificación. Además, estos primers también contenían, una secuencia espaciadora de heterogeneidad y un adaptador de Illumina parcial. Se utilizó el siguiente programa para la amplificación: 94 ° C durante 3 min para la fusión inicial; 25, 30 o 35 ciclos de 94 ° C durante 30 s, 60 ° C durante 30 s, 68 ° C durante 1.5 min; 68 ° C durante 5 min. Los productos se verificaron en un gel de agarosa al 2%, utilizando un Búffer de Syber green (para la tinción y detección en gel) y un marcador de peso molecular de 100-2000 pb. Posteriormente para la eliminación de contaminantes (dNTP, sales, cebadores, dímeros de cebado) se utilizó el kit de purificación de PCR Agencourt AMPure (Ref A63881).

Para la segunda PCR (PCR2) se preparó la mezcla de reacción (polimerasa y oligo universal forward) y se añadieron los oligos reverse, ambos primers contenían el adaptador Illumina necesarios para la secuenciación, además de que el primer reverse contenía una segunda secuencia de indexación. La PCR2 tuvo las siguientes condiciones 94 ° C por 2 min, luego de 5 ciclos de 94 ° C por 30 s, 60 ° C por 30 s, 68 ° C por 1.5 min, y un ciclo a 68 ° C por 5 min. de igual forma se le realizó el proceso de verificación y purificación ya mencionado. Finalmente, se realizó una cuantificación a través del kit Qubit dsDNA High Sensitivity Assay Kits y el fluorómetro Qubit 3.0.



**Figura 14. Descripción de la amplificación realizada a la región V4 del gen 16S ribosomal RNA (rRNA)** (Creado en BioRender.com). (Caporaso et al., 2011).

- **Secuenciación de los amplicones**
- El proceso de secuenciación fue realizado en la plataforma Illumina MiSeq 2x250 en la Unidad de Secuenciación del Instituto Nacional de Medicina Genómica.



**Figura 15. Pasos generales realizados en la secuenciación realizada por Illumina MiSeq.** (Creado en Biorender.com)

El análisis de la secuenciación obtenida se realizó a través del pipeline Quatitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME v 1.9). Para la selección de las secuencias que presentaran una buena calidad se utilizó un valor de Phred>30 el cual determina la probabilidad de que la base llamada sea correcta. La asignación taxonómica se realizó en el algoritmo UCLUST, donde se empleó la base de datos GreenGenes v13\_08 como referencia. La determinación de las Unidades Taxonómicas operacionales (del inglés Operational Taxonomic Units; OTU) se realizó con un 97 % de identidad. Posterior a esto se filtraron las secuencias cuya abundancia fuera menor al 0.005% del total de las secuencias observadas en toda la muestra. Aunque no se ha establecido cual es la mejor medida para determinar la diversidad alfa, en este estudio la diversidad alfa fue determinada mediante tres diferentes parámetros; Chao1, el índice de Shannon y OTUs observados. Las OTUs observadas son el número de OTU por muestra y nos permiten comparar la riqueza entre diferentes comunidades, mientras que Chao1 es un método no paramétrico para estimar el número de especies en una comunidad, dando más peso a las especies de baja abundancia. En cambio el índice de Shannon es un estimador que utiliza un algoritmo natural para calcular la diversidad y riqueza, este contempla la riqueza y uniformidad basándose en los OTU, (Edgar, 2010; Caporaso et al., 2010; Illumina, s. f; Kim et al., 2017).

## **Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico se utilizaron los paquetes estadísticos Statistical Package for the Social Sciences (SPSS v.27.0.1.0) y Rstudio v.1.4.1106. Se realizó una prueba de Kolmogórov-Smirnov para determinar la distribución de los datos y de acuerdo a su distribución la prueba correspondiente. Para los parámetros clínicos con una distribución normal (circunferencia de cadera, colesterol, c-LDL) se realizó una prueba de t-Student para muestras independientes (prueba paramétrica), que compara las medias de los dos grupos. En el caso de los parámetros clínicos que no tenían una distribución normal, la prueba no paramétrica utilizada fue U-Mann Whitney. Para ambas pruebas se consideró como diferencias significativas aquellos con un valor de  $P < 0.05$ .

Para determinar la asociación lineal entre dos variables, considerando los efectos de una o más variables adicionales, se utilizó la correlación parcial de Pearson (prueba paramétrica) para variables con distribución normal y la prueba de Spearman (prueba no paramétrica) para aquellas variables que no seguían una distribución normal. Considerando valores significativos aquellos con un valor de  $p < 0.05$  y ajustando con la edad, el sexo y el percentil de IMC.

Para determinar los taxones que presentaron una diferencia significativa entre los grupos de estudio se utilizó el método del tamaño del efecto del análisis discriminante lineal (LDA) (LEfSe) en el servidor Huttenhower lab Galaxy. Este análisis combina la prueba de Kruskal-Wallis para todas las variables metagenómicas, la prueba de Wilcoxon y el modelo de análisis discriminante lineal (LDA) (Segata et al., 2011).

El análisis de la diversidad  $\beta$ , consistió en determinar la variabilidad de las comunidades bacterianas. Se utilizó el análisis de varianza multivariado permutacional usando (PERMANOVA), sobre las matrices de distancia de UniFrac ponderada (Weighted) y no ponderada (Unweighted).

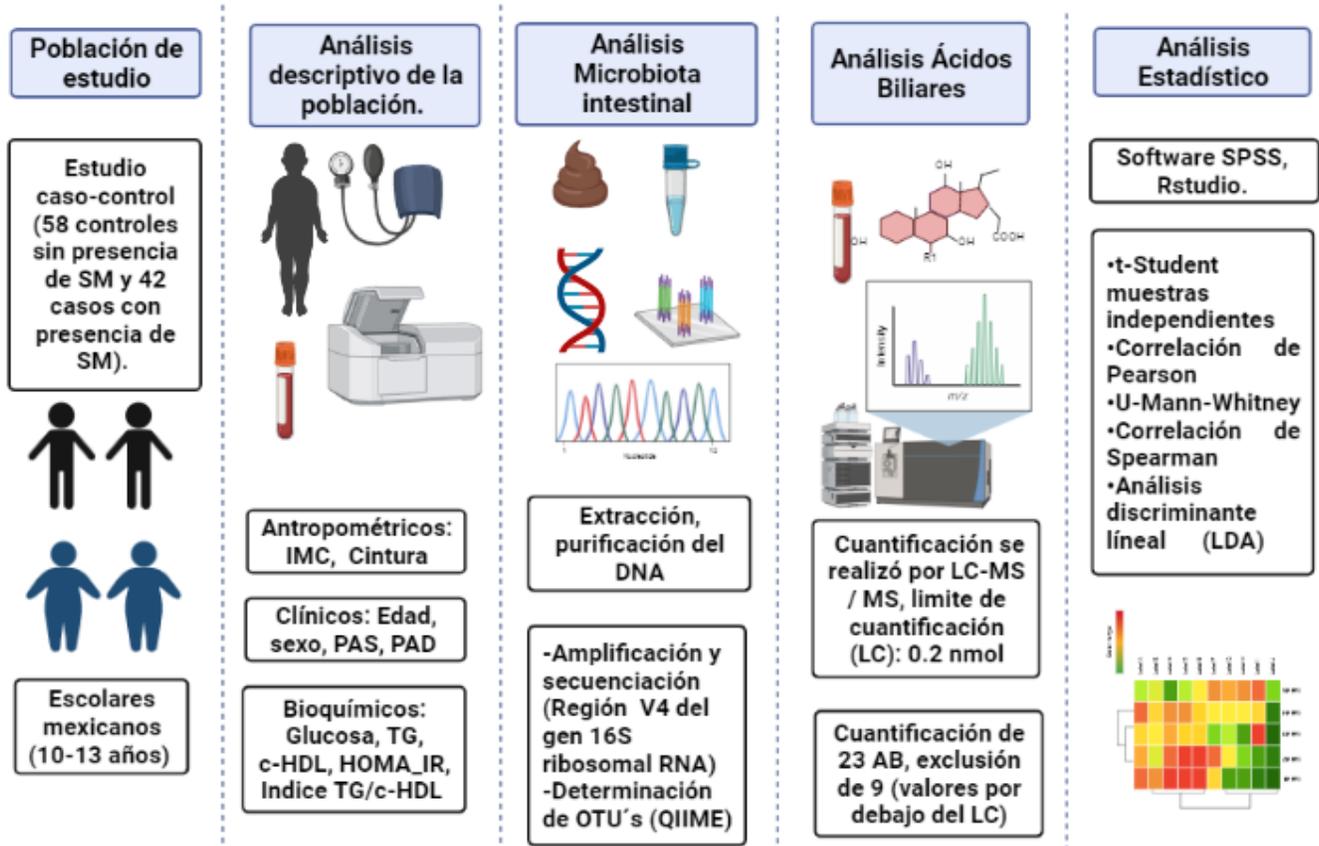


Figura 16. Esquema general de la metodología empleada. Creado en BioRender.com

## Resultados y discusión

### Características clínicas de la población.

El estudio de caso-control para la presencia de SM incluyó en un total de 100 niños (58 controles sin presencia de SM y 42 casos con presencia de SM), donde el 54% fueron niños y la mediana de edad fue de 11.28 años (10.60, 12.17). Los resultados descriptivos de las poblaciones se muestran en la Tabla 3. Al comparar los grupos no se encontraron diferencias significativas en el sexo ni en la edad, sin embargo, el grupo con SM mostró una diferencia significativa en los factores de riesgo característicos del SM: aumentando significativamente circunferencia de cintura, percentil de PAS, percentil de PAD, glucosa en ayuno, triglicéridos séricos y disminuyendo c-HDL. Además, en otros rasgos metabólicos asociados al SM, hubo un aumento significativo: particularmente, en el percentil de IMC, el peso, algunas enzimas hepáticas; como aspartato aminotransferasa y alanina aminotransferasa, así como en parámetros indicadores de RI como el HOMA-IR y el índice TG/HDL el cual está asociado con la sensibilidad hepática a la insulina y con SM (Burguete-García & Valdés-Villalpando, 2014). Dentro del grupo con SM las alteraciones que se presentaron en la mayor cantidad de los niños fueron; bajos niveles de c-HDL(100%), aumento de los triglicéridos (88.09%), niveles altos en el índice de TG/c-HDL (60.42%) y para variables asociadas a la obesidad como circunferencia de cintura ( el 95.24% fue mayor al percentil 75) y el percentil de IMC (el 50.00%.fue mayor al percentil 95). Lo anterior está asociado a la fisiopatología de la enfermedad en la cual la presencia de obesidad y RI conlleva a el aumento de la gluconeogénesis hepática, una disminución del transporte de glucosa en músculo esquelético y adipocitos, así como alteraciones en el metabolismo de lípidos particularmente en hígado y adipocitos. Por ejemplo, el aumento en los niveles de triglicéridos, la disminución del c-HDL y el aumento de la lipólisis.(Huang, 2009) Además los resultados de nuestra población son consistentes con reportes de que en población infantil mexicana los componentes del SM con una mayor prevalencia son la hipertrigliceridemia e hipoalfalipoproteinemia (Peña-Espinoza et al., 2017; Castillo et al., 2007).

**Tabla 3. Descriptivos de la población en el grupo control y en los casos.**

Parámetro	Sin SM (n=58)	Con SM (n=42)	Valor de <i>p</i>
<b>Datos clínicos</b>			
Sexo <sup>a</sup>	28:30	18:24	0.592
Mujeres: Hombres			
Edad (años) <sup>c</sup>	11.58 (10.68, 12.21)	11.28 (10.60, 12.17)	0.645
Peso <sup>c</sup> (Kg)	43 (35.50, 51.00)	53.00 (48.00, 62.00)	<b>1.2x10<sup>-6</sup></b>
Circunferencia cintura (cm) <sup>b</sup>	72.32 (10.757)	85.47 (9.009)	<b>4.3x10<sup>-9</sup></b>
Percentil IMC <sup>c</sup>	76.65 (43.40, 92.65)	94.90 (90.53, 97.30)	<b>3.x10<sup>-8</sup></b>
Percentil PAS <sup>c</sup>	37.9 (21.56, 68.26)	62.90 (39.35, 86.45)	<b>0.001</b>
Percentil PAD <sup>c</sup>	70.7 (52.96, 83.40)	85.5 (73.40, 96.25)	<b>6.9x10<sup>-5</sup></b>
<b>Homeostasis de glucosa</b>			
HOMA-IR <sup>c</sup>	1.42 (0.90, 2.45)	2.14 (1.64, 3.72)	<b>3.9x10<sup>-9</sup></b>
Glucosa (mg/dl) <sup>c</sup>	88 (85.00, 92.00)	91 (86.00, 97.00)	<b>0.043</b>
<b>Perfil de lípidos</b>			
TG séricos(mg/dl) <sup>c</sup>	67.00 (57.50, 83.00)	140.50 (115.75, 194.25)	<b>3.6x10<sup>-14</sup></b>
c-HDL (mg/dl) <sup>c</sup>	49.00 (43.00, 55.00)	39.50 (35.75, 43.00)	<b>3.9x10<sup>-9</sup></b>
LDL (mg/dl) <sup>b</sup>	101.43 (25.270)	101.63 (22.337)	0.968
Índice TG/c-HDL	1.38 (1.11, 1.88)	3.56 (2.97, 4.83)	<b>2.45x10<sup>-15</sup></b>
Colesterol (mg/dl) <sup>b</sup>	164.86 (29.648)	170.48 (25.202)	0.323
<b>Enzimas hepáticas</b>			
AST UI/L <sup>c</sup>	27.00 (22.00, 30.25)	30 (25.00, 36.00)	<b>0.017</b>
ALT UI/L <sup>c</sup>	18.00 (15.00, 24.00)	30.50 (22.75, 39.25)	<b>4.5x10<sup>-6</sup></b>

<sup>a</sup> Análisis de *Chi* cuadrada para datos categóricos ( $p < 0.05$ ). <sup>b</sup> Medias, método paramétrico (t-Student para muestras independientes),  $p < 0,05$ . <sup>c</sup> Medianas, método no paramétrico (U Mann-Whitney)  $p < 0,05$ . IMC: índice masa corporal; PAS: presión arterial sistólica; PAD presión arterial diastólica; TG: triglicéridos; HOMA-IR: evaluación del modelo de homeostasis para la resistencia a la insulina; HDL: colesterol de lipoproteínas de alta densidad, LDL: colesterol de lipoproteínas de baja densidad; AST: aspartato aminotransferasa; ALT: alanina aminotransferasa.

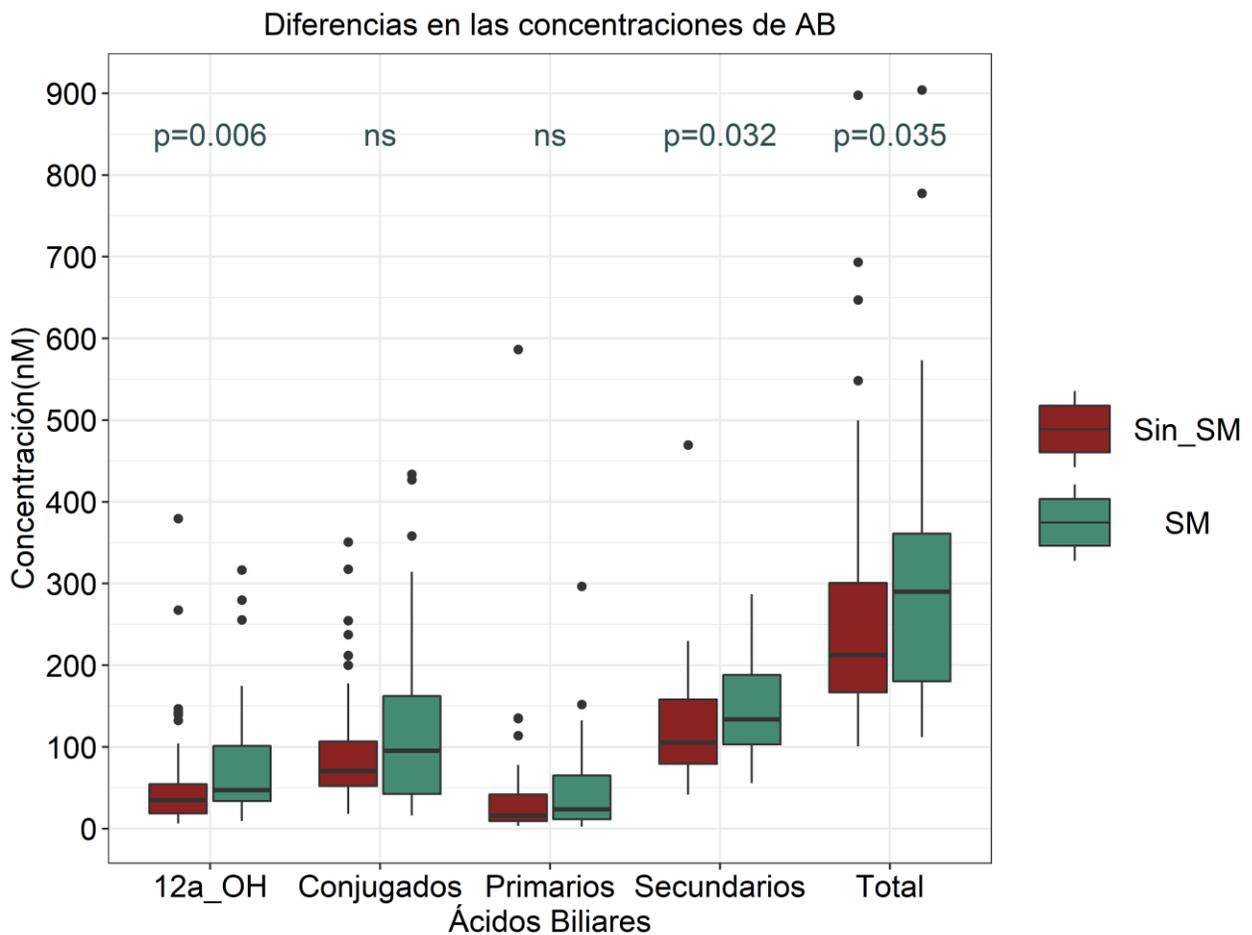
Para determinar si el sexo estaba influyendo en las diferencias anteriores, se realizó una comparación de los mismos parámetros clínicos y bioquímicos. Aunque no hubo una diferencia significativa entre los sexos en cuanto a los principales factores de riesgo asociados al SM, al analizar algunos otros parámetros se encontró que las enzimas hepáticas como AST ( $p=0.009$ ), ALT ( $p=0.021$ ) y la circunferencia de cintura ( $p=0.025$ ) mostraron un aumento significativo en hombres (Apéndice; Anexo 1: Tabla 1). Se ha observado en diferentes estudios realizados en población pediátrica niveles más elevados de estas enzimas hepáticas en niños en comparación con los niveles presentados por las niñas. Se ha sugerido que esto podría deberse a las diferencias de masa corporal y las diferencias en las hormonas sexuales que presentan ambos sexos (Poustchi et al., 2011).

### **Diferencias en el perfil sérico de AB y su relación con el SM.**

Como uno de los principales objetivos del estudio, se planteó el análisis de los AB en circulación. Con respecto al grupo control, en los niños con SM se observó un aumento significativo principalmente en 3 grupos de AB (Figura 17): los AB secundarios incrementaron en un 26.79% ( $p=0.032$ ), los ácidos  $12\alpha$ -hidroxilados en un 34.40% ( $p=0.006$ ) y los AB totales aumentaron en un 36.48% ( $p=0.035$ ). Llama la atención dentro de estos grupos que el ácido desoxicólico ADC (Tabla 4) fue el único que tuvo un aumento significativo del 115.98% ( $p=0.002$ ). Al realizar las comparaciones entre sexo, el único que tuvo una diferencia significativa fue en el grupo de los hombres donde el ácido taurocólico A(T)C aumento ( $p=0.031$ ) (Apéndice; Anexo 1; Tabla 2).

Dado que el SM es conjunto de rasgos metabólicos asociados a la RI, sus indicadores tienen un papel muy importante. Aunque no existen estudios en población pediátrica, en estudios previos realizados en población adulta, se ha observado que el aumento de los AB  $12\alpha$ -OH se asocia con características clave de la RI, que incluyen niveles más altos de insulina y TG, así como niveles más bajos de c-HDL. Por lo que, resultan consistentes con nuestros resultados (Figura 17 y Tabla 4). Dada la naturaleza transversal del estudio no se puede establecer la causalidad, sin embargo, el incremento de los AB  $12\alpha$ -OH podría derivarse de la RI. Esto debido a que la insulina influye en la regulación del CYP8b1 que se encarga principalmente de la producción de los AB  $12\alpha$ -OH (Haeusler et al., 2013). Particularmente en un estado de RI, FOXO1, presenta una mayor actividad lo que promueve la activación de CYP8b1 (Figura 18) (Haeusler et al., 2013; Haeusler et al., 2012; Yoshitsugu et al., 2020; Staels & Prawitt, 2013).

Dentro de los AB  $12\alpha$ -OH se encuentra el ADC, que es el único que de forma individual presentó una mayor concentración en los sujetos con SM y que pertenece a los otros 2 grupos que tuvieron un aumento significativo. El ADC es un AB hidrófobo y se ha reportado que su aumento modifica el índice de hidrofobicidad de los AB, provocando mayores propiedades detergentes y capacidad para romper membranas celulares. Aunque no se puede determinar exactamente las implicaciones del aumento del ADC la evidencia sugiere que el aumento en la hidrofobicidad de los AB incrementa el estrés del retículo endoplásmico (RE) hepático, disminuyendo la señalización de la insulina hepática (Figura 18) (Zaborska et al., 2018, McGlone & Bloom, 2019). De acuerdo con esto, podríamos sugerir que la RI puede influir en la alteración de los AB al incrementar los niveles de los AB  $12\alpha$ -OH, y de forma recíproca el aumento del ADC podría contribuir a la RI. Sin embargo, hasta donde sabemos ningún estudio ha reportado esta respuesta bidireccional entre los AB  $12\alpha$ -OH, el ADC y la RI.

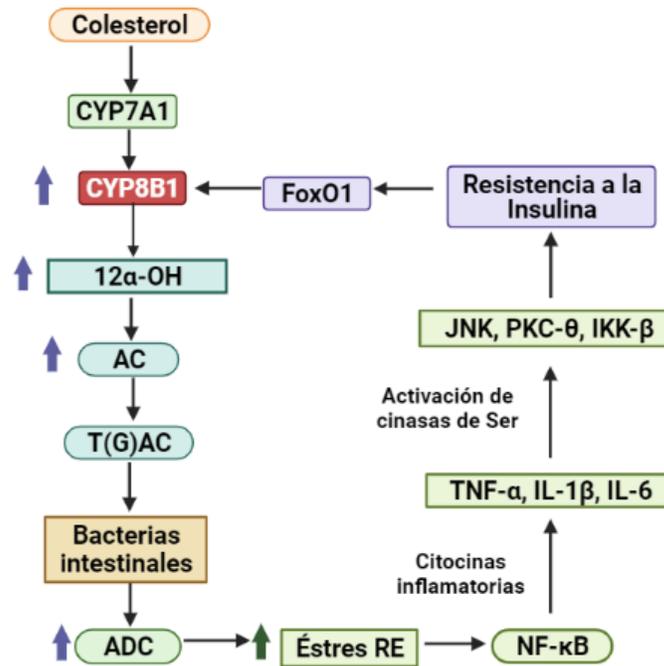


**Figura 17. Diferencias en la concentración de los distintos grupos de AB**

**Tabla 4. Análisis de los AB entre el grupo control y el grupo de muestra**

AB	Concentraciones de AB en suero (nM)		
	Sin SM	Con SM	Valor de <i>p</i>
<b>AB primarios <sup>c</sup></b>			
AC <sup>c</sup>	5.41 (3.05, 10.88)	7.5300 (3.19, 12.74)	0.328
AQDC <sup>c</sup>	11.21 (5.78, 29.33)	15.89 (7.56, 53.41)	0.09
<b>AB conjugados</b>			
A(T)LC <sup>c</sup>	0.77 (0.26, 1.50)	0.60 (0.21, 1.12)	0.414
A(G)LC <sup>c</sup>	3.16 (1.21, 5.29)	2.28 (1.03, 5.86)	0.564
A(T)DC <sup>c</sup>	0.57 (0.31, 0.87)	0.64 (0.29, 1.42)	0.279
A(G)DC <sup>c</sup>	5.88 (2.82, 9.84)	7.63 (4.76, 18.63)	0.052
A(G)UDC <sup>c</sup>	5.37 (2.89, 9.96)	7.01 (2.43, 15.42)	0.296
A(G)QDC <sup>c</sup>	35.78 (25.57, 51.78)	51.54 (20.85, 93.35)	0.222
A(T)QDC <sup>c</sup>	13.06 (9.25, 22.93)	12.78 (7.67, 28.12)	0.845
A(T)C <sup>c</sup>	0.67 (0.46, 1.57)	0.75 (0.47, 1.65)	0.630
A(G)C <sup>c</sup>	0.96 (0.59, 1.74)	1.14 (0.58, 3.20)	0.432
<b>AB secundarios</b>			
ALC <sup>c</sup>	66.47 (51.04, 86.78)	64.67 (48.15, 94.17)	0.967
ADC <sup>c</sup>	14.89 (7.22, 32.74)	32.16 (14.59, 52.20)	<b>0.002</b>
AUDC <sup>c</sup>	20.22 (13.35, 38.13)	29.01 (13.18, 45.61)	0.281

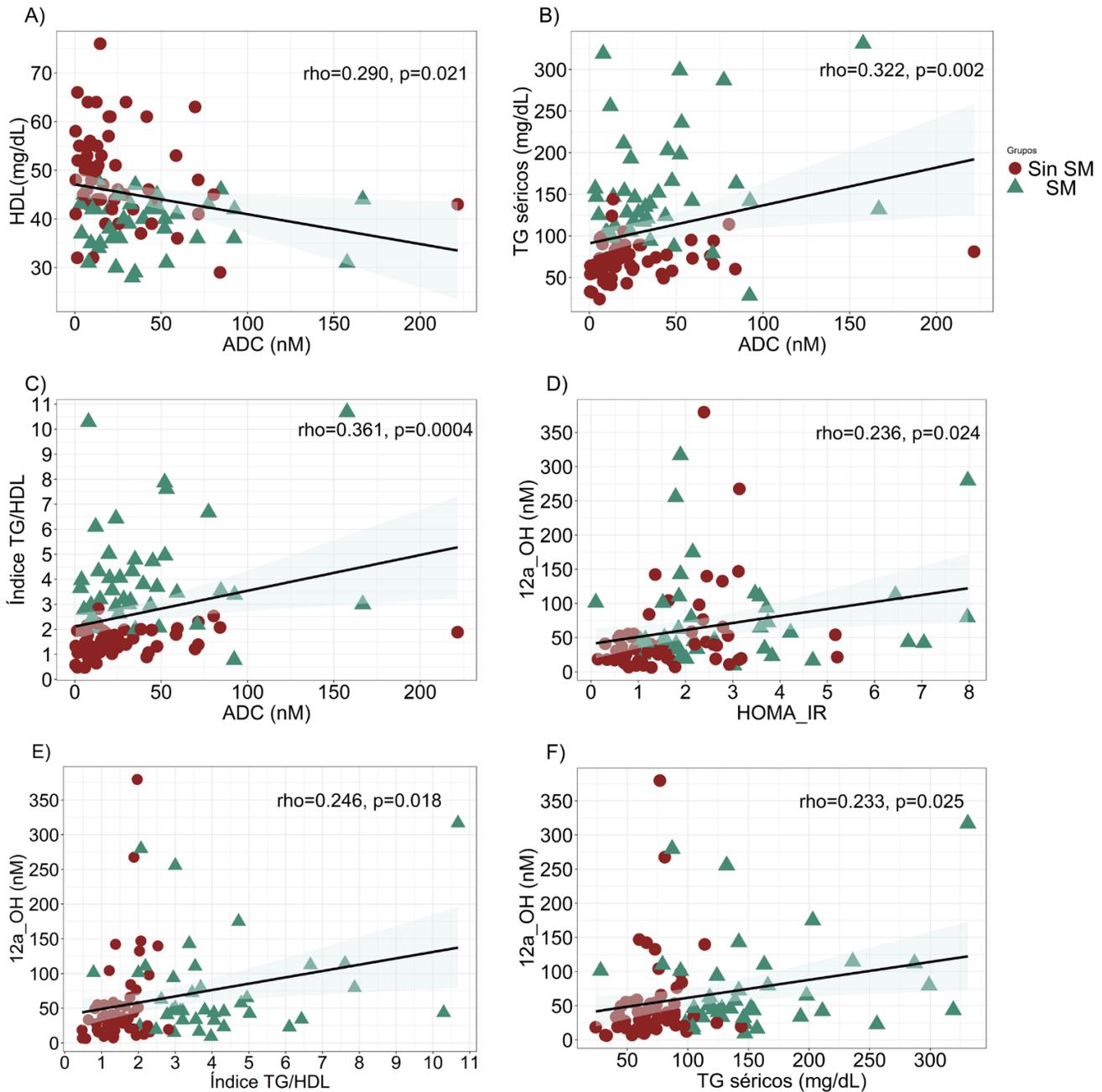
<sup>c</sup>Medianas, método no paramétrico (U Mann-Whitney, **p < 0.05**). AC: Ácido cólico; AQDC: Ácido quenodesoxicólico; A(T)LC: Ácido taurolitocólico; A(G)LC: Ácido glicolitocólico; A(G)QDC: Ácido Glicoquenodesoxicólico; A(T)QDC: Ácido Tauroquenodesoxicólico; A(T)DC: Ácido Taurodesoxicólico; A(G)DC: Ácido Glicodesoxicólico; A(G)UDC: Ácido Glicoursodesoxicólico; A(T)C :Ácido Taurocólico; A(G)C: Ácido Glicocólico; ALC: Ácido litocólico; ADC: Ácido desoxicólico; AUDC: Ácido ursodesoxicólico.



**Figura 18. Influencia de la RI en el aumento de los AB 12α-OH y el ADC.** Creado en BioRender.com

Posterior a esto, para observar la asociación de los AB diferenciados con los diferentes rasgos particulares del SM, se realizaron correlaciones parciales ajustadas por sexo, edad y además por pIMC para los parámetros bioquímicos, debido a que este influye en la variación de algunos parámetros metabólicos a evaluar. De forma consistente se observó que principalmente el ADC y los AB 12α-OH presentaban correlaciones significativas con los parámetros asociados al SM (Figura 19). Los AB 12α-OH se correlacionaron positivamente con el índice TG/HDL, los TG séricos y el HOMA-IR (Figura 19). Además, los AB secundarios presentaron una correlación positiva y significativa con el índice TG/HDL y negativa con el c-HDL (Apéndice; Anexo 2, Figura 1). El ADC (Figura 19) se correlacionó positivamente con los TG séricos, el índice TG/HDL y negativamente con el c-HDL.

De acuerdo con estos resultados, el aumento de AB 12α-OH y particularmente el ADC, podría estar asociado a una menor activación de FXR, debido a que son ligandos con menor potencia. Esto a su vez podría estar influyendo en el aumento de TG séricos y la disminución de c-HDL, ya que FXR influye en el metabolismo de lipoproteínas. Además, una menor activación de FXR, disminuiría la expresión de SHP, provocando el aumento de la expresión de CYP8b1 y con ello contribuyendo al aumento de los AB 12α-OH (Haeusler et al., 2012; Staels & Prawitt, 2013; Shapiro et al., 2018).



**Figura 19. Gráficas de correlación entre los AB 12 $\alpha$ -hidroxilados y el ADC en relación a los parámetros metabólicos que presentaron una asociación significativa.** A) Correlación entre el ADC y los niveles de HDL. B) Correlación entre el ADC y los TG séricos, C) Correlación entre el ADC y el Índice de TG/HDL, D) Correlación entre los AB 12 $\alpha$ -OH y el HOMA-IR, E) Correlación entre los AB 12 $\alpha$ -OH y el Índice TG/HDL, F) Correlación entre los AB 12 $\alpha$ -OH y los TG séricos.

### Caracterización de las bacterias intestinales

Con base al segundo objetivo establecido, se realizó el análisis de la diversidad de las bacterias intestinales. Para el estudio de la diversidad  $\alpha$  se utilizaron tres parámetros que nos permitieron evaluar la riqueza y diversidad de las muestras. En los niños con SM se observó una

disminución significativa en los 3 parámetros (el índice de Shannon, la riqueza de Chao y las OTUs observadas) en comparación con el grupo control (Figura 20). Con base en nuestros resultados la presencia del SM en población infantil podría estar asociado a un estado de disbiosis, caracterizado por una menor diversidad.

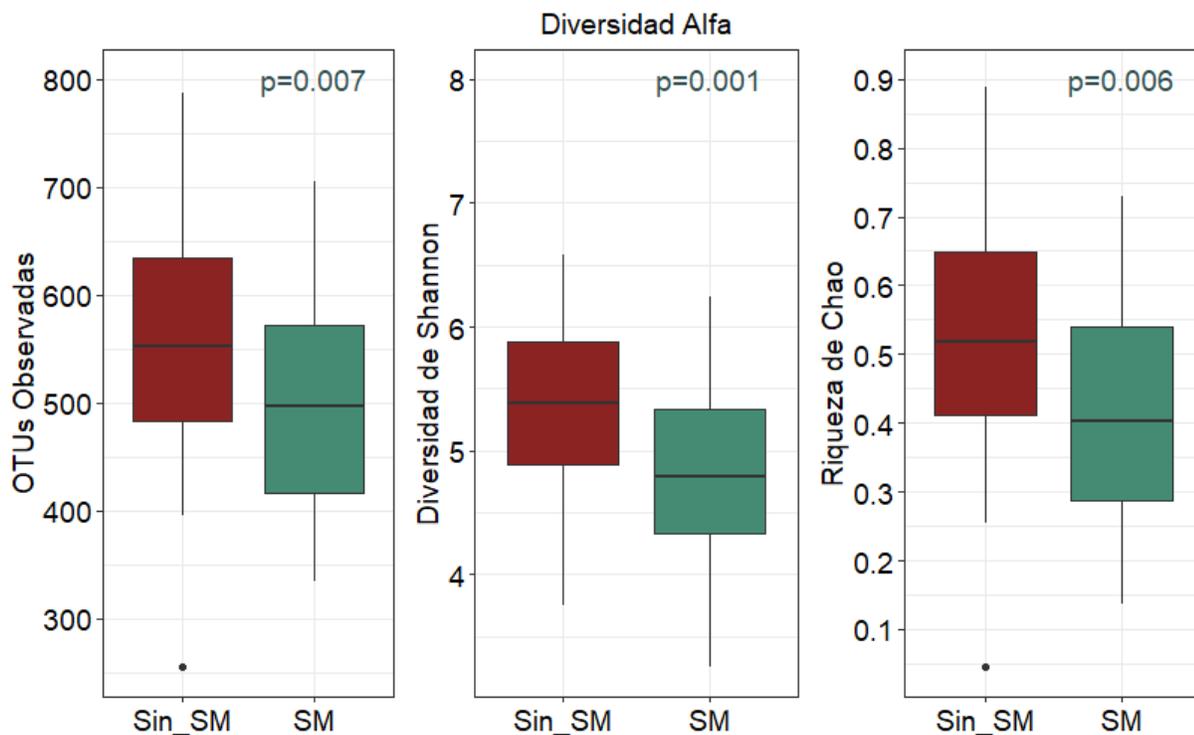
La determinación de la diversidad bacteriana intestinal resulta de gran importancia debido a que nos brinda un panorama sobre la riqueza y abundancia del entorno bacteriano. La alta diversidad bacteriana se asocia con individuos sanos, debido a que una elevada diversidad de especies bacterianas presenta una mayor resistencia a alteraciones ya sea por factores ambientales, factores dietéticos, consumo de antibióticos y otros. *Lozupone et al.* plantea que esto se debe a que la competitividad entre un mayor número de especies por los nutrientes restringidos y la adaptabilidad de estas especies al entorno les permite mantener limitado el crecimiento excesivo de otras especies (Lozupone et al., 2012). Además, una alta diversidad permite que bacterias con funciones similares intervengan cuando una especie abundante se ve afectada por alguna alteración (Sommer et al., 2017).

En cambio, una baja diversidad bacteriana intestinal es un indicador de un estado de disbiosis, ya que, como se mencionó anteriormente varios estudios han informado que, en poblaciones pediátricas, una menor diversidad está asociada con la RI y la obesidad. De acuerdo con lo que sugiere *Kriss et al.*, la disbiosis de baja diversidad podría estar relacionada principalmente a un aumento de bacterias anaerobias facultativas y la disminución de las bacterias anaerobias. Además de una menor abundancia de anaerobios intestinales encargados de la producción de AGCC como los taxones *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae* y *Faecalibacterium prausnitzii* (Kriss et al., 2018).

Esto es consistente con estudio previos que muestran la relación entre una menor diversidad bacteriana intestinal y diferentes alteraciones metabólicas (Kriss et al., 2018), sin embargo, en el contexto del SM nuestro estudio es de los primeros en mostrar esta relación en población infantil mexicana. Esto resulta de gran relevancia para comprender cómo se relaciona este factor con la fisiopatología del SM, lo cual podría ayudar con el desarrollo de futuras investigaciones enfocadas en nuevos tratamientos.

Para observar la influencia del SM sobre la variabilidad en la composición de las comunidades bacterianas se realizó el análisis de la diversidad  $\beta$ , la cual se puede medir en dos categorías: medidas cualitativas, que utilizan la presencia/ausencia de datos para comparar la composición de la comunidad y medidas cuantitativas, que también tienen en cuenta la

abundancia relativa de cada tipo de organismo. Con base en esto se usó la distancia Unifrac no ponderada (medida cualitativa) y Unifrac ponderada (cuantitativa). A partir de un análisis estadístico no paramétrico (PERMANOVA) y con la métrica Unifrac se obtuvo un valor de la variación de la composición de las bacterias intestinales. En donde la presencia del SM, solo cuando se utilizó Unifrac no ponderado tuvo un valor significativo del 2.784 % ( $p=0.0046$ ).



**Figura 20. Gráficas de las diferencias de diversidad  $\alpha$  entre el grupo sin SM y con SM. (t-Student para muestras independientes).**

### Estudio de la composición de las bacterias intestinales a nivel taxonómico

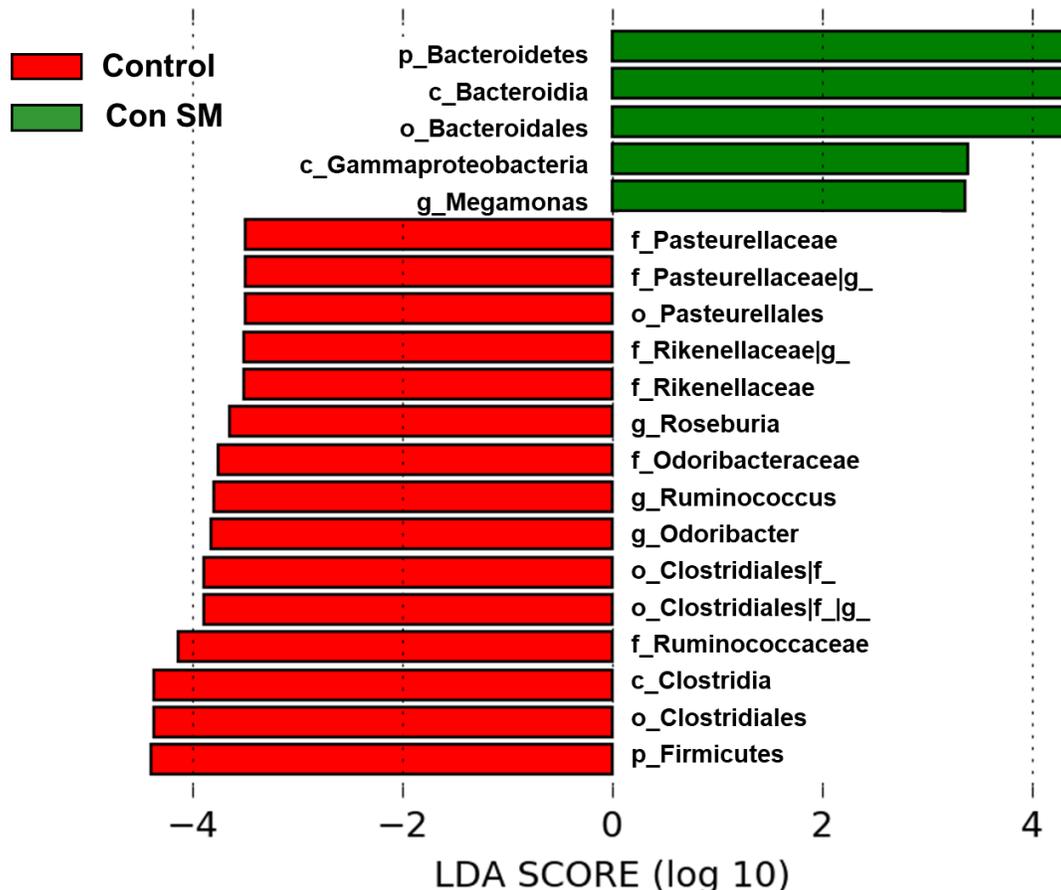
Con la finalidad de observar que taxones se encontraban diferenciados en el grupo con SM, se realizó el estudio de las OTUs, a través de un análisis discriminante lineal (LDA). En el grupo con SM se observó que se encontraban enriquecidos los siguientes taxones: el phylum *Bacteroidetes*, clase *Bacteroidia*, orden *Bacteroidales*, la clase *Gammaproteobacteria* y el género *Megamonas*. Mientras que en el grupo sin SM los taxones enriquecidos fueron: el phylum *Firmicutes*, la clase *Clostridia*, el orden *Clostridiales* y un género no identificado perteneciente a este taxón; la familia *Rikenellaceae* y *Ruminococcaceae*, el género *Ruminococcus* y un género desconocido perteneciente a la familia *Rikenellaceae*. De igual forma se encontraban enriquecidos la familia *Odoribacteraceae*, género *Odoribacter*, los taxones pertenecientes a la clase *Pasteurellales*, familia *Pasteurellaceae* y un género no identificado perteneciente a este taxón (Figura 21).

La microbiota intestinal está constituida principalmente por 6 phylum *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria* y *Verrucomicrobia*, de los cuales los más abundantes resultan ser los phylum *Bacteroidetes* y *Firmicutes* (Boulangé et al., 2016; Hollister et al., 2015). La relación de estas dos divisiones a menudo se asocia con la obesidad, que es un factor importante para el desarrollo del SM y que podría estar relacionado con el aumento de *Bacteroidetes* en el grupo con SM (P.-X. Wang et al., 2020; Angelakis et al., 2012). De acuerdo con diversos estudios, se ha observado un aumento de *Bacteroidetes* en grupos con sobrepeso y obesidad, y una disminución en el taxón *Firmicutes* (P.-X. Wang et al., 2020; Schwartz et al., 2010), que resulta consistente con los resultados obtenidos. Sin embargo, otros estudios han observado el aumento de *Firmicutes* en grupos con obesidad y una disminución en los *Bacteroidetes*. Por ejemplo, en el estudio realizado por Vazquez-Moreno et al., en el que se evaluó a 330 niños pertenecientes a la Ciudad de México y el estado de Oaxaca, el taxón *Firmicutes* se asoció de manera positiva y significativa con el grupo de niños con obesidad (Vazquez-Moreno et al., 2021). Estas inconsistencias en la proporción de *Firmicutes* /*Bacteroidetes* podrían deberse a factores como la dieta, la ubicación geográfica o diferentes aspectos ambientales que influyen en la composición bacteriana (López-Contreras et al., 2018; Devkota et al., 2012).

El aumento de *Bacteroidetes* en el grupo con SM también podría estar asociado con la RI. Por un lado, se ha observado que, en grupos con RI, hay un aumento de este grupo. Además, los *Bacteroidetes* y el taxón *Gammaproteobacteria* son un grupo de bacterias Gram-negativas, que contienen LPS en su membrana externa, que es un activador de los receptores tipo Toll 4 (TLR4) y esta unión activa una respuesta inflamatoria. Por ello, el aumento de LPS está asociado con la alteración de la permeabilidad intestinal, como la ruptura de las uniones estrechas que conduce a la translocación de LPS, lo cual puede inducir inflamación y RI en humanos (Boulangé et al., 2016; Larsen et al., 2010; Saad et al., 2016).

Por otro lado, *Megamonas* uno de los géneros que resultó enriquecido en el grupo con SM, presentó mayor abundancia en un grupo de población infantil mexicana con obesidad (Maya-Lucas et al., 2019). Además *Megamonas* se encontró relacionado con el aumento de los TG, lo que podría deberse a que este género es un productor de metano, ácido acético y propiónico y estos metabolitos aumentan los niveles de acetil CoA el cual está asociado al aumento en los TG y colesterol en sangre (Maya-Lucas et al., 2019; Polansky et al., 2016). De igual forma la clase *Gammaproteobacteria* que se presentó enriquecida en el grupo con SM, se ha encontrado aumentada en adultos con obesidad (Peters et al., 2018; Festi et al., 2014).

Por otra parte, se encontró que los taxones *Odoribacter* y *Rikenellaceae* estaban enriquecidos en el grupo sin SM lo cual es consistente con el estudio realizado por *Lim MY, et al.*, donde estos taxones se encontraron enriquecidos con el grupo de adultos sanos en comparación con aquellos que presentaban SM (*Lim et al., 2017*). Además en estudios realizados en población infantil *Odoribacter*, *Rikenellaceae* y también el género *Ruminococcus* se encontraron enriquecidos en los grupos sanos, comparado con los niños que presentaron obesidad (*X. Chen et al., 2020; Del Chierico et al., 2018*). Otros taxones enriquecidos en el grupo sin SM fueron los taxones *Clostridia* y *Roseburia*, los cuales se han observado en menor abundancia en grupos de adultos con RI y en diabéticos (*Larsen et al., 2010; Saad et al., 2016; Tamanai-Shacoori et al., 2017*). Llama la atención que estos taxones son productores de AGCC en particular de butirato el cual ayuda en el mantenimiento del sistema inmunitario y tiene propiedades antiinflamatorias, por lo cual podrían ser estos sus mecanismos de acción (*Devkota et al., 2012; Saad et al., 2016*).



**Figura 21. Análisis discriminante lineal (LDA) para evaluar el tamaño del efecto (LEfse), para el estudio de los taxones diferenciados en el grupo sin SM y para el grupo con SM.**

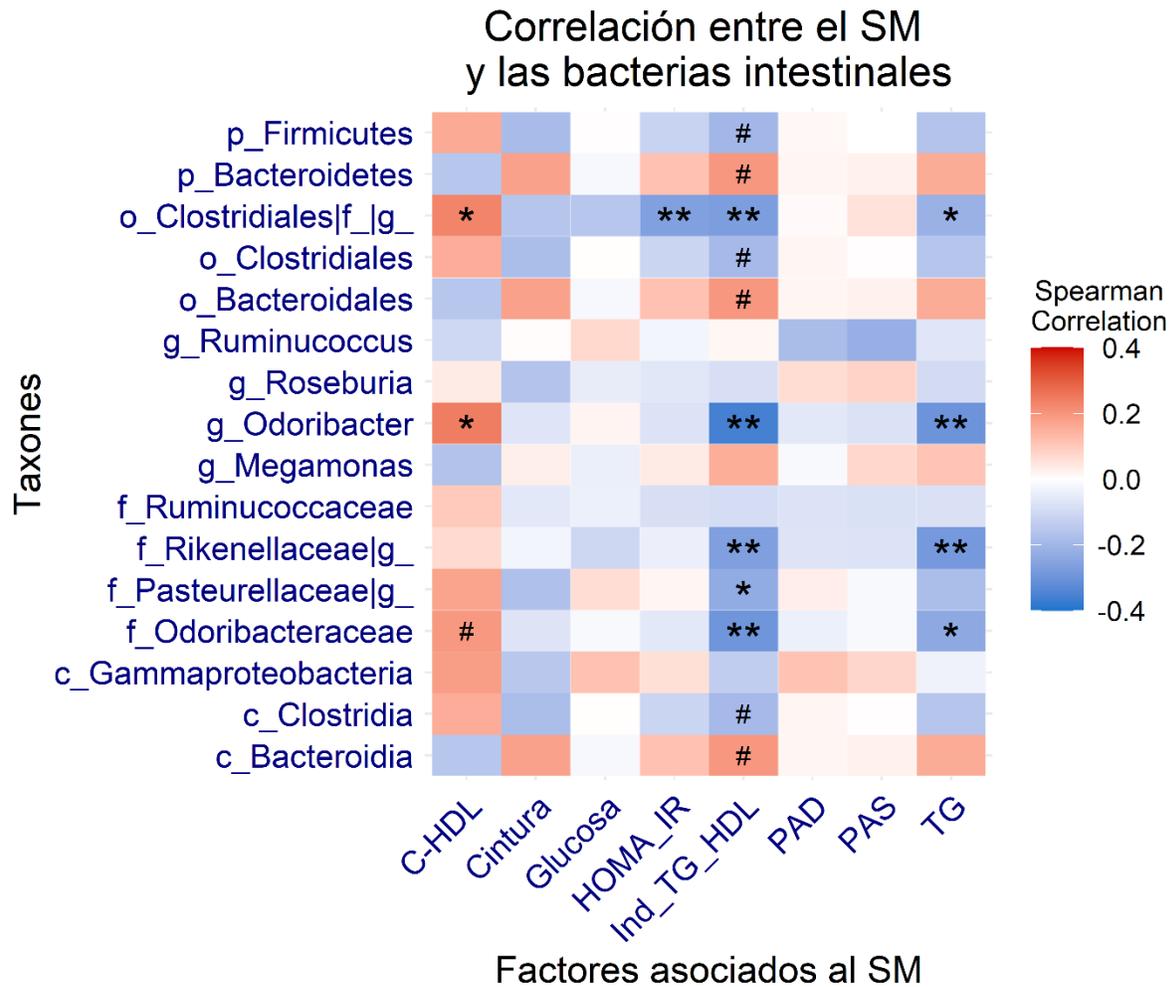
## **Relación entre la microbiota intestinal y factores asociados al SM.**

Después de analizar los taxones enriquecidos en el SM y en el grupo control, para comprender mejor cómo están asociados con los diferentes factores del SM se realizaron pruebas de correlación de Spearman. Aunque no se encontraron correlaciones significativas entre los taxones enriquecidos en el grupo con SM, el phylum *Bacteroidetes* y orden *Bacteroidales* resultaron tener una correlación positiva con el índice TG/c-HDL con un valor muy cercano a la significancia ( $\rho=0.197$ ,  $p=0.053$ ). Esto contribuye a los resultados del análisis anterior donde el aumento de los *Bacteroidetes* en el grupo con SM podría estar asociado a la RI principal factor subyacente del SM (Figura 22). Por otro lado, resulta interesante que los taxones enriquecidos en el grupo control mostraron correlaciones negativas y significativas con el índice de TG/c-HDL, los TG séricos y positivas con el c-HDL (Figura 22). Dentro de estas variables el índice de TG/c-HDL y los TG séricos presentaron correlaciones negativas principalmente con un género desconocido perteneciente a la familia *Pasteurellaceae*; la familia *Odoribacteraceae*, el género *Odoribacter* y con un género desconocido perteneciente a los *Clostridiales*. Como se mencionó anteriormente en diferentes estudios estos taxones se han encontrado enriquecidos en grupos de adultos sanos en comparación con aquellos que presentaban obesidad o RI, lo cual es consistente con los resultados.

El género no identificado perteneciente al orden *Clostridiales*, fue el principal taxón asociado negativamente a componentes del SM, como la RI y la dislipidemia. Esto coincide con lo reportado en diferentes investigaciones enfocadas en adultos con RI o DM2 en donde el taxón *Clostridiales* presentó una menor abundancia en estos grupos (Larsen et al., 2010; Saad et al., 2016).

Se ha observado en otros estudios que los *Clostridiales* productores de butirato, incluyendo los géneros *Clostridium*, *Roseburia*, *Faecalibacterium* y *Phascolarctobacterium*, estaban disminuidos en adultos con DM2 (Naderpoor et al., 2019; Chen et al., 2021; Yamashita et al., 2019; Coppola et al., 2021). Dentro de nuestros resultados estos taxones mencionados también presentaron correlaciones negativas con variables asociadas a la RI, como el HOMA\_IR, Índice de TG/c-HDL y glucosa, sin embargo, después de la corrección por pruebas múltiples, sólo el género *Faecalibacterium* mostró valores de P con una tendencia a la significancia ( $P<0.1$ ), (Apéndice; Anexo 3, Tabla 3). De acuerdo con nuestros hallazgos y con lo reportado en la literatura se podría especular que el género no identificado perteneciente al orden *Clostridiales* es posiblemente un productor de butirato lo que podría explicar las correlaciones negativas encontradas principalmente con indicadores de RI como el HOMA-IR

y el índice TG/c-HDL. De tal forma resultaría interesante un estudio enfocado en la detección de los genes bacterianos asociados a la síntesis de butirato, como el butiril-CoA: acetato CoA-transferasa (*but*) y butirato quinasa (*buk*). Con base en esto se podría obtener un estudio más detallado acerca de cómo las bacterias intestinales y en particular en nuestro caso este género no identificado perteneciente al orden *Clostridiales* se encuentra asociado con la presencia del SM en población infantil (Vital et al., 2013).



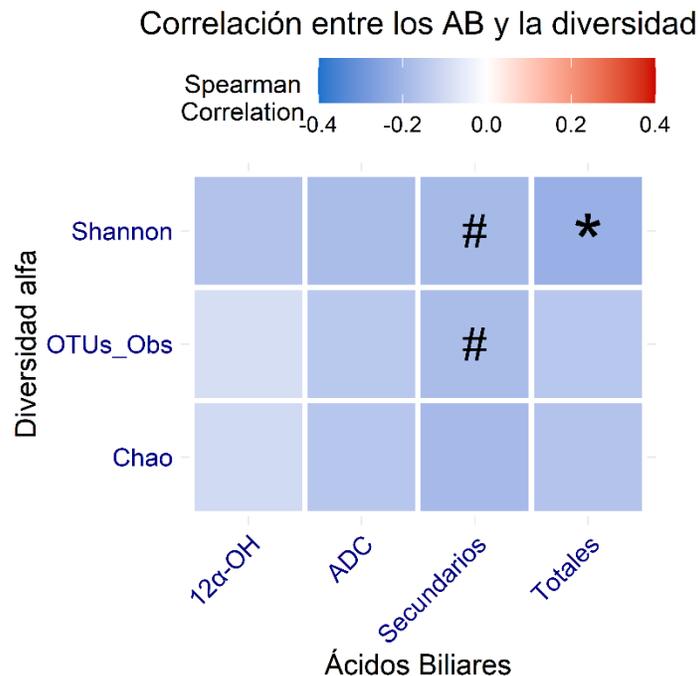
**Figura 22. Análisis de correlación parcial entre los principales taxones diferenciados y los factores de riesgo asociados al SM.** Correlación de Spearman ( $p < 0.05$ )\*; Con tendencia significativa (#). Ajustado por edad, IMC y sexo.

### Relación entre las bacterias intestinales y los AB

Como parte del tercer objetivo, el cual consistía en analizar la asociación entre la composición bacteriana intestinal y los AB circulantes se realizó una correlación para observar la asociación entre la diversidad alfa y los AB diferenciados. De forma interesante, se observó una asociación negativa de la riqueza de Chao, el índice de Shannon y las OTUs observadas con los AB diferenciados. Sin embargo, solo la correlación con los AB totales fue significativa con

la diversidad de Shannon ( $\rho = -0.218$ ,  $p = 0.035$ ), mientras que la asociación con los AB secundarios mostró valores cercanos a la significancia con respecto a la Diversidad de Shannon ( $\rho = -0.190$ ,  $p = 0.068$ ) y la Riqueza de Chao ( $\rho = -0.191$ ,  $p = 0.066$ ) (Figura 23).

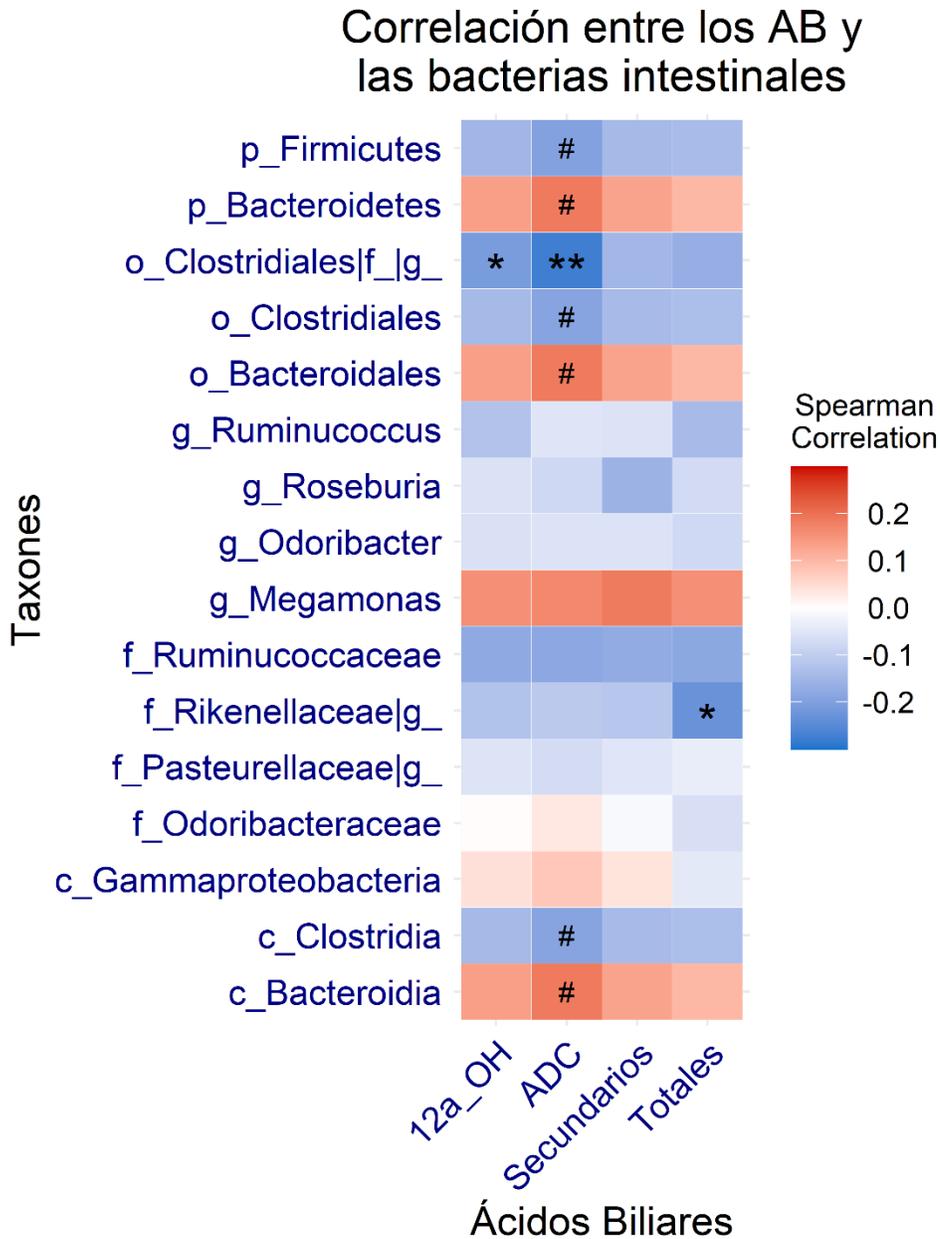
La relación entre los AB y la diversidad bacteriana intestinal ha sido analizada en otros estudios; en el trabajo de *Just et al.*, a través de un modelo murino se observó que la suplementación de AB (AC y AQDC) indujo valores significativamente menores en los recuentos efectivos de Shannon (Just et al., 2018). Además en otro estudio realizado por *Van Best et al.*, que analizó cómo los AB influyen en la maduración de la microbiota intestinal en ratones suplementados con AB (AGC, ATC, A $\beta$ TMC o AUDC), se encontró que solo aquellos ratones suplementados con los AB conjugados (A(T)C y A $\beta$ TMC) mostraron una riqueza (especies observadas) significativamente mayor comparada con los controles (van Best et al., 2020). Con base en estudios previos y nuestros resultados podemos observar que cada tipo de AB tiene un efecto distinto en la modulación bacteriana intestinal. Sin embargo, hasta donde sabemos, nuestro trabajo es uno de los primeros en mostrar que los AB diferenciados en población infantil con SM están correlacionados con la diversidad alfa de las bacterias intestinales.



**Figura 23. Análisis de la correlación entre los AB diferenciados y la diversidad alfa.** Correlación parcial de Spearman ( $p < 0.05$ )\*; Con tendencia significativa (#). Ajustado por edad, pIMC y sexo.

Adicionalmente, también se analizó la relación entre los taxones enriquecidos en los grupos de estudio y los AB diferenciados. Llama la atención que principalmente los AB 12 $\alpha$ -OH y el

ADC se correlacionaron significativa y negativamente con el género no identificado perteneciente al orden *Clostridiales*. Además, los AB totales se asociaron negativamente con un género desconocido perteneciente a la familia *Rikenellaceae* (Figura 24). En contraste los taxones enriquecidos en el grupo con SM; *Bacteroidetes*, *Bacteroidia* y *Bacteroidales* mostraron una correlación positiva, aunque solo como tendencia ( $\rho=0.188$ ,  $p=0.072$ ) con la concentración del ADC. Por otro lado, los taxones *Firmicutes*, *Clostridia* y *Clostridiales* también mostraron una correlación con tendencia a la significancia ( $\rho_{Firmicutes}=-0.195$ ,  $p_{Firmicutes}=0.060$ ,  $\rho_{Clostridia, Clostridiales}=-0.189$ ,  $p_{Clostridia, Clostridiales}=0.069$ ) pero negativa con el ADC.



**Figura 24. Análisis de correlación de Spearman entre las bacterias enriquecida y los principales AB diferenciados** (\* $p<0.05$ .\*\* $p<0.01$ ); Con tendencia significativa (#). Ajustado por edad, IMC y sexo.

Dentro del íleon, el 95 % de los AB secretados inicialmente al intestino son reabsorbidos y el 15% ingresa al colon donde son biotransformados por las bacterias intestinales y reabsorbidos para someterse a la circulación enterohepática (aproximadamente el 10 % de los AB logran pasar a la circulación sistémica), (Di Ciaula et al., 2017; Šarenac & Mikov, 2018). A pesar de lo anterior, en un estudio realizado por *Van Faassen et al.*, se demostró que el perfil de AB en plasma refleja el perfil de AB intestinales (van Faassen et al., 1997), aunque debido a los procesos de reabsorción por los que pasan para llegar a la circulación sistémica su concentración se puede ver disminuida (Ahmad & Haeusler, 2019). Si bien es importante señalar que en nuestro estudio la determinación de los AB se realizó en suero, la alteración en la composición de los AB podría también estar influyendo en la composición de las bacterias intestinales. Particularmente la alteración de las bacterias intestinales podría estar relacionada con las características antimicrobianas de los AB presentes en el intestino. Los AB constituyen el 50 % de los componentes de la bilis y de acuerdo al perfil de los AB se pueden modificar las características hidrofóbicas y antimicrobianas que tiene la bilis. Con base en esto la bilis participa de manera importante en la modulación de la composición bacteriana intestinal, ya que puede modificar la abundancia de aquellas bacterias que presentan una mayor sensibilidad y permitir el enriquecimiento de taxones resistentes (Ridlon et al., 2006; Begley et al., 2005).

Por ejemplo, en diferentes estudios se ha reportado que las bacterias Gram-negativas tienen una mayor resistencia a la bilis debido a las características estructurales de su membrana externa, pues se ha observado que aquellas bacterias que carecen del antígeno O en el LPS son más susceptibles a la bilis. También se ha reportado que la presencia de bombas de eflujo y porinas está asociada con una mayor resistencia a los efectos bactericidas de la bilis (Casadesús et al., 2010; Gunn, 2000). Con base en esto y aunque solo se encontraron correlaciones con tendencia a la significancia entre los taxones enriquecidos en el grupo con SM y los AB diferenciados, el aumento de estas bacterias podría deberse a que estos taxones (*Bacteroidetes*, *Megamonas*, *Gammaproteobacteria*) son bacterias Gram-negativas y que las características de su envoltura celular les estén brindando una mayor protección contra los efectos bactericidas de los AB. Por el contrario, dentro de los taxones enriquecidos en el grupo control la mayoría a excepción del género *Odoribacter*, el género no identificado perteneciente a la familia *Rikenellaceae* y el género no identificado perteneciente a la familia *Pasteurellaceae* son bacterias Gram-positivas lo que podría estar asociado a una mayor sensibilidad a los AB. Aunque aún no se comprende completamente los mecanismos de resistencia a la bilis se ha

observado que cada vez más bacterias Gram-positivas desarrollan mecanismos de resistencia a la bilis por lo que resultaría interesante estudiar si las bacterias que presentaron mayor abundancia están asociadas con la presencia de genes específicos involucrados en la resistencia a la bilis, tal es el caso de genes *acr* y *emr* los cuales son genes de bombas de eflujo o el gen *OmpF* asociado a porinas.

En contraste el aumento de los AB en el grupo con SM resultó estar asociado a la disminución de la diversidad bacteriana intestinal (Figura 23), esto podría deberse a las características antimicrobianas de los AB. De acuerdo con *Schubert et al* se han reportado 3 diferentes mecanismos que explican cómo los AB ejercen un efecto citotóxico en las bacterias intestinales. Como primer mecanismo se encuentra la alteración de las membranas celulares bacterianas debido a sus propiedades hidrofóbicas, en segundo lugar se propone que altas concentraciones de sales biliares dentro de la célula bacteriana provocan una acidificación interna y por último la obtención de taurina por la desconjugación de los AB, conlleva a la producción de H<sub>2</sub>S (*Schubert et al.*, 2017; *Ridlon, Wolf, et al.*, 2016). En el caso particular de este estudio una menor diversidad bacteriana intestinal en los niños con SM, podría justificarse con el hecho de que la mayoría de los taxones disminuidos eran bacterias Gram-positivas las cuales se ha observado tienen una mayor sensibilidad a la bilis y además las cuales en su mayoría están representadas por phylum *Firmicutes* el cual es uno de los phylum dominantes y con mayor diversidad (*Rinninella et al.*, 2019) de especies en el intestino y es el taxón que mostró una menor abundancia en los niños con SM.

Llama la atención que, de los resultados encontrados, el ADC fue el que presentó mayor grado de correlación y significancia con respecto al género no identificado perteneciente al orden *Clostridiales* (Figura 24). Esto podría deberse a sus características hidrofóbicas las cuales pueden causar una mayor citotoxicidad comparado con los diferentes tipos de AB. Por otro lado, aunque la asociación entre el taxón *Bacteroidetes* y el ADC ( $\rho=0.188$ ,  $p=0.072$ ) no alcanzó significancia, en un estudio realizado por *Xu et al.*, se observó que la suplementación con ADC incrementó el phylum *Bacteroidetes*, que dentro de nuestro estudio es el principal taxón aumentado en niños con SM (*Xu, Cen, et al.*, 2021).

Es importante mencionar que contrario a nuestros resultados la clase *Clostridiales* se ha correlacionado positivamente con el ADC. Particularmente algunas especies del género *Clostridium* como *C. scindens*, *C. hiranonis*, *C. hylemonae* presentan el operón *bai* (inducible por ácidos biliares) responsable de la producción de este AB (*Ridlon et al.*, 2014). Sin embargo, nuevos estudios han emergido, donde se plantea que la presencia de este operón no está

limitada a especies del género *Clostridium*. Tal es el caso del estudio realizado *in vitro* por Lucas et al. en donde sugieren que las especies *Bacteroides vulgatus*, *Bifidobacterium adolescentis* y *Roseburia intestinalis* presentaban genes asociados al operón *bai* debido a que estos taxones eran capaces de realizar la 7 $\alpha$ -deshidroxilación tanto del AC como del AQDC (Lucas et al., 2021). Por lo anterior, sería interesante realizar un análisis de secuenciación de genomas completos (Sinha et al., 2020), para identificar si las bacterias diferenciadas contienen el operón *bai* ya que este análisis nos permitiría comprender con mayor detalle la relación entre los taxones enriquecidos en el grupo con SM y el ADC, principal AB diferenciado.

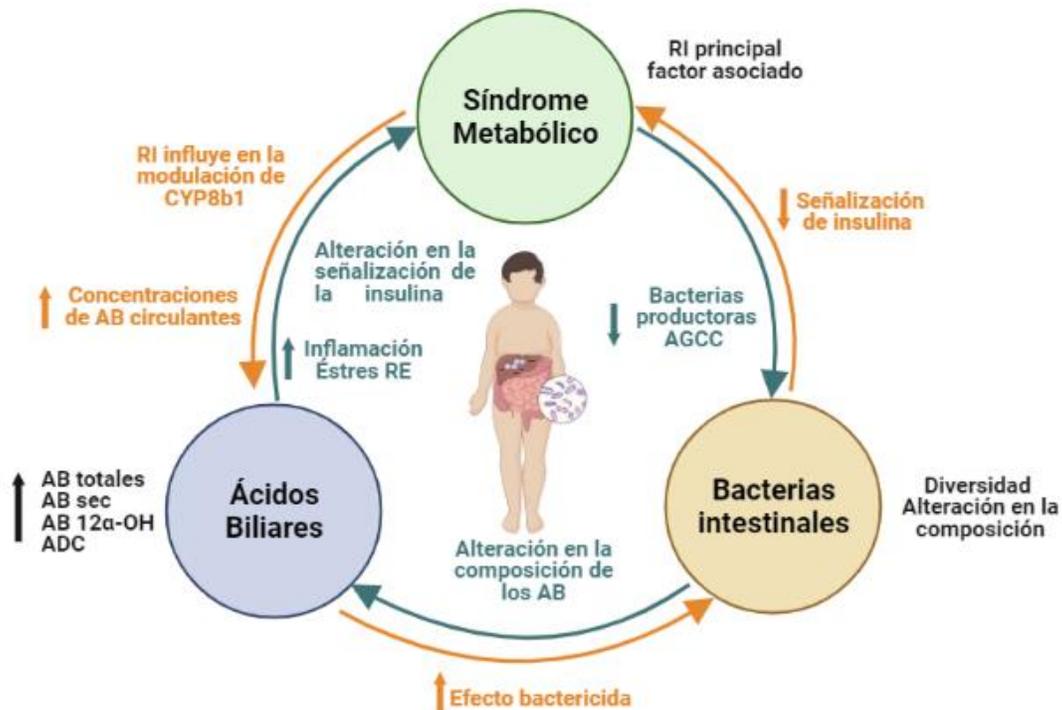
Aunque debido a la naturaleza transversal de nuestro estudio es difícil establecer los factores causales implicados en la alteración de la composición bacteriana intestinal y en el perfil de los AB en los niños con SM, sugerimos que la relación entre los AB y las bacterias intestinales podría estar funcionando de forma bidireccional.

## Conclusiones

Los resultados del presente estudio mostraron que la presencia del SM en población infantil mexicana está asociada con alteraciones en el perfil de los AB y la composición bacteriana intestinal. Se encontró que la RI es un importante factor asociado al SM infantil, que influye en el aumento de los AB 12 $\alpha$ -OH y el ADC y estos a su vez podrían contribuir a la fisiopatología de la enfermedad. Además, la presencia de SM puede condicionar a una disbiosis caracterizada por una menor diversidad bacteriana y una alteración de la composición bacteriana, que en particular podría estar ligada con la RI y con algunas de las alteraciones observadas en los niveles de AB, los cuales podrían estar recíprocamente involucrados en la modulación de la composición bacteriana intestinal.

Aunque se desconoce el mecanismo y debido a la naturaleza transversal del estudio es difícil establecer la causalidad, es posible que exista una relación bidireccional entre estos tres ejes AB-bacterias intestinales-SM, en resumen y de acuerdo con los resultados obtenidos, se podrían describir de la siguiente manera; se observó que la presencia del SM está asociada con alteraciones en la composición bacteriana intestinal y el perfil de AB, además, los cambios en la composición de los AB a su vez podrían estar exacerbando la RI, por otro lado, en el caso de este estudio, la relación entre los AB y las bacterias intestinales pareciera estar modulada por los cambios en la composición de los AB, debido a que el estudio a nivel taxonómico de las bacterias intestinales no nos permite concluir detalladamente si las bacterias intestinales están modulando los AB y los factores asociados con el SM (Figura 25).

Finalmente, hasta donde tenemos conocimiento este estudio es el primero realizado en población infantil mexicana enfocado en el estudio de la relación de los AB, las bacterias intestinales y el SM, de tal forma que contribuye como referencia para posibles investigaciones futuras orientadas en la comprensión de la fisiopatología para la prevención y desarrollo de posibles tratamientos de este padecimiento.



**Figura 25. Eje SM-Bacterias intestinales-AB.** Creado en BioRender

### Perspectivas

Con base en los hallazgos del presente trabajo se propone como perspectiva el análisis a nivel metagenómico, que nos permitiría reconstruir los genomas microbianos y buscar por homología con genes previamente identificados del operón *bai* si se encuentra en las bacterias diferenciadas. De igual forma resultaría interesante un estudio enfocado en la detección de los genes bacterianos asociados a la síntesis de butirato, como el butiril-CoA: acetato CoA-transferasa (*but*) y butirato quinasa (*buk*) o la medición de los AGCC para analizar como estas bacterias diferenciadas están asociadas con la producción de estos metabolitos y el SM.

Por último, como perspectivas finales, este estudio sirve como referencia en futuras investigaciones centradas en tratamientos terapéuticos asociados al SM, por ejemplo, la suplementación con agonistas de FXR, podría servir como un futuro tratamiento terapéutico debido a que se ha observado que la activación de FXR reduce la expresión de CYP8b1, conduciendo a una menor producción de los AB 12α-OH, de igual forma la activación de FXR se ha visto involucrada con la disminución en las concentraciones del ADC (Xu, Shen, et al.,

2021; McGlone & Bloom, 2019). La disminución de estos AB podría contribuir con la mejora de la sensibilidad a la insulina y reducir su efecto citotóxico, lo que podría favorecer a la restauración de la composición bacteriana intestinal. Adicionalmente, el empleo de trasplante de microbiota fecal contribuiría con estos efectos beneficiosos, ya que estudios recientes han observado que tanto en ratones como adultos con SM presentaron una mejora de la sensibilidad a la insulina y una mejora del estado microbiano intestinal (Wang et al., 2020; Kootte et al., 2017; de Groot et al., 2020) (Figura 26).

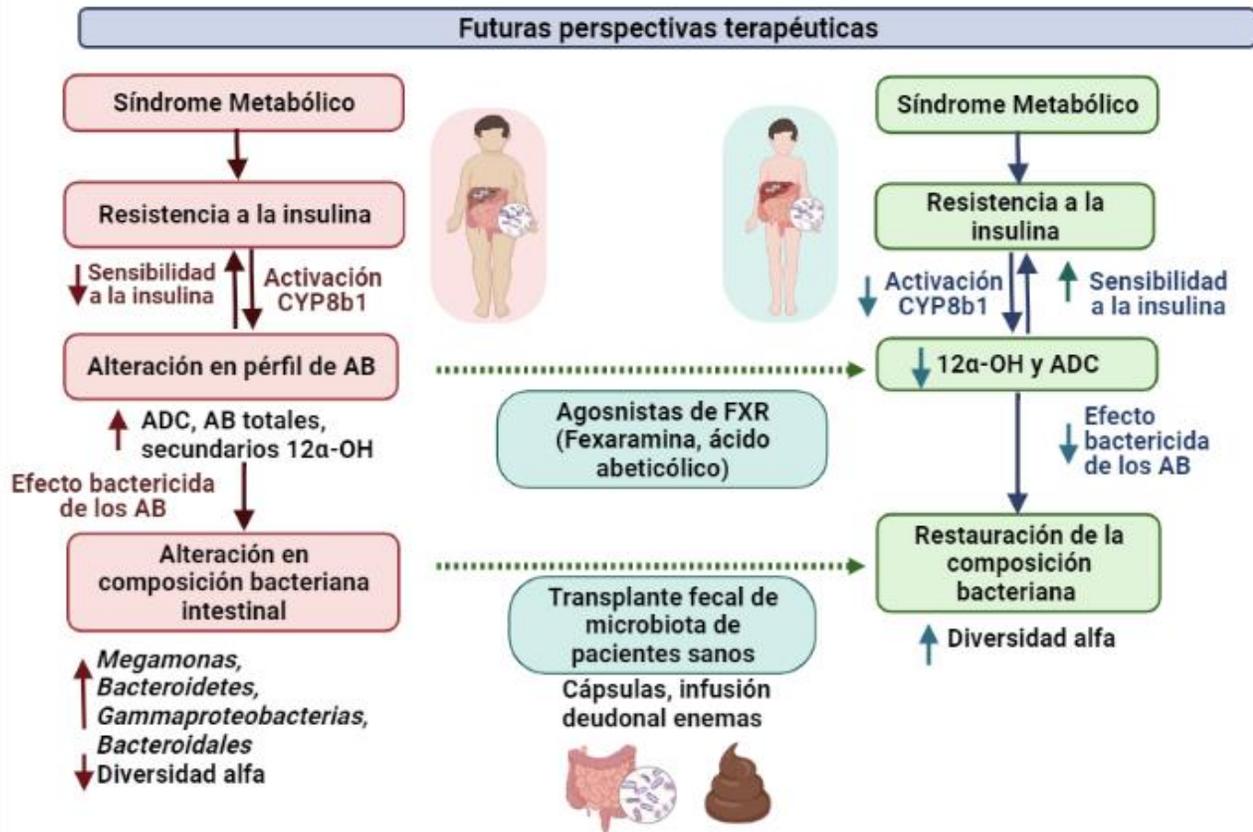


Figura 26. Futuras perspectivas terapéuticas (Creado en BioRender.com).

## Referencias

- (1) Abellan-Schneyder, I., Machado, M. S., Reitmeier, S., Sommer, A., Sewald, Z., Baumbach, J., List, M., & Neuhaus, K. (2021). Primer, Pipelines, Parameters: Issues in 16S rRNA Gene Sequencing. *mSphere*, 6(1), e01202-20. <https://doi.org/10.1128/mSphere.01202-20>
- (2) *Acerca del índice de masa corporal para niños y adolescentes | Peso Saludable | DNPAO | CDC.* (2020, febrero 4). [https://www.cdc.gov/healthyweight/spanish/assessing/bmi/childrens\\_bmi/acerca\\_indice\\_masa\\_corporal\\_ninos\\_adolescentes.html](https://www.cdc.gov/healthyweight/spanish/assessing/bmi/childrens_bmi/acerca_indice_masa_corporal_ninos_adolescentes.html)
- (3) Agus, A., Clément, K., & Sokol, H. (2021). Gut microbiota-derived metabolites as central regulators in metabolic disorders. *Gut*, 70(6), 1174-1182. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-323071>
- (4) Ahmad, T. R., & Haeusler, R. A. (2019). Bile acids in glucose metabolism and insulin signalling—Mechanisms and research needs. *Nature reviews. Endocrinology*, 15(12), 701-712. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0266-7>
- (5) Al-Hamad, D., & Raman, V. (2017). Metabolic syndrome in children and adolescents. *Translational Pediatrics*, 6(4), 397-407. <https://doi.org/10.21037/tp.2017.10.02>
- (6) Angelakis, E., Armougom, F., Million, M., & Raoult, D. (2012). The relationship between gut microbiota and weight gain in humans. *Future Microbiology*, 7(1), 91-109. <https://doi.org/10.2217/fmb.11.142>
- (7) Apprill, A., McNally, S., Parsons, R., & Weber, L. (2015). Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton. *Aquatic Microbial Ecology*, 75(2), 129-137. <https://doi.org/10.3354/ame01753>
- (8) Ávila, A., Gálido, C., Juárez, L., & Osorio, M. L. (2018). Síndrome metabólico en niños de 6 a 12 años con obesidad, en escuelas públicas de siete municipios del Estado de México. *Salud Pública de México*, 60(4), 395-403. <https://doi.org/10.21149/8470>
- (9) Baez-Duarte, B. G., Zamora-Gínez, I., González-Duarte, R., Torres-Rasgado, E., Ruiz-Vivanco, G., Pérez-Fuentes, R., & Celis, T. M. R. G. O. D. (2017). Triglyceride/high-density lipoprotein cholesterol (TG/HDL-C) index as a reference criterion of risk for metabolic syndrome (MetS) and low insulin sensitivity in apparently healthy subjects. *Gaceta Médica De Mexico*, 153(2), 152-158.
- (10) Begley, M., Gahan, C. G. M., & Hill, C. (2005). The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(4), 625-651. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.09.003>

- (11) Boulangé, C. L., Neves, A. L., Chilloux, J., Nicholson, J. K., & Dumas, M.-E. (2016). Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease. *Genome Medicine*, 8(1), 42. <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0303-2>
- (12) Burguete-García, A. I., & Valdés-Villalpando, Y. N. (2014). Definiciones para el diagnóstico de síndrome metabólico en población infantil. *Gaceta Médica de México.*, 1(150), 79-87.
- (13) Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., Fierer, N., Peña, A. G., Goodrich, J. K., Gordon, J. I., Huttley, G. A., Kelley, S. T., Knights, D., Koenig, J. E., Ley, R. E., Lozupone, C. A., McDonald, D., Muegge, B. D., Pirrung, M., ... Knight, R. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods*, 7(5), 335-336. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>
- (14) Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., Fierer, N., & Knight, R. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(Supplement 1), 4516-4522. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000080107>
- (15) Casadesús, J., Hernández, S. B., Cota, I., & Ramos-Morales, F. (2010). Of Bacteria and Bile. En *The Lure of Bacterial Genetics* (pp. 153-162). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1128/9781555816810.ch16>
- (16) Castillo, E. H., Borges, G., Talavera, J. O., Orozco, R., Vargas-Alemán, C., Huitrón-Bravo, G., Diaz-Montiel, J. C., Castañón, S., & Salmerón, J. (2007). Body Mass Index and the Prevalence of Metabolic Syndrome among Children and Adolescents in Two Mexican Populations. *Journal of Adolescent Health*, 40(6), 521-526. <https://doi.org/10.1016/j.jadohealth.2006.12.015>
- (17) Cena, H., & Calder, P. C. (2020). Defining a Healthy Diet: Evidence for the Role of Contemporary Dietary Patterns in Health and Disease. *Nutrients*, 12(2), 334. <https://doi.org/10.3390/nu12020334>
- (18) Chávez-Talavera, O., Tailleux, A., Lefebvre, P., & Staels, B. (2017). Bile Acid Control of Metabolism and Inflammation in Obesity, Type 2 Diabetes, Dyslipidemia, and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*, 152(7), 1679-1694.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.01.055>
- (19) Chen, M. L., Takeda, K., & Sundrud, M. S. (2019). Emerging roles of bile acids in mucosal immunity and inflammation. *Mucosal Immunology*, 12(4), 851-861. <https://doi.org/10.1038/s41385-019-0162-4>

- (20) Chen, X., Sun, H., Jiang, F., Shen, Y., Li, X., Hu, X., Shen, X., & Wei, P. (2020). Alteration of the gut microbiota associated with childhood obesity by 16S rRNA gene sequencing. *PeerJ*, 8, e8317. <https://doi.org/10.7717/peerj.8317>
- (21) Chen, Z., Radjabzadeh, D., Chen, L., Kurilshikov, A., Kavousi, M., Ahmadizar, F., Ikram, M. A., Uitterlinden, A. G., Zhernakova, A., Fu, J., Kraaij, R., & Voortman, T. (2021). Association of Insulin Resistance and Type 2 Diabetes With Gut Microbial Diversity: A Microbiome-Wide Analysis From Population Studies. *JAMA Network Open*, 4(7), e2118811. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2021.18811>
- (22) Claudel, T., Sturm, E., Duez, H., Torra, I. P., Sirvent, A., Kosykh, V., Fruchart, J.-C., Dallongeville, J., Hum, D. W., Kuipers, F., & Staels, B. (2002). Bile acid-activated nuclear receptor FXR suppresses apolipoprotein A-I transcription via a negative FXR response element. *The Journal of Clinical Investigation*, 109(7), 961-971. <https://doi.org/10.1172/JCI14505>
- (23) Coppola, S., Avagliano, C., Calignano, A., & Berni Canani, R. (2021). The Protective Role of Butyrate against Obesity and Obesity-Related Diseases. *Molecules*, 26(3), 682. <https://doi.org/10.3390/molecules26030682>
- (24) de Groot, P., Scheithauer, T., Bakker, G. J., Prodan, A., Levin, E., Khan, M. T., Herrema, H., Ackermans, M., Serlie, M. J. M., de Brauw, M., Levels, J. H. M., Sales, A., Gerdes, V. E., Ståhlman, M., Schimmel, A. W. M., Dallinga-Thie, G., Bergman, J. J., Holleman, F., Hoekstra, J. B. L., ... Nieuwdorp, M. (2020). Donor metabolic characteristics drive effects of faecal microbiota transplantation on recipient insulin sensitivity, energy expenditure and intestinal transit time. *Gut*, 69(3), 502-512. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-318320>
- (25) Del Chierico, F., Abbatini, F., Russo, A., Quagliariello, A., Reddel, S., Capoccia, D., Caccamo, R., Ginanni Corradini, S., Nobili, V., De Peppo, F., Dallapiccola, B., Leonetti, F., Silecchia, G., & Putignani, L. (2018). Gut Microbiota Markers in Obese Adolescent and Adult Patients: Age-Dependent Differential Patterns. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1210. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01210>
- (26) Del Chierico, F., Manco, M., Gardini, S., Guarrasi, V., Russo, A., Bianchi, M., Tortosa, V., Quagliariello, A., Shashaj, B., Fintini, D., & Putignani, L. (2021). Fecal microbiota signatures of insulin resistance, inflammation, and metabolic syndrome in youth with obesity: A pilot study. *Acta Diabetologica*, 58(8), 1009-1022. <https://doi.org/10.1007/s00592-020-01669-4>

- (27) Devkota, S., Wang, Y., Musch, M. W., Leone, V., Fehlner-Peach, H., Nadimpalli, A., Antonopoulos, D. A., Jabri, B., & Chang, E. B. (2012). Dietary-fat-induced taurocholic acid promotes pathobiont expansion and colitis in *Il10*  $-/-$  mice. *Nature*, *487*(7405), 104-108. <https://doi.org/10.1038/nature11225>
- (28) Di Ciaula, A., Garruti, G., Lunardi Baccetto, R., Molina-Molina, E., Bonfrate, L., Wang, D. Q.-H., & Portincasa, P. (2017). Bile Acid Physiology. *Annals of Hepatology*, *16*, S4-S14. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0010.5493>
- (29) Edgar, R. C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, *26*(19), 2460-2461. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461>
- (30) Esteban Aceves Fonseca, Andrea Ángeles Pérez, & Felipe Jiménez Rodríguez. (2019). Desentrañando el síndrome metabólico. *Centro de Ciencias de la Complejidad*, No. 3 5/2019.
- (31) Fan, Y., & Pedersen, O. (2021). Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nature Reviews Microbiology*, *19*(1), 55-71. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0433-9>
- (32) Festi, D., Schiumerini, R., Eusebi, L. H., Marasco, G., Taddia, M., & Colecchia, A. (2014). Gut microbiota and metabolic syndrome. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, *20*(43), 16079-16094. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i43.16079>
- (33) Flynn, J. T., Kaelber, D. C., Baker-Smith, C. M., Blowey, D., Carroll, A. E., Daniels, S. R., Ferranti, S. D. de, Dionne, J. M., Falkner, B., Flinn, S. K., Gidding, S. S., Goodwin, C., Leu, M. G., Powers, M. E., Rea, C., Samuels, J., Simasek, M., Thaker, V. V., Urbina, E. M., & Children, S. on S. and M. of H. B. P. I. (2017). Clinical Practice Guideline for Screening and Management of High Blood Pressure in Children and Adolescents. *Pediatrics*, *140*(3). <https://doi.org/10.1542/peds.2017-1904>
- (34) Ghadge, A. A., & Khaire, A. A. (2019). Leptin as a predictive marker for metabolic syndrome. *Cytokine*, *121*, 154735. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.154735>
- (35) Gunn, J. S. (2000). Mechanisms of bacterial resistance and response to bile. *Microbes and Infection*, *2*(8), 907-913. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)00392-0](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)00392-0)
- (36) Gutiérrez-Rodelo, C., Roura-Guiberna, A., & Olivares-Reyes, J. A. (2017). Mecanismos Moleculares de la Resistencia a la Insulina: Una Actualización. *Gac Med Mex*, *153*, 214-228.
- (37) Gutiérrez-Solis, A. L., Datta Banik, S., & Méndez-González, R. M. (2018). Prevalence of Metabolic Syndrome in Mexico: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*, *16*(8). <https://doi.org/10.1089/met.2017.0157>

- (38) Haeusler, R. A., Astiarraga, B., Camastra, S., Accili, D., & Ferrannini, E. (2013). Human Insulin Resistance Is Associated With Increased Plasma Levels of 12 $\alpha$ -Hydroxylated Bile Acids. *Diabetes*, 62(12), 4184-4191. <https://doi.org/10.2337/db13-0639>
- (39) Haeusler, R. A., Pratt-Hyatt, M., Welch, C. L., Klaassen, C. D., & Accili, D. (2012). Impaired Generation of 12-Hydroxylated Bile Acids Links Hepatic Insulin Signaling with Dyslipidemia. *Cell Metabolism*, 15(1), 65-74. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.11.010>
- (40) Hannon, T. S., Bacha, F., Lee, S. J., Janosky, J., & Arslanian, S. A. (2006). Use of markers of dyslipidemia to identify overweight youth with insulin resistance. *Pediatric Diabetes*, 7(5), 260-266. <https://doi.org/10.1111/j.1399-5448.2006.00199.x>
- (41) Higgins, V., Asgari, S., Hamilton, J. K., Wolska, A., Remaley, A. T., Hartmann, B., Holst, J. J., & Adeli, K. (2019). Postprandial Dyslipidemia, Hyperinsulinemia, and Impaired Gut Peptides/Bile Acids in Adolescents with Obesity. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 105(4), 1228-1241. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgz261>
- (42) Hollister, E. B., Riehle, K., Luna, R. A., Weidler, E. M., Rubio-Gonzales, M., Mistretta, T.-A., Raza, S., Doddapaneni, H. V., Metcalf, G. A., Muzny, D. M., Gibbs, R. A., Petrosino, J. F., Shulman, R. J., & Versalovic, J. (2015). Structure and function of the healthy pre-adolescent pediatric gut microbiome. *Microbiome*, 3(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0101-x>
- (43) Huang, P. L. (2009). A comprehensive definition for metabolic syndrome. *Disease Models & Mechanisms*, 2(5-6), 231-237. <https://doi.org/10.1242/dmm.001180>
- (44) Huttenhower, C., Gevers, D., Knight, R., Abubucker, S., Badger, J. H., Chinwalla, A. T., Creasy, H. H., Earl, A. M., FitzGerald, M. G., Fulton, R. S., Giglio, M. G., Hallsworth-Pepin, K., Lobos, E. A., Madupu, R., Magrini, V., Martin, J. C., Mitreva, M., Muzny, D. M., Sodergren, E. J., ... The Human Microbiome Project Consortium. (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486(7402), 207-214. <https://doi.org/10.1038/nature11234>
- (45) Illumina. (s. f.). *Quality Scores for Next-Generation Sequencing* [Technical Note: Sequencing]. Recuperado 13 de octubre de 2021, de <https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/plan-experiments/quality-scores.html>
- (46) Jahnel, J., Zöhrer, E., Scharnagl, H., Erwa, W., Fauler, G., & Stojakovic, T. (2015). Reference ranges of serum bile acids in children and adolescents. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 53(11), 1807-1813. <https://doi.org/10.1515/cclm-2014-1273>

- (47) Just, S., Mondot, S., Ecker, J., Wegner, K., Rath, E., Gau, L., Streidl, T., Hery-Arnaud, G., Schmidt, S., Lesker, T. R., Bieth, V., Dunkel, A., Strowig, T., Hofmann, T., Haller, D., Liebisch, G., Gérard, P., Rohn, S., Lepage, P., & Clavel, T. (2018). The gut microbiota drives the impact of bile acids and fat source in diet on mouse metabolism. *Microbiome*, 6(1), 134. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0510-8>
- (48) Kassi, E., Pervanidou, P., Kaltsas, G., & Chrousos, G. (2011). Metabolic syndrome: Definitions and controversies. *BMC Medicine*, 9(1), 48. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-9-48>
- (49) Kim, B.-R., Shin, J., Guevarra, R. B., Lee, J. H., Kim, D. W., Seol, K.-H., Lee, J.-H., & Isaacson, H. B. K. and R. E. (2017). *Deciphering Diversity Indices for a Better Understanding of Microbial Communities*. 27(12), 2089-2093. <https://doi.org/10.4014/jmb.1709.09027>
- (50) Kootte, R. S., Levin, E., Salojärvi, J., Smits, L. P., Hartstra, A. V., Udayappan, S. D., Hermes, G., Bouter, K. E., Koopen, A. M., Holst, J. J., Knop, F. K., Blaak, E. E., Zhao, J., Smidt, H., Harms, A. C., Hankemeijer, T., Bergman, J. J. G. H. M., Romijn, H. A., Schaap, F. G., ... Nieuwdorp, M. (2017). Improvement of Insulin Sensitivity after Lean Donor Feces in Metabolic Syndrome Is Driven by Baseline Intestinal Microbiota Composition. *Cell Metabolism*, 26(4), 611-619.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.09.008>
- (51) Kriss, M., Hazleton, K. Z., Nusbacher, N. M., Martin, C. G., & Lozupone, C. A. (2018). Low Diversity Gut Microbiota Dysbiosis: Drivers, Functional Implications and Recovery. *Current opinion in microbiology*, 44, 34-40. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.07.003>
- (52) Larsen, N., Vogensen, F. K., Berg, F. W. J. van den, Nielsen, D. S., Andreasen, A. S., Pedersen, B. K., Al-Soud, W. A., Sørensen, S. J., Hansen, L. H., & Jakobsen, M. (2010). Gut Microbiota in Human Adults with Type 2 Diabetes Differs from Non-Diabetic Adults. *PLOS ONE*, 5(2), e9085. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009085>
- (53) Lim, M. Y., You, H. J., Yoon, H. S., Kwon, B., Lee, J. Y., Lee, S., Song, Y.-M., Lee, K., Sung, J., & Ko, G. (2017). The effect of heritability and host genetics on the gut microbiota and metabolic syndrome. *Gut*, 66(6), 1031-1038. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-311326>
- (54) López-Contreras, B. E., Morán-Ramos, S., Villarruel-Vázquez, R., Macías-Kauffer, L., Villamil-Ramírez, H., León-Mimila, P., Vega-Badillo, J., Sánchez-Muñoz, F., Llanos-Moreno, L. E., Canizalez-Román, A., del Río-Navarro, B., Ibarra-González, I., Vela-Amieva, M., Villarreal-Molina, T., Ochoa-Leyva, A., Aguilar-Salinas, C. A., & Canizales-

- Quinteros, S. (2018). Composition of gut microbiota in obese and normal-weight Mexican school-age children and its association with metabolic traits. *Pediatric Obesity*, 13(6), 381-388. <https://doi.org/10.1111/ijpo.12262>
- (55) Lozupone, C. A., Stombaugh, J. I., Gordon, J. I., Jansson, J. K., & Knight, R. (2012). Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*, 489(7415), 220-230. <https://doi.org/10.1038/nature11550>
- (56) Lucas, L. N., Barrett, K., Kerby, R. L., Zhang, Q., Cattaneo, L. E., Stevenson, D., Rey, F. E., & Amador-Noguez, D. (2021). Dominant Bacterial Phyla from the Human Gut Show Widespread Ability To Transform and Conjugate Bile Acids. *MSystems*. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00805-21>
- (57) Martínez Medina, J. N. (2020). *INFLUENCIA DE LA DIETA HABITUAL SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL Y SU RELACIÓN CON LA PRESENCIA DE COMPLICACIONES METABÓLICAS EN NIÑOS ESCOLARES* [Tesis, Universidad Nacional Autónoma de México]. [https://tesiunam.dgb.unam.mx/F/5KRMH2U64T6Q51YDFKFVBH954YPB8TNAD3VIPHCRSAM4MPI7RP-13962?func=find-b&local\\_base=TES01&request=Jennifer+Nazat&find\\_code=WRD&adjacent=N&filter\\_code\\_2=WYR&filter\\_request\\_2=&filter\\_code\\_3=WYR&filter\\_request\\_3=](https://tesiunam.dgb.unam.mx/F/5KRMH2U64T6Q51YDFKFVBH954YPB8TNAD3VIPHCRSAM4MPI7RP-13962?func=find-b&local_base=TES01&request=Jennifer+Nazat&find_code=WRD&adjacent=N&filter_code_2=WYR&filter_request_2=&filter_code_3=WYR&filter_request_3=)
- (58) Maya-Lucas, O., Murugesan, S., Nirmalkar, K., Alcaraz, L. D., Hoyo-Vadillo, C., Pizano-Zárate, M. L., & García-Mena, J. (2019). The gut microbiome of Mexican children affected by obesity. *Anaerobe*, 55, 11-23. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.10.009>
- (59) McCracken, E., Monaghan, M., & Sreenivasan, S. (2018). Pathophysiology of the metabolic syndrome. *Clinics in Dermatology*, 36(1), 14-20. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2017.09.004>
- (60) McGlone, E. R., & Bloom, S. R. (2019). Bile acids and the metabolic syndrome. *Annals of Clinical Biochemistry*, 56(3), 326-337. <https://doi.org/10.1177/0004563218817798>
- (61) Mehta, P. K., & Griendling, K. K. (2007). Angiotensin II cell signaling: Physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 292(1), C82-C97. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00287.2006>
- (62) Montagnana, M., Danese, E., Giontella, A., Bonafini, S., Benati, M., Tagetti, A., Dalbeni, A., Cavarzere, P., Gaudino, R., Pucci, M., Salvagno, G. L., Antoniazzi, F., Lippi, G., Maffei, C., & Fava, C. (2020). Circulating Bile Acids Profiles in Obese Children and

- Adolescents: A Possible Role of Sex, Puberty and Liver Steatosis. *Diagnostics*, 10(11), 977. <https://doi.org/10.3390/diagnostics10110977>
- (63) Morrison, D. J., & Preston, T. (2016). Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes*, 7(3), 189-200. <https://doi.org/10.1080/19490976.2015.1134082>
- (64) Murugesan, S., Ulloa-Martínez, M., Martínez-Rojano, H., Galván-Rodríguez, F. M., Miranda-Brito, C., Romano, M. C., Piña-Escobedo, A., Pizano-Zárate, M. L., Hoyo-Vadillo, C., & García-Mena, J. (2015). Study of the diversity and short-chain fatty acids production by the bacterial community in overweight and obese Mexican children. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 34(7), 1337-1346. <https://doi.org/10.1007/s10096-015-2355-4>
- (65) Naderpoor, N., Mousa, A., Gomez-Arango, L. F., Barrett, H. L., Dekker Nitert, M., & de Courten, B. (2019). Faecal Microbiota Are Related to Insulin Sensitivity and Secretion in Overweight or Obese Adults. *Journal of Clinical Medicine*, 8(4), 452. <https://doi.org/10.3390/jcm8040452>
- (66) Nazir, R., Rehman, S., Nisa, M., & Baba, U. ali. (2019). Chapter 7 - Exploring bacterial diversity: From cell to sequence. En S. A. Bandh, S. Shafi, & N. Shameem (Eds.), *Freshwater Microbiology* (pp. 263-306). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817495-1.00007-4>
- (67) Nirmalkar, K., Murugesan, S., Pizano-Zárate, M. L., Villalobos-Flores, L. E., García-González, C., Morales-Hernández, R. M., Nuñez-Hernández, J. A., Hernández-Quiroz, F., Romero-Figueroa, M. del S., Hernández-Guerrero, C., Hoyo-Vadillo, C., & García-Mena, J. (2018). Gut Microbiota and Endothelial Dysfunction Markers in Obese Mexican Children and Adolescents. *Nutrients*, 10(12), 2009. <https://doi.org/10.3390/nu10122009>
- (68) Olivares Reyes, J. A., & Arellano Plancarte, A. (2008). BASES MOLECULARES DE LAS ACCIONES DE LA INSULINA. *REB* 27(1), 9-18.
- (69) Orsso, C. E., Peng, Y., Deehan, E. C., Tan, Q., Field, C. J., Madsen, K. L., Walter, J., Prado, C. M., Tun, H. M., & Haqq, A. M. (2021). Composition and Functions of the Gut Microbiome in Pediatric Obesity: Relationships with Markers of Insulin Resistance. *Microorganisms*, 9(7), 1490. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071490>
- (70) Park, Y.-W., Zhu, S., Palaniappan, L., Heshka, S., Carnethon, M. R., & Heymsfield, S. B. (2003). The Metabolic Syndrome: Prevalence and Associated Risk Factor Findings in the US Population From the Third National Health and Nutrition Examination Survey,

- 1988-1994. *Archives of Internal Medicine*, 163(4), 427-436.  
<https://doi.org/10.1001/archinte.163.4.427>
- (71) Peña-Espinoza, B. I., Granados-Silvestre, M. de los Á., Sánchez-Pozos, K., Ortiz-López, M. G., & Menjivar, M. (2017). Síndrome metabólico en niños mexicanos: Poca efectividad de las definiciones diagnósticas. *Endocrinología, Diabetes y Nutrición*, 64(7), 369-376. <https://doi.org/10.1016/j.endinu.2017.04.004>
- (72) Peters, B. A., Shapiro, J. A., Church, T. R., Miller, G., Trinh-Shevrin, C., Yuen, E., Friedlander, C., Hayes, R. B., & Ahn, J. (2018). A taxonomic signature of obesity in a large study of American adults. *Scientific Reports*, 8(1), 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28126-1>
- (73) Polansky, O., Sekelova, Z., Faldynova, M., Sebkova, A., Sisak, F., & Rychlik, I. (2016). Important Metabolic Pathways and Biological Processes Expressed by Chicken Cecal Microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(5), 1569-1576. <https://doi.org/10.1128/AEM.03473-15>
- (74) Poustchi, H., George, J., Esmaili, S., Esna-Ashari, F., Ardalan, G., Sepanlou, S. G., & Alavian, S. M. (2011). Gender Differences in Healthy Ranges for Serum Alanine Aminotransferase Levels in Adolescence. *PLOS ONE*, 6(6), e21178. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021178>
- (75) Pradhan, A. D., Manson, J. E., Rifai, N., Buring, J. E., & Ridker, P. M. (2001). C-Reactive Protein, Interleukin 6, and Risk of Developing Type 2 Diabetes Mellitus. *JAMA*, 286(3), 327-334. <https://doi.org/10.1001/jama.286.3.327>
- (76) Ridlon, J. M., Harris, S. C., Bhowmik, S., Kang, D.-J., & Hylemon, P. B. (2016). Consequences of bile salt biotransformations by intestinal bacteria. *Gut Microbes*, 7(1), 22-39. <https://doi.org/10.1080/19490976.2015.1127483>
- (77) Ridlon, J. M., Kang, D. J., Hylemon, P. B., & Bajaj, J. S. (2014). Bile acids and the gut microbiome. *Current Opinion in Gastroenterology*, 30(3), 332-338. <https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000057>
- (78) Ridlon, J. M., Kang, D.-J., & Hylemon, P. B. (2006). Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *Journal of Lipid Research*, 47(2), 241-259. <https://doi.org/10.1194/jlr.R500013-JLR200>
- (79) Ridlon, J. M., Wolf, P. G., & Gaskins, H. R. (2016). Taurocholic acid metabolism by gut microbes and colon cancer. *Gut Microbes*, 7(3), 201-215. <https://doi.org/10.1080/19490976.2016.1150414>

- (80) Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Miggianno, G. A. D., Gasbarrini, A., & Mele, M. C. (2019). What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms*, 7(1), 14. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7010014>
- (81) Rochlani, Y., Pothineni, N. V., Kovelamudi, S., & Mehta, J. L. (2017). Metabolic syndrome: Pathophysiology, management, and modulation by natural compounds: *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease*. <https://doi.org/10.1177/1753944717711379>
- (82) Romero-Velarde, E., Aguirre-Salas, L. M., Álvarez-Román, Y. A., Vásquez-Garibay, E. M., Casillas-Toral, E., & Fonseca-Reyes, S. (2016). [Prevalence of metabolic syndrome and associated factors in children and adolescents with obesity]. *Revista Médica Del Instituto Mexicano Del Seguro Social*, 54(5), 568-575.
- (83) Saad, M. J. A., Santos, A., & Prada, P. O. (2016). Linking Gut Microbiota and Inflammation to Obesity and Insulin Resistance. *Physiology*, 31(4), 283-293. <https://doi.org/10.1152/physiol.00041.2015>
- (84) Santos-Marcos, J. A., Perez-Jimenez, F., & Camargo, A. (2019). The role of diet and intestinal microbiota in the development of metabolic syndrome. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 70, 1-27. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.03.017>
- (85) Šarenac, T. M., & Mikov, M. (2018). Bile Acid Synthesis: From Nature to the Chemical Modification and Synthesis and Their Applications as Drugs and Nutrients. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 939. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00939>
- (86) Savage, D. B., Petersen, K. F., & Shulman, G. I. (2007). Disordered Lipid Metabolism and the Pathogenesis of Insulin Resistance. *Physiological Reviews*, 87(2), 507-520. <https://doi.org/10.1152/physrev.00024.2006>
- (87) Schoeler, M., & Caesar, R. (2019). Dietary lipids, gut microbiota and lipid metabolism. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 20(4), 461-472. <https://doi.org/10.1007/s11154-019-09512-0>
- (88) Schubert, K., Olde Damink, S. W. M., von Bergen, M., & Schaap, F. G. (2017). Interactions between bile salts, gut microbiota, and hepatic innate immunity. *Immunological Reviews*, 279(1), 23-35. <https://doi.org/10.1111/imr.12579>
- (89) Schwartz, A., Taras, D., Schäfer, K., Beijer, S., Bos, N. A., Donus, C., & Hardt, P. D. (2010). Microbiota and SCFA in Lean and Overweight Healthy Subjects. *Obesity*, 18(1), 190-195. <https://doi.org/10.1038/oby.2009.167>

- (90) Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W. S., & Huttenhower, C. (2011). Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biology*, 12(6), R60. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-6-r60>
- (91) Semenkovich, C. F. (2006). Insulin resistance and atherosclerosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(7), 1813-1822. <https://doi.org/10.1172/JCI29024>
- (92) Shapiro, H., Kolodziejczyk, A. A., Halstuch, D., & Elinav, E. (2018). Bile acids in glucose metabolism in health and disease. *Journal of Experimental Medicine*, 215(2), 383-396. <https://doi.org/10.1084/jem.20171965>
- (93) Sinha, S. R., Haileselassie, Y., Nguyen, L. P., Tropini, C., Wang, M., Becker, L. S., Sim, D., Jarr, K., Spear, E. T., Singh, G., Namkoong, H., Bittinger, K., Fischbach, M. A., Sonnenburg, J. L., & Habtezion, A. (2020). Dysbiosis-Induced Secondary Bile Acid Deficiency Promotes Intestinal Inflammation. *Cell Host & Microbe*, 27(4), 659-670.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.01.021>
- (94) Sommer, F., Anderson, J. M., Bharti, R., Raes, J., & Rosenstiel, P. (2017). The resilience of the intestinal microbiota influences health and disease. *Nature Reviews Microbiology*, 15(10), 630-638. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.58>
- (95) Staels, B., & Prawitt, J. (2013). Soaping Up Type 2 Diabetes With Bile Acids?: The Link Between Glucose and Bile Acid Metabolism in Humans Tightens: Quality Matters! *Diabetes*, 62(12), 3987-3989. <https://doi.org/10.2337/db13-1278>
- (96) Tamanai-Shacoori, Z., Smida, I., Bousarghin, L., Loreal, O., Meuric, V., Fong, S. B., Bonnaure-Mallet, M., & Jolivet-Gougeon, A. (2017). Roseburia spp.: A marker of health? *Future Microbiology*, 12(2), 157-170. <https://doi.org/10.2217/fmb-2016-0130>
- (97) Thursby, E., & Juge, N. (2017). Introduction to the human gut microbiota. *Biochemical Journal*, 474(11), 1823-1836. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160510>
- (98) Tsuei, J., Chau, T., Mills, D., & Wan, Y.-J. Y. (2014). Bile acid dysregulation, gut dysbiosis, and gastrointestinal cancer. *Experimental Biology and Medicine*, 239(11), 1489-1504. <https://doi.org/10.1177/1535370214538743>
- (99) van Best, N., Rolle-Kampczyk, U., Schaap, F. G., Basic, M., Olde Damink, S. W. M., Bleich, A., Savelkoul, P. H. M., von Bergen, M., Penders, J., & Hornef, M. W. (2020). Bile acids drive the newborn's gut microbiota maturation. *Nature Communications*, 11(1), 3692. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17183-8>
- (100) van Faassen, A., Ochsenkühn, T., Houterman, S., van der Ploeg, E. M. C., Bueno-de-Mesquita, B. H., Ocké, M. C., Bayerdörffer, E., & Janknegt, R. A. (1997). Plasma

deoxycholic acid is related to deoxycholic acid in faecal water. *Cancer Letters*, 114(1), 293-294. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(97\)04683-1](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(97)04683-1)

- (101) Vaněčková, I., Maletínská, L., Behuliak, M., Nagelová, V., Zicha, J., & Kuneš, J. (2014). Obesity-related hypertension: Possible pathophysiological mechanisms. *Journal of Endocrinology*, 223(3), R63-R78. <https://doi.org/10.1530/JOE-14-0368>
- (102) Vazquez-Moreno, M., Perez-Herrera, A., Locia-Morales, D., Dizzel, S., Meyre, D., Stearns, J. C., & Cruz, M. (2021). Association of gut microbiome with fasting triglycerides, fasting insulin and obesity status in Mexican children. *Pediatric Obesity*, 16(5), e12748. <https://doi.org/10.1111/ijpo.12748>
- (103) Vital, M., Penton, C. R., Wang, Q., Young, V. B., Antonopoulos, D. A., Sogin, M. L., Morrison, H. G., Raffals, L., Chang, E. B., Huffnagle, G. B., Schmidt, T. M., Cole, J. R., & Tiedje, J. M. (2013). A gene-targeted approach to investigate the intestinal butyrate-producing bacterial community. *Microbiome*, 1(1), 8. <https://doi.org/10.1186/2049-2618-1-8>
- (104) Wahlström, A., Sayin, S. I., Marschall, H.-U., & Bäckhed, F. (2016). Intestinal Crosstalk between Bile Acids and Microbiota and Its Impact on Host Metabolism. *Cell Metabolism*, 24(1), 41-50. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.05.005>
- (105) Wang, H., Lu, Y., Yan, Y., Tian, S., Zheng, D., Leng, D., Wang, C., Jiao, J., Wang, Z., & Bai, Y. (2020). Promising Treatment for Type 2 Diabetes: Fecal Microbiota Transplantation Reverses Insulin Resistance and Impaired Islets. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2019.00455>
- (106) Wang, P.-X., Deng, X.-R., Zhang, C.-H., & Yuan, H.-J. (2020). Gut microbiota and metabolic syndrome. *Chinese Medical Journal*, 133(7), 808–816. <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000000696>
- (107) Weiss, R., Bremer, A. A., & Lustig, R. H. (2013). What is metabolic syndrome, and why are children getting it? *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1281(1), 123-140. <https://doi.org/10.1111/nyas.12030>
- (108) Winston, J. A., & Theriot, C. M. (2019). Diversification of host bile acids by members of the gut microbiota. *Gut Microbes*, 11(2), 158-171. <https://doi.org/10.1080/19490976.2019.1674124>
- (109) Wisse, B. E. (2004). The Inflammatory Syndrome: The Role of Adipose Tissue Cytokines in Metabolic Disorders Linked to Obesity. *Journal of the American Society of Nephrology*, 15(11), 2792-2800. <https://doi.org/10.1097/01.ASN.0000141966.69934.21>

- (110) Wittcopp, C., & Conroy, R. (2016). Metabolic Syndrome in Children and Adolescents. *American Academy of Pediatrics*, 37(5). <https://doi.org/10.1542/pir.2014-0095>
- (111) Xu, M., Cen, M., Shen, Y., Zhu, Y., Cheng, F., Tang, L., Hu, W., & Dai, N. (2021). Deoxycholic Acid-Induced Gut Dysbiosis Disrupts Bile Acid Enterohepatic Circulation and Promotes Intestinal Inflammation. *Digestive Diseases and Sciences*, 66(2), 568-576. <https://doi.org/10.1007/s10620-020-06208-3>
- (112) Xu, M., Shen, Y., Cen, M., Zhu, Y., Cheng, F., Tang, L., Zheng, X., Kim, J. J., Dai, N., & Hu, W. (2021). Modulation of the Gut Microbiota-farnesoid X Receptor Axis Improves Deoxycholic Acid-induced Intestinal Inflammation in Mice. *Journal of Crohn's and Colitis*, 15(7), 1197-1210. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjab003>
- (113) Yamashita, M., Okubo, H., Kobuke, K., Ohno, H., Oki, K., Yoneda, M., Tanaka, J., & Hattori, N. (2019). Alteration of gut microbiota by a Westernized lifestyle and its correlation with insulin resistance in non-diabetic Japanese men. *Journal of Diabetes Investigation*, 10(6), 1463-1470. <https://doi.org/10.1111/jdi.13048>
- (114) Yokota, A., Fukiya, S., Islam, K. B. M. S., Ooka, T., Ogura, Y., Hayashi, T., Hagio, M., & Ishizuka, S. (2012). Is bile acid a determinant of the gut microbiota on a high-fat diet? *Gut Microbes*, 3(5), 455-459. <https://doi.org/10.4161/gmic.21216>
- (115) Yoshitsugu, R., Kikuchi, K., Hori, S., Iwaya, H., Hagio, M., Shimizu, H., Hira, T., & Ishizuka, S. (2020). Correlation between 12 $\alpha$ -hydroxylated bile acids and insulin secretion during glucose tolerance tests in rats fed a high-fat and high-sucrose diet. *Lipids in Health and Disease*, 19(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s12944-020-1193-2>
- (116) Zaborska, K. E., Lee, S. A., Garribay, D., Cha, E., & Cummings, B. P. (2018). Deoxycholic acid supplementation impairs glucose homeostasis in mice. *PLOS ONE*, 13(7), e0200908. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200908>
- (117) Zhang, Y.-J., Li, S., Gan, R.-Y., Zhou, T., Xu, D.-P., & Li, H.-B. (2015). Impacts of Gut Bacteria on Human Health and Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(4), 7493-7519. <https://doi.org/10.3390/ijms16047493>

## Apéndice (Contenido adicional de trabajo)

### Anexo 1: Influencia del sexo en factores metabólicos y en la composición de los AB

**Tabla 1.** Descriptivos de la población de acuerdo con el sexo

Parámetro	Sexo		Valor de $p$
	Hombre (n = 54)	Mujer (n = 46)	
Características clínicas			
Edad (años) <sup>c</sup>	11.52 (10.60, 12.15)	11.40 (10.68, 12.23)	0.887
Peso <sup>c</sup>	50.50 (43.00, 57.00)	48.00 (37.75, 55.00)	0.226
<b>CC (cm)<sup>b</sup></b>	<b>80.31 (12.411)</b>	<b>74.95 (10.807)</b>	<b>0.025</b>
Percentil IMC <sup>c</sup>	92.40 (80.33, 96.68)	89.05 (58.00, 94.73)	0.077
Percentil de PAS <sup>c</sup>	59.20 (32.68, 79.98)	44.70 (25.10, 69.20)	0.271
Percentil de PAD <sup>c</sup>	80.50 (52.98, 89.90)	76.30 (62.75, 87.90)	0.986
Homeostasis de glucosa			
HOMA-IR <sup>c</sup>	1.79 (1.08, 2.78)	1.87 (1.22, 2.98)	0.507
Glucosa (mg/dl) <sup>c</sup>	90.00 (86.00, 95.50)	88.50 (84.00, 94.00)	0.350
Perfil de lípidos			
TG séricos (mg/dl) <sup>c</sup>	78.50 (59.75, 129.00)	96.00 (65.00, 139.75)	0.169
c-HDL (mg/dl) <sup>c</sup>	43.00 (38.50, 47.25)	45.50 (39.00, 53.00)	0.235
LDL (mg/dl) <sup>b</sup>	98.89 (24.638)	104.88 (23.079)	0.227
Colesterol (mg/dl) <sup>b</sup>	162.70 (28.641)	172.52 (26.264)	0.079
Índice TG/c-HDL	43.67 (24.87, 97.93)	40.01 (22.89, 61.30)	0.633
Enzimas hepáticas			
<b>AST UI/L <sup>c</sup></b>	<b>29.00 (24.75, 33.25)</b>	<b>26.00 (20.75, 31.00)</b>	<b>0.009</b>
<b>ALT UI/L <sup>c</sup></b>	<b>24.50 (17.00, 35.00)</b>	<b>18.00 (15.75, 28.25)</b>	<b>0.021</b>

<sup>a</sup> Análisis de  $\chi^2$  cuadrada para datos categóricos ( $p < 0.05$ ) \*. <sup>b</sup> Medias, método paramétrico (t-Student para muestras independientes), ( $p < 0,05$ ) \*. <sup>c</sup> Medianas, método no paramétrico (U Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ) \*. IMC: índice masa corporal; PAS: presión arterial sistólica; PAD presión arterial diastólica; TG: triglicéridos; HOMA-IR: evaluación del modelo de homeostasis para la resistencia a la insulina; HDL: colesterol de lipoproteínas de alta densidad, LDL:

colesterol de lipoproteínas de baja densidad; AST: aspartato aminotransferasa; ALT: alanina aminotransferasa.

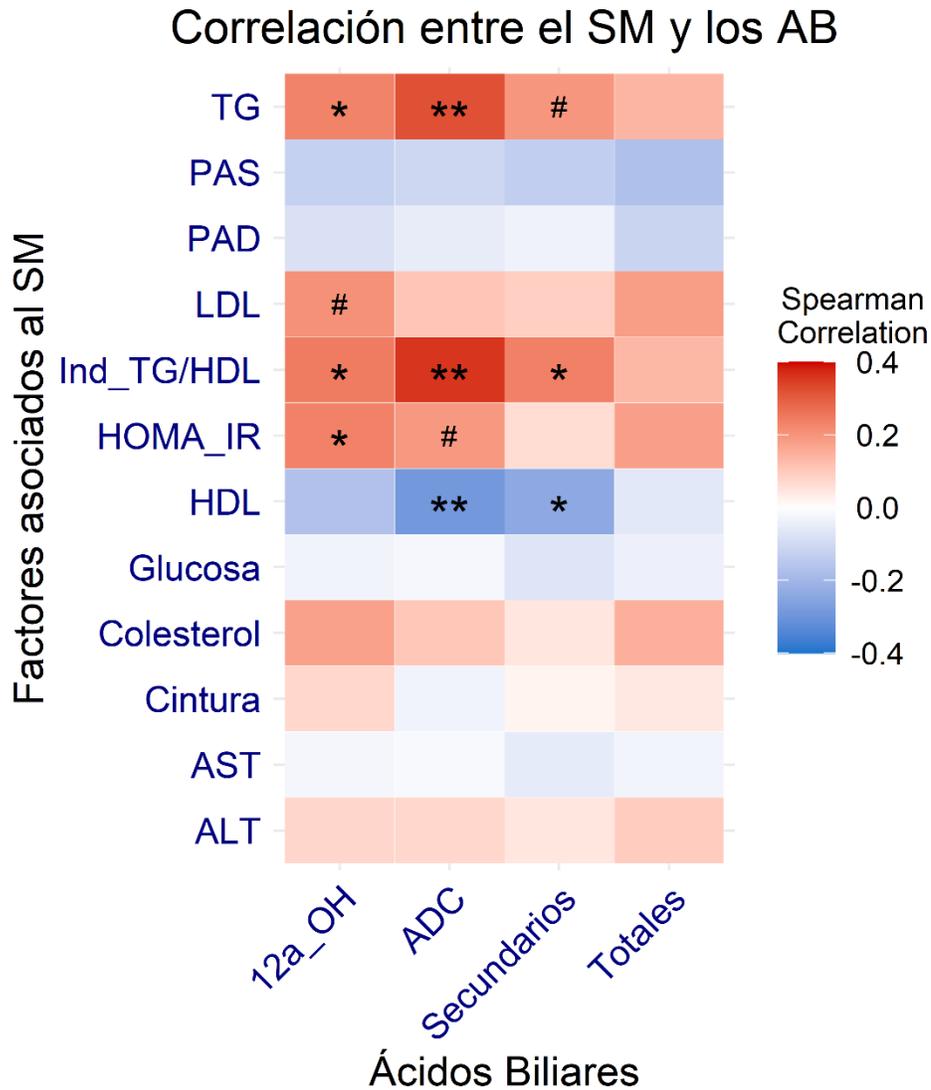
**Tabla 2.** Análisis de AB en relación al sexo

AB	Sexo		Valor de <i>p</i>
	Hombre (n = 54)	Mujer (n = 46)	
AB primarios <sup>°</sup>	20.61 (10.02, 64.20)	17.91 (8.33, 48.36)	0.167
AC <sup>°</sup>	6.33 (3.09, 10.88)	5.26 (2.91, 12.58)	0.735
AQDC <sup>°</sup>	15.78 (6.92, 44.78)	11.80 (5.51, 34.98)	0.326
AB conjugados <sup>°</sup>	89.08 (49.23, 138.90)	68.36 (48.80, 114.09)	0.414
A(T)LC <sup>°</sup>	0.63 (0.27, 1.27)	0.72 (0.23, 1.70)	0.580
A(G)LC <sup>°</sup>	3.09 (1.19, 5.18)	2.59 (1.20, 5.85)	0.923
A(T)DC <sup>°</sup>	0.62 (0.28, 1.29)	0.55 (0.31, 0.88)	0.401
A(G)DC <sup>°</sup>	6.16 (2.72, 17.37)	6.39 (3.47, 10.82)	0.825
A(G)UDC <sup>°</sup>	6.14 (2.31, 13.56)	5.12 (3.14, 10.89)	0.717
A(G)QDC <sup>°</sup>	41.22 (22.94, 84.71)	38.94 (22.73, 52.76)	0.580
A(T)QDC <sup>°</sup>	15.06 (9.81, 34.72)	12.57 (7.93, 18.41)	0.061
<b>A(T)C <sup>°</sup></b>	<b>0.82 (0.56, 1.68)</b>	<b>0.58 (0.42, 0.99)</b>	<b>0.031</b>
A(G)C <sup>°</sup>	1.02 (0.66, 3.06)	0.99 (0.48, 1.69)	0.271
AB secundarios <sup>°</sup>	128.61 (84.86, 177.38)	111.94 (90.25, 178.65)	0.985
ALC <sup>°</sup>	62.67 (49.33, 92.15)	69.26 (51.11, 82.59)	0.683
ADC <sup>°</sup>	23.00 (9.38, 47.66)	18.06 (9.16, 41.16)	0.633
AUDC <sup>°</sup>	22.38 (13.90, 45.34)	21.89 (12.99, 42.99)	0.901
12 $\alpha$ -hidroxilados	2.01(1.31, 3.22)	1.94 (1.32, 3.42)	0.550
AB totales <sup>°</sup>	250.95 (172.74, 350.63)	234.11 (171.29, 325.14)	0.633

<sup>°</sup> La determinación del tipo de distribución se realizó a través de la prueba de Kolmogorov Smirnov. Debido a su no distribución normal ( $p < 0.05$ ) se utilizaron las medianas (percentil 50) como descriptivo estadístico y se utilizó un método no paramétrico (U Mann-Whitney) para observar el valor de significancia ( $p < 0,05$ ) de los datos. AC: Ácido cólico; AQDC: Ácido quenodesoxicólico; A(T)LC: Ácido taurolitocólico; A(G)LC: Ácido glicolitocólico; A(G)QDC: Ácido Glicoquenodesoxicólico; A(T)QDC: Ácido Tauroquenodesoxicólico; A(T)DC: Ácido Taurodesoxicólico; A(G)DC: Ácido Glicodesoxicólico; A(G)UDC: Ácido Glicoursodesoxicólico;

A(T)C :Ácido Taurocólico; A(G)C: Ácido Glicocólico; ALC: Ácido litocólico: ADC: Ácido desoxicólico; AUDC: Ácido ursodesoxicólico.

**Anexo 2: Relación entre los factores metabólicos y los AB**



**Figura 1.** Correlación entre los AB y rasgos metabólicos. <sup>d</sup>Correlación de Spearman ( $p < 0.05$ )\*. <sup>e</sup>Correlación de Pearson ( $p < 0.05$ ), Valores cercanos a la significancia (#). Las correlaciones se ajustaron por sexo, edad y percentil IMC.

**Anexo 3: Relación entre los factores metabólicos y taxones pertenecientes al orden Clostridiales**

**Tabla 3.** Correlación parcial entre los taxones pertenecientes al orden Clostridiales y los factores de riesgo asociados al SM.

<b>Parámetros Metabólicos</b>	<b><i>Faecalibacterium</i></b>			<b><i>Clostridium,</i></b>			<b><i>Phascolarctobacterium</i></b>		
	<i>rho</i>	<i>P</i>	<i>FDR</i>	<i>Rho</i>	<i>P</i>	<i>FDR</i>	<i>Rho</i>	<i>P</i>	<i>FDR</i>
<b>TG séricos</b>	-0.187	0.067	0.186	-0.157	0.124	0.186	-0.082	0.425	0.425
<b>c-HDL</b>	0.233	0.021	0.063	0.157	0.126	0.189	-0.076	0.459	0.459
<b>Glucosa</b>	-0.274	0.007	0.021	-0.002	0.982	0.982	-0.104	0.309	0.46
<b>HOMA-IR</b>	-0.222	0.028	0.084	-0.115	0.263	0.3945	-0.085	0.410	0.41
<b>Índice TG/HDL</b>	-0.225	0.026	0.078	-0.192	0.059	0.088	-0.026	0.796	0.796