UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

IMPACTO DE LOS METABOLITOS RELACIONADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO

Raúl Sánchez Giménez

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI

Impacto de los metabolitos relacionados con el microbioma intestinal y el metabolismo mitocondrial sobre los eventos cardiovasculares tras un síndrome coronario agudo

---

RAÚL SÁNCHEZ GIMÉNEZ

TESIS DOCTORAL
2023

UNIVERSITAT ROVIRA i VIRGILI

DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA

IMPACTO DE LOS METABOLITOS RELACIONADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO

TESIS DOCTORAL

Raúl Sánchez Giménez

DIRECTOR

Dr. Alfredo Bardají Ruíz

Dr. Christopher Papandreou

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

UNIVERSITAT ROVIRA i VIRGILI
DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA

FAIG CONSTAR que aquest treball, titulat " IMPACTO DE LOS METABOLITOS RELACIONADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO.", que presenta RAÚL SÁNCHEZ GIMÉNEZ per a l'obtenció del títol de Doctor, ha estat realitzat sota la meva direcció al Departament MEDICINA I CURURGIA d'aquesta universitat.

TARRAGONA, 25 AGOSTO SE 2023

El/s director/s de la tesi doctoral
El/los director/es de la tesis doctoral
Doctoral Thesis Supervisor/s

Alfredo Bardají Ruiz - DNI 39656310D (TCAT)

Firmado digitalmente por Alfredo Bardají Ruiz - DNI 39656310D (TCAT)
Fecha: 2023.09.18 06:21:03 +02'00'

Firmado por PAPANDREOU CHRISTOFOROS - ****3957* el día 18/09/2023 con un certificado emitido por AC

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

UNIVERSITAT ROVIRA i VIRGILI
IMPACTO DE LOS METABOLITOS RELACIONADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL
Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez
Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

Raúl Sánchez Giménez

IMPACTO DE LOS METABOLITOS RELACIONADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO

UNIVERSITAT ROVIRA i VIRGILI
Departamento de medicina y cirugía

Tarragona, 2023

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

A Minerva, el faro de mi vida.

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento al valioso equipo médico de cardiología, cuyo compromiso y dedicación han sido fundamentales en la realización de esta investigación. Como expresó el cardiólogo español Valentín Fuster, “El corazón es el motor de la vida, cuidémoslo juntos”. Vuestra labor incansable y vuestra pasión por cuidar de los corazones han sido una fuente constante de inspiración en mi camino académico.

A través de las palabras de Severo Ochoa, “La curiosidad, el afán de saber, siempre existen en la mente humana”, reconozco al Dr. Bardají por fomentar mi curiosidad y estimular mi sed de conocimiento. Sin su confianza y diligencia esta tesis doctoral no hubiese sido posible.

En el sendero del conocimiento trazado por mi tesis, mi agradecimiento al Dr. Papandreou, cuya guía y sabiduría han iluminado mi camino. Siguiendo las palabras de Platón, “La educación es el encendido de una llama, no el llenado de un recipiente”, reconozco al Dr. Papandreou por haber encendido en mí la llama del saber y haberme inspirado a explorar con pasión las profundidades del conocimiento.

A mi madre, en este momento de culminación académica, quiero expresar mi agradecimiento. Como dijo la entrañable madre española y autora de renombre, Gloria Fuertes, “Madre solo hay una, y aquí no ha habido otra”. Tu amor incondicional, apoyo constante y ejemplo de fortaleza han sido el cimiento sobre el cual he edificado mis logros.

A mi prometida, quien ha sido mi musa inspiradora en este arduo viaje académico. Así como Minerva, la diosa romana de la sabiduría, guiaba a los sabios en sus empresas, tú has iluminado mi camino con tu apoyo y amor. En cada paso de esta tesis, he sentido tu cariño como una fuerza que me impulsa hacia adelante. Esta investigación no solo lleva

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

mi esfuerzo, sino también el tuyo, pues tu influencia ha enriquecido cada página. Gracias por ser mi fuente constante de inspiración y por compartir este logro conmigo.

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

"Lo importante es no dejar de hacerse preguntas."

- Albert Einstein

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....16

RESUMEN.....18

1. INTRODUCCIÓN.....21

1.1 Enfermedad cardiovascular.....22

1.2 Metabolómica.....24

1.3 Metabolómica en la enfermedad cardiovascular 25

1.4 Metabolitos derivados de la microbiota gastrointestinal.....26

1.4.1 N-óxido de trimetilamina (TMAO).....29

1.4.2 Aminoácidos de cadena ramificada.....34

1.4.3 Ácidos biliares.....35

1.4.4 Derivados de triptófano e indol.....37

1.5 Metabolitos derivados del ciclo del ácido tricarboxílico y de la función mitocondrial.....38

1.5.1 Mutaciones en el ADN mitocondrial.....40

1.5.2 Alteraciones en la mitofagia (autofagia mitocondrial).....41

1.5.3 Aumento de las especias reactivas de oxígeno 42

1.5.4 Alteraciones en el ciclo tricarboxílico y la fosforilación oxidativa..43

1.6 Análisis de los metabolitos 45

1.6.1 Resonancia magnética nuclear espectroscópica.....46

1.6.2 Espectrometría de masas 46

1.7 Intervenciones para la regulación de la microbiota.....48

1.7.1 Modificaciones en la dieta.....49

1.7.2 Trasplante fecal.....49

1.7.3 Probióticos y antibióticos.....50

1.7.4 Inhibidores de la vía TMAO-TMA.....50

1.8 Intervenciones para la regulación de la función mitocondrial.....51

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

1.8.1 Antioxidantes……..51

1.8.2 Terapias antioxidantes dirigidas a las mitocondrias……52

2.HIPÓTESIS……54

2.1 Hipótesis fundamental……55

2.2 Hipótesis secundarias……55

3. OBJETIVOS ……56

3.1 Objetivos principales . ……57

4. MATERIAL Y MÉTODOS……58

4.1 Población y metodología del estudio. ……59

4.1.1 Revisión sistemática……59

4.1.2 Población de estudio……59

4.2 Determinación de los metabolitos implicados en las diferentes vías metabólicas. ……60

4.2.1 Determinación de TMAO, TMA, colina, betaína, dimetilglicina y L-carnitina. ……61

4.2.2 Determinación de citrato, acónito, isocitrato, succinato, malato, fumarato, α-cetoglutarato y d/l-2-hidroxiglutarato. ……62

4.3 Variable de resultado principal y seguimiento. ……63

4.4 Análisis estadístico. ……64

4.4.1 Segundo estudio. ……64

4.4.2 Tercer estudio ……66

4.5 Declaración de Ética. ……68

5. RESULTADOS ……69

5.1 Primer estudio ……70

Gut microbiota-derived metabolites and cardiovascular disease risk: a systematic review of prospective cohort studies.

5.2 Segundo estudio ……93

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

Plasma trimethylamine-N-oxide, its precursors and risk of cardiovascular events in patients with acute coronary syndrome: Mediating effects of renal function

5.3 Tercer estudio ……..103

TCA cycle metabolites associated with adverse outcomes after acute coronary syndrome: mediating effect of renal function

6. DISCUSIÓN. ……..114

7. LIMITACIONES……..121

8. CONCLUSIONES……..123

9. BIBLIOGRAFÍA……..126

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

ABREVIATURAS

AA: aminoácidos.

AB: ácidos biliares.

acLDL: LDL acetilado.

ADNmt: ADN mitocondrial.

BCAA: aminoácidos de cadena ramificada.

BHMT : betaína-homocisteína metiltransferasa.

CD: grupo de diferenciación.

CV: cardiovascular.

DC: células dendríticas.

DHA: ácido docosahexaenoico.

DMA: dimetilamina.

DMB: 1,3 dimetilbutanol.

ECV: enfermedad cardiovascular.

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

EM: espectrometría de masas.

EPA: ácido eicosapentaenoico.

ERC: enfermedad renal crónica.

FA: fibrilación auricular.

FMO3: flavina monooxigenasa hepática 3.

FXR: receptor X farnesoide del receptor hormonal nuclear.

GC/MS espectrometría de masas con cromatografia de gases.

IAM: infarto agudo de miocardio.

IC: insuficiencia cardíaca.

IL: interlecuina.

LC/MS espectrometría de masas con cromatografia líquida.

MACE: eventos cardiovasculares mayores.

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

Mfn1: mitofusina 1.

Mfn2: mitofusina 2.

mitoQ:mitoquinona.

mTOR: receptor de la rapamicina en mamíferos.

NAC: N-acetilcisteína.

Nlrp3 proteína 3 del receptor tipo NOD del inflamasoma.

NOX: NADPH oxidasa.

ox-LDL: lipoproteína de baja densidad oxidada.

OXPHOS : fosforilación oxidativa.

PC: fosfatidilcolina.

RCT: transporte inverso de colesterol.

RMN: resonancia magnética nuclear.

ROS: especies reactivas de oxígeno.

SCA: síndrome coronario agudo.

SCC : síndrome coronario crónico.

SCFA: ácidos grasos de cadena corta.

SOD: superóxido dismutasa.

TCA: ácido tricarboxílico.

TGR5 receptor de ácidos biliares acoplado a proteína G.

TMA: trimetilamina.

TMAO: N-óxido de trimetilamina.

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

RESUMEN

Los pacientes que han presentado un síndrome coronario agudo presentan un riesgo importante de sufrir eventos adversos a largo plazo. Es necesaria la identificación de aquellos con mayor riesgo para implementar medidas de prevención secundaria. El estudio de las alteraciones metabólicas en estos pacientes puede ayudar a aportar información pronóstica relevante durante un seguimiento. Por tanto, el objetivo de esta tesis doctoral fue analizar las alteraciones metabólicas asociadas a la microbiota intestinal y mitocondrial relacionadas con la parición eventos cardiovasculares mayores en el seguimiento en pacientes que ingresan por un síndrome coronario agudo.

La tesis doctoral consta de tres estudios. En el primer estudio se realizó una revisión sistemática de los metabolitos relacionados con el microbioma intestinal y su relación con la enfermedad cardiovascular. En el segundo estudio, realizado en pacientes con síndrome coronario agudo seguidos a largo plazo, se demostró que los sujetos con concentraciones plasmáticas alteradas de los metabolitos derivados de la flora intestinal presentaban un incremento del riesgo de eventos adversos cardiovasculares mayores en el seguimiento. Mismos resultados se obtuvieron en el tercer estudio realizado en la misma cohorte de pacientes, donde se estudió la relación de los metabolitos derivados de la disfunción mitocondrial y los eventos cardiovasculares en el seguimiento. En ambos estudios observacionales se obtuvo una importante mediación de dicho efecto debido al deterioro de la función renal.

Por tanto, la investigación realizada, respalda el estudio del metaboloma y de estas vías metabólicas citadas en la enfermedad cardiovascular. Los metabolitos derivados de la microbiota intestinal y los derivados de la disfunción mitocondrial podrían ser usados como marcadores que aporten información pronóstica valiosa en pacientes con síndrome coronario agudo. La identificación de los pacientes con mayor riesgo podría optimizar el diseño de estrategias terapéuticas más intensivas y descubrir posibles

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

nuevas rutas metabólicas a las que dirigir nuevas armas terapéuticas en la alta tasa de eventos adversos cardiovasculares mayores que asocian estas enfermedades.

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

1. INTRODUCCIÓN

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

La metabolómica es un campo emergente para detectar nuevos biomarcadores en la enfermedad cardiovascular (ECV). Existe una destacada relación entre algunos metabolitos circulantes y la aparición de eventos cardiovasculares y así lo refleja la literatura actual. La falta de conclusiones sólidas es uno de los principales problemas debido a la heterogeneidad en los diseños de los estudios, plataformas de metabolómica y tamaños de muestra pequeños. Esta introducción intenta resumir la evidencia actual en relación a las principales vías metabólicas y sus metabolitos implicados en la enfermedad cardiovascular. Inicialmente se describe la fisiopatología y su implicación en la ECV de las dos principales vías metabólicas que atañen en esta tesis; los metabolitos derivados de la microbiota intestinal y aquellos derivados de la alteración del ciclo tricarboxílico relacionado con la disfunción mitocondrial. Posteriormente se desarrollará las principales técnicas de estudio de dichas vías finalizando con las principales implicaciones clínicas que conlleva el estudio de tratamientos dirigidos a la disfunción y acúmulo de dichos metabolitos.

1.1 Enfermedad cardiovascular

La enfermedad cardiovascular (ECV) continúa siendo la principal causa de muerte en los países desarrollados y es un problema de salud pública importante (1). Está compuesta de un grupo de patologías en las que se incluyen el síndrome coronario agudo (SCA) y el síndrome coronario crónico (SCC). El término SCA se refiere a un espectro de condiciones en las que se desarrolla isquemia y/o infarto de miocardio debido a la oclusión aguda del flujo sanguíneo coronario en una región determinada del corazón. La causa más habitual de oclusión aguda es la trombosis de la arteria coronaria, total o parcial, causada por la ruptura o erosión de una placa ateromatosa de alto riesgo (2).

La placa ateromatosa es una estructura histopatológica formada por un núcleo central con alto contenido de material lipídico y células necróticas rodeadas por una cápsula fibrosa (3). En su interior podemos encontrar células musculares lisas y células

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

inflamatorias. La aparición de estas placas tiene predilección por las zonas de bajo estrés endotelial y zonas de turbulencias como son las bifurcaciones, curvas intensas o en puntos de ramificación (4). Su génesis proviene de la oxidación intramural de las partículas de LDL que son internalizadas por los macrófagos por medio de los receptores "*scavenger*", que existen en la superficie de estas células, transformándose en células espumosas (4).

La respuesta inflamatoria atrae más células inmunitarias y hace migrar además células musculares lisas desde la capa media hacia la íntima del vaso, donde proliferan y secretan componentes de matriz extracelular (colágenos), para formar la cápsula fibrosa (5). La estabilidad de la placa depende en mayor medida de la integridad de la capa fibrosa y de sus componentes de matriz extracelular. Finalmente, si la placa se rompe, expondrá el material trombogénico hacia el lumen del vaso y favorecerá la adhesión de plaquetas para formar el trombo (5).

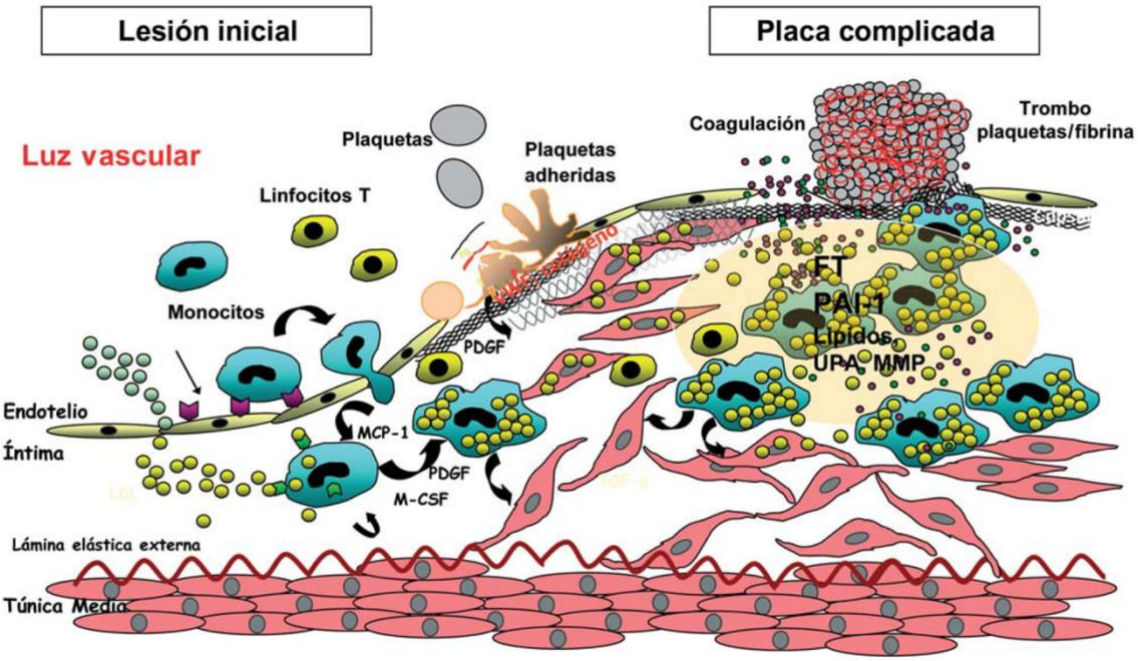

Figura 1. Representación de la formación de la placa aterosclerótica (5).

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

El sistema inmune participa de forma activa en la formación de la placa aterosclerótica debido a la presencia simultánea de linfocitos T y macrófagos en todas las etapas de la aterogénesis; adherencia de monocitos y linfocitos T al endotelio; y síntesis de citocinas proinflamatorias que perpetúan en daño vascular. Las infecciones sistémicas por ciertos microorganismos (*Chlamydia pneumonaie*, citomegalovirus y *Helicobacter pylori*) se han relacionado con la enfermedad aterosclerótica (6,7). Estos microorganismos afectan la función endotelial y activan a los macrófagos para que secreten citocinas inflamatorias que estimulan la producción de especies reactivas de oxígeno y enzimas proteolíticas como la plasmina que pueden influir en la estabilidad de la placa, de forma que existe una correlación entre la aparición de enfermedad cardiovascular debido a la activación del sistema inmune y los metabolitos provenientes de microorganismos patógenos o comensales.

Además, la disfunción mitocondrial se ha postulado como otra de las teorías contribuyentes al desarrollo de la enfermedad cardiovascular. La alteración de los procesos bioquímicos mitocondriales y la génesis de especies reactivas de oxígeno (ROS) han demostrado estar implicados en los procesos de la formación de la estría grasa (8). El estudio de estas vías de activación metabólicas puede aportar nuevos conocimientos en la etiopatogenia de la placa aterosclerótica.

1.2 Metabolómica

La metabolómica (9) es la parte de la ciencia de las "ómicas", que conforman el estudio de la biología de sistemas (genómica, transcriptómica y proteómica), implicada la identificación y cuantificación de pequeños compuestos químicos (<1000 a 1500 Da), comúnmente conocidos como metabolitos, presentes en una variedad de sistemas biológicos (10) (Figura 2). Estos metabolitos y sus interacciones dentro del sistema biológico se conocen como metaboloma. El metaboloma incluye compuestos endógenos (p. ej., aminoácidos, ácidos grasos, azúcares, carbohidratos, vitaminas,

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

lípidos y sus derivados) y exógenos (p. ej., contaminantes, productos farmacéuticos, aditivos alimentarios, xenobióticos). La composición del metaboloma es intrínsecamente dinámica y flexible debido a su interacción continua dentro del sistema biológico y también con el entorno exterior, incluidos los efectos de los fármacos, la nutrición o el estilo de vida (8). Los avances recientes en las "ómicas", nos han permitido evaluar los cambios dentro del genoma y el proteoma en las enfermedades cardiovasculares (ECV), incluido el síndrome coronario agudo (SCA). La metabolómica es necesaria para cerrar la brecha de conocimiento entre el genotipo y las anomalías metabólicas en la ECV.

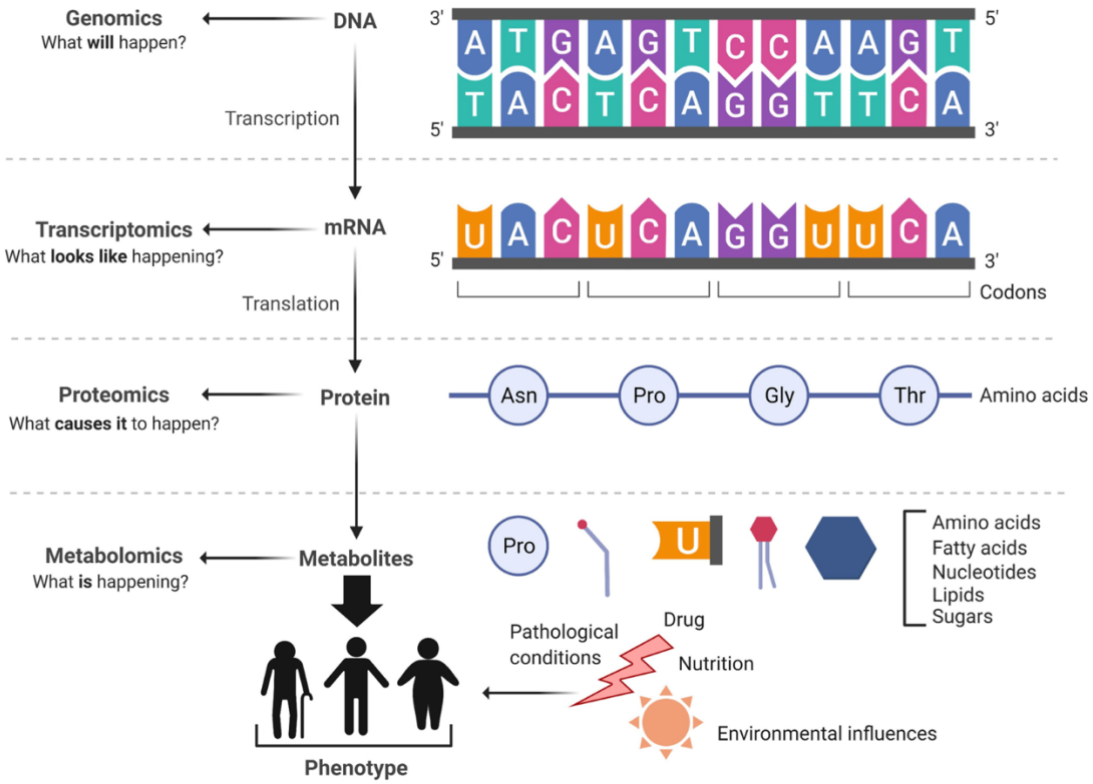

Figura 2. Escala en la cascada de "ómicas" (10).

1.3 Metabolómica en la enfermedad cardiovascular

El corazón humano es un órgano metabólicamente muy activo y, en condiciones normales, el metabolismo cardíaco está estrechamente regulado por la disponibilidad

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

de oxígeno, la oxidación de sustratos y las señales neurohumorales, entre otros factores (11). Una disminución brusca en nivel de oxígeno y de la disponibilidad de sustratos durante condiciones de isquémica del miocardio altera el estado de equilibrio dinámico del metabolismo cardíaco y conduce a la pérdida de la homeostasis (12). El bajo flujo sanguíneo durante la isquemia aguda produce un cambio substancial en el metabolismo celular generando anaerobiosis metabólica, lo que resulta en la acumulación de lactato, la disminución del pH intracelular produciendo una sobrecarga de Ca2+ intracelular y la alteración de la estructura celular generando la lisis celular (13). Por otro lado, los fenómenos de reperfusión conducen a un aumento repentino en la cantidad de oxígeno disponible que provoca un intenso aumento de especies reactivas de oxígeno mitocondriales (ROS), lo que genera una disfunción intracelular, y nuevamente un aumento brusco del Ca2+ intracelular (14).

Todas estas alteraciones metabólicas asociadas a la isquemia/reperfusión generan un desbalance en las principales vías metabólicas que inducen el aumento de ciertos metabolitos asociados a peor pronóstico cardiovascular (15). Este acúmulo de metabolitos, comunes en las células del organismo, se ha asociado a las alteraciones de la función mitocondrial y al disbalance metabólico intestinal afectando al sistema inmune del organismo y directamente a la célula miocárdica, generando un aumento del riesgo cardiovascular debido a fenómenos trombóticos y a un aumento de la ateromatosis coronaria (16).

1.4 Metabolitos derivados de la microbiota gastrointestinal

El intestino sano está compuesto principalmente de los phylos bacterianos comensales como *Actinobacterias*, *Bacteroides*, *Firmicutes* y *Proteobacteria*, siendo *Firmicutes* y *Bacteroides* los más prevalentes (17). Las bacterias anaeróbicas obligadas *Firmicutes* y *Bacteroides* constituyen más del 90 % de estas, y su proporción entre ellas difiere entre individuos debido principalmente al genoma del huésped y factores ambientales tales

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

como el estrés, el uso de antibióticos y la dieta (18). Mantener esta homeostasis y esta proporción es un trabajo de alta demanda energética para el huésped y su alteración conduce a la disbiosis intestinal debido a proliferación de enterobacterias anaerobias facultativas de la familia de *Proteobacteria* (19). Estas bacterias entéricas descomponen proteínas y polisacáridos, sintetizan vitaminas y generan una amplia variedad de productos metabólicos. Estos incluyen trimetilamina (TMA), que se convierte en N-óxido de trimetilamina (TMAO), ácidos grasos de cadena corta (SCFA) y ácidos biliares (AB) (20). Estos metabolitos participan en la regulación de las principales vías metabólicas e inmunitarias del huésped, incluidas las interacciones con las células inmunitarias, como las células dendríticas (DC), los macrófagos y las células T (21).

Varios estudios indican que diferentes bacterias pueden influir en el desarrollo de ECV a través de múltiples mecanismos. Se ha demostrado la presencia de ADN bacteriano de los géneros *Prevotella* intermedia, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetem comitans* y *Bacteroides forsythus* en placas ateroscleróticas (22). También se ha detectado microbiota de la flora comensal oral en la placa aterosclerótica en humanos (23). Se han identificado enterobacterias como *Collinsella* con repercusión metabólica sobre el huésped al disminuir la glucogénesis en el hígado, alterar la absorción de colesterol en el intestino y aumentar la síntesis de triglicéridos (24). También se ha relacionado con la alteración en la permeabilidad de la pared intestinal y con la producción epitelial de interleucina 17A (IL-17) (25). Esto produce un reclutamiento de neutrófilos los cuales contribuyen a los efectos patológicos de la disbiosis. Desde el punto de vista experimental se ha demostrado un aumento de la aterosclerosis en ratones relacionada con el consumo de antibióticos debido a la pérdida de diversidad intestinal y alteraciones de la capacidad funcional metabólica microbiana (26). Estas alteraciones de la flora estaban relacionadas con la reducción de ciertos miembros de *Bacteroidetes* y *Clostridia*. Por tanto, hoy en día podemos afirmar que la microbiota intestinal está relacionada a los fenómenos etiopatológicos de la enfermedad cardiovascular.

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

Por otro lado, la disbiosis también se ha asociado con el deterioro de la función renal al hacer que parte del intestino sea más permeable a las toxinas generadas por la microbiota, dañando los tejidos renales (27). La enfermedad renal crónica produce una acumulación de moléculas de desecho como la creatinina y la urea en el torrente sanguíneo. La alta concentración de urea induce cambios en la microbiota intestinal (28) aumentando la permeabilidad intestinal al reducir las proteínas de unión intercelular (GAP juction) y modificando los filos microbianos, aumentando aquellas bacterias que pueden metabolizar la urea. Estas bacterias producen una serie de toxinas urémicas, perpetuando el daño orgánico y reduciendo la producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFA) tales como el butirato, propionato y acetato, fuente de energía para el huesped, y que están fuertemente implicados en procesos antiinflamatorios o antiproliferativos (29). Las principales toxinas urémicas o precursores, como la trimetilamina o el TMAO, son producidos por la microbiota intestinal modificada, se absorben y se transportan al hígado, donde se distribuyen a otros órganos, incluido el riñón (30). Estas inducen daño en las células endoteliales y contribuyendo a exacerbar el daño renal al activar un estado permanente de inflamación perpeutando un círculo de injuria renal, que culminan en el empeoramiento de la función renal o la muerte (Figura 3). A continuación, se expondrá la evidencia relacionada con los principales metabolitos relacionados con la disbiosis intestinal tales como el N-óxido de trimetilamina (TMAO), aminoácidos de cadena ramificada, ácidos biliares y derivados de triptófano e indol.

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

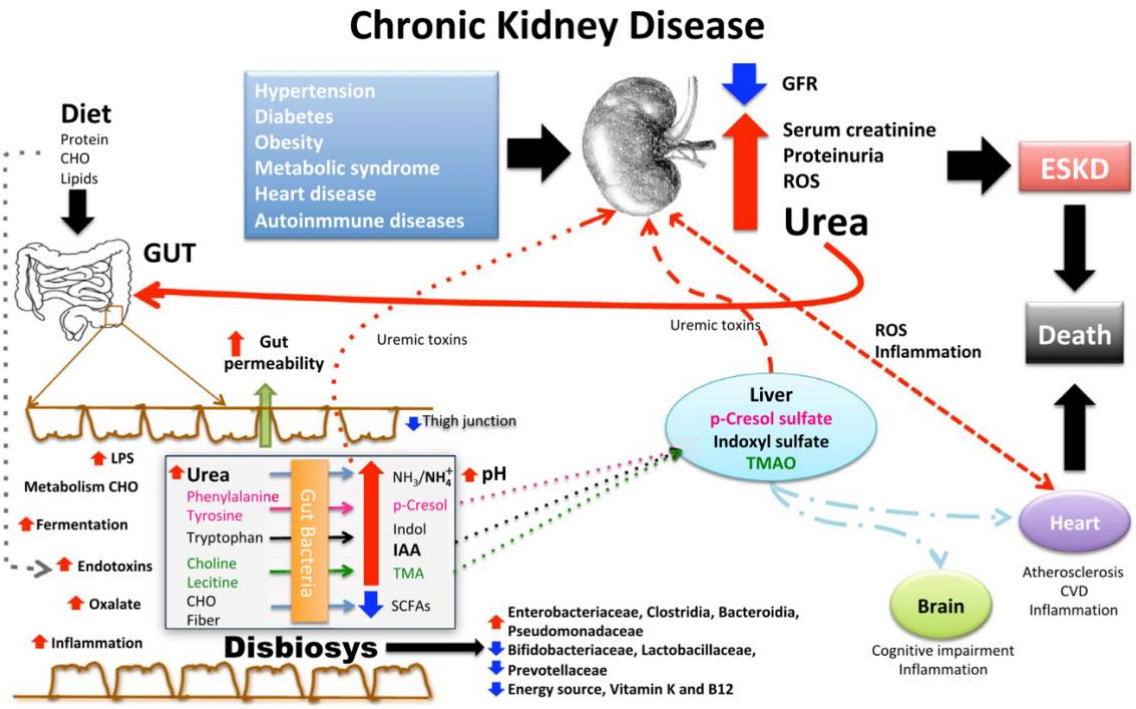

Figura 3. Mecanismo del deterioro de la función renal asociado a la disbiosis intestinal (27).

1.4.1 N-óxido de trimetilamina (TMAO)

En los últimos años, varios estudios han sugerido que TMAO es un factor de riesgo independiente para la aterosclerosis. A mayor concentración de TMAO en plasma, mayor probabilidad de eventos cardiovasculares y cerebrovasculares debido a la asociación de TMAO con la calcificación vascular e inestabilidad de la placa. Heianza et al (31) analizaron 19 estudios prospectivos (n=19 256, incluidos 3315 casos incidentes de enfermedad cardiovascular) en los que se estudiaba la relación entre los niveles de TMAO y el desarrollo de MACE. Las concentraciones elevadas de TMAO se asociaron con un mayor riesgo de MACE (RR de 1,62 (IC del 95 %, 1,45, 1,80; heterogeneidad P = 0,2; I2 = 23,5 %)) en comparación con niveles bajos de TMAO. Otra revisión sistemática, como Farhangi et al (32) mostró en su metaanálisis la relación positiva entre TMAO circulante y eventos cardiovasculares. Analizaron pacientes con enfermedad cerebrovascular los cuales tenían concentraciones de TMAO circulantes más altas en

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

comparación con los controles. Los niveles más altos de TMAO se asociaron con un aumento del 68 % en las probabilidades de accidente cerebrovascular (OR: 1,67, intervalo de confianza (IC) del 95 %: 0,86–3,24), con una heterogeneidad significativa ($I2 = 84,9$, $P < 0,001$).

Aunque su mecanismo cardiovascular aún no está claro, podría estar causado por su relación directa con el metabolismo lipídico y la disfunción endotelial. TMAO aumenta la actividad plaquetaria promoviendo la liberación de calcio citoplasmático, lo que puede predisponer a un estado de hipercoagulación y también puede activar la proteína 3 del receptor tipo NOD del inflamasoma (Nlrp3) a través de diferentes vías para aumentar el estrés oxidativo y la disfunción endotelial (19). TMAO puede regular al alza diferentes tipos de receptores celulares del sistema inmune, como el grupo de diferenciación 36 (CD36), promoviendo la formación de células espumosas, lo que conduce al desarrollo y la progresión de la aterosclerosis (33). Además, TMAO es similar a la lipoproteína de baja densidad oxidada (ox-LDL), promoviendo la diferenciación de monocitos en macrófagos empeorando la respuesta inmune inflamatoria de los macrófagos y su transformación en células espumosas (34). Finalmente, el depósito de colesterol en las paredes de los vasos sanguíneos es contrarrestado por el transporte inverso de colesterol (RCT). Este es un proceso mediante el cual los macrófagos contrarrestan la acumulación de exceso de colesterol (34). TMAO puede inhibir el proceso RCT y afectar el metabolismo del colesterol induciendo la formación de placa. Recientemente se ha propuesto la determinación de TMAO como biomarcador de síndrome metabólico y obesidad. En un estudio realizado por Mouries et al (35) se detectaron niveles más elevados de dicho biomarcador en pacientes con mayor IMC y con mayor tasa de hígado graso no alcohólico.

La microbiota intestinal descompone anaeróbicamente los alimentos grasos con alto contenido de colesterol, produciendo fosfatidilcolina (PC) y L-carnitina (36) (Figura 4). La L-carnitina está presente principalmente en carnes rojas y lácteos absorbiéndose del

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

54-87% por el intestino delgado, siendo la fracción no absorbida fermentada por el microbioma. La L-carnitina es esencial para el funcionamiento normal del corazón ya que forma parte del metabolismo energético del miocito. En un estudio realizado en pacientes con infarto agudo de miocardio, la L-carnitina mejoró la supervivencia al reducir el tamaño del infarto, las arritmias ventriculares, la dilatación del ventrículo izquierdo y la incidencia de insuficiencia cardíaca (IC) (37). La colina se encuentra en el hígado de ternera/pollo, huevos, trigo, cerdo y soja, entre otros alimentos y es una molécula esencial, que funciona como precursora de la síntesis de fosfolípidos, incluida la fosfatidilcolina, un componente básico en la formación de la membrana plasmática y precursor del neurotransmisor acetilcolina. La fosfatidilcolina constituye hasta el 40% de la composición de la bilis y el microbioma intestinal solo metaboliza las cantidades en exceso (38). La cohorte PREDIMED (39) estudió en 229 pacientes sanos la asociación entre la colina plasmática y un aumento del riesgo de eventos cardiovasculares mayores. Las concentraciones mayores de colina se asociaron con un riesgo 2,21 veces mayor de ECV en cuartiles extremos. Otra fuente de TMA es la ergotioneína, una amina biogénica (derivada de la histidina) que se puede obtener de algunas fuentes dietéticas, como los champiñones, algunos productos cárnicos (principalmente hígado y riñón) y varios tipos de legumbres (40). La degradación de la ergotioneína por la enzima ergotionasa produce TMA.

Los metabolitos intermedios de la fosfatidilcolina como la betaina y la dimetilglicina y los de la L-carnitina se han asociado de forma independiente al desarrollo de infarto de miocardio e insuficiencia cardíaca (41-42). La dimetilglicina, se encuentra en niveles bajos en cereales, semillas, legumbres e hígado y se forma a partir de la betaína durante la remetilación de la homocisteína a metionina por la betaína-homocisteína metiltransferasa (BHMT) y normalmente se excreta en la orina o se metaboliza a sarcosina (43). La desregulación en el metabolismo de la dimetilglicina puede conducir a su acumulación en el plasma, lo que inhibiría la actividad de BHMT, lo que posiblemente provocaría una elevación de las concentraciones de homocisteína. La

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

homocisteína está ampliamente descrita en la literatura como causante de enfermedad cardiovascular (43). Finalmente, estos metabolitos intermedios se convierten selectivamente en TMA mediante enzimas de la microbiota anaeróbica intestinal.

En menor medida se ha demostrado la absorción directa de TMAO a través del consumo de pescado y marisco (44). Sin embargo, el riesgo de ECV no aumenta ya que el pescado también contiene moléculas cardioprotectoras como los ácidos grasos poliinsaturados ω3, principalmente el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA) (45). De hecho, el uso de aceite de pescado en ratones mejoró los efectos adversos producidos por TMAO, incluida la alteración de la tolerancia a la glucosa, la inflamación del tejido adiposo y el aumento de los niveles de IL-10 (46). Las dietas con suplementos de pistacho parecen reducir la formación de TMAO (47) mientras que los suplementos de histidina parecen aumentar los niveles de TMAO en plasma y orina (48).

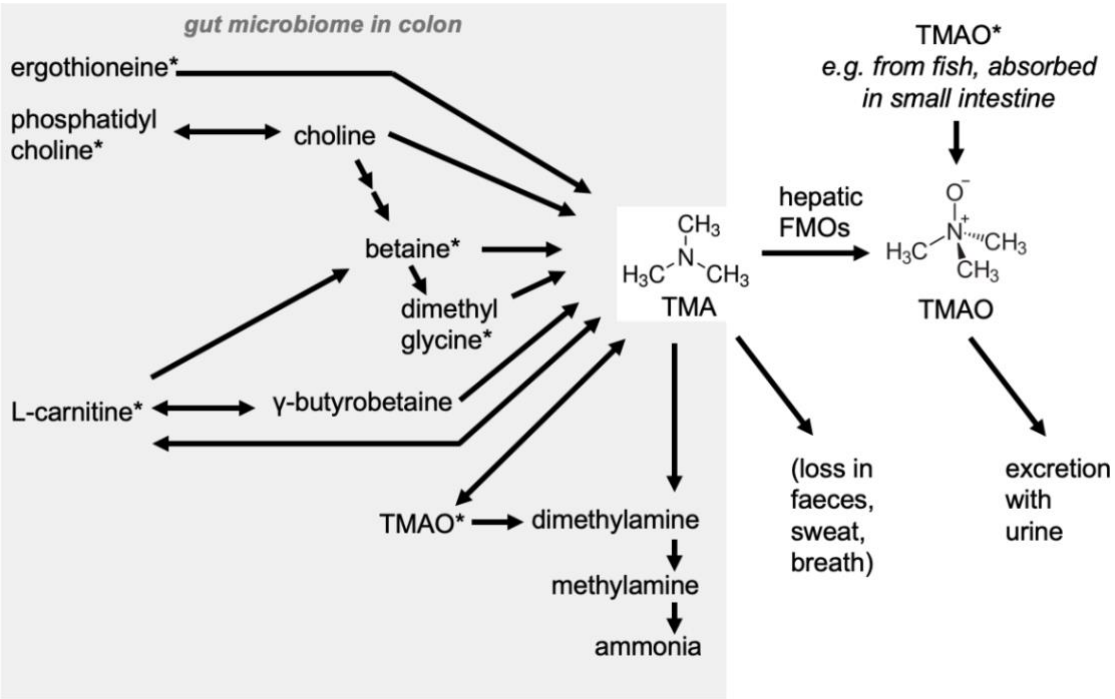

Figura 4. Formación del TMAO a partir de sus precursores (33).

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

La TMA se transfiere al hígado a través de la circulación portal y es oxidada por la flavina monooxigenasa hepática 3 (FMO3) (Figura 5.), lo que resulta en la producción de TMA-N- óxido (TMAO). Se ha demostrado que el aumento de TMAO disminuye la reserva de ácidos biliares e inhibe su síntesis, lo que afecta al metabolismo del colesterol específicamente el transporte inverso de colesterol (RCT) (49). Se han demostrado variaciones en los niveles de TMAO asociados a mayor edad, sexo masculino y a variaciones interindividuales de la FMO3 hepática (50-52). Prácticamente el 95% de la TMA se oxida y luego se excreta en la orina en una proporción de 3:95 TMA: TMAO dentro de las posteriores 24 h, solo el 4% se excreta en las heces y menos del 1% se elimina con la respiración (53). El N-óxido de trimetilamina también puede ser metabolizado a dimetilamina (DMA), formaldehído, amoníaco y metano por algunas bacterias metanogénicas que contienen la enzima TMAO desmetilasa (54).

Como previamente se comentó, la relación entre la afectación renal y los niveles de TMAO está ampliamente descrita en la literatura. Al-Obaide et al. (55) investigó la relación entre el microbiota intestinal y la producción de trimetilamina (TMA) en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y ERC. El análisis incluyó parámetros antropométricos y metabólicos, características de la microbiota intestinal productora de TMA y las concentraciones de TMAO. Se estudió los filos microbiológicos mediante la identificado por amplificación de regiones V3-V4 de los genes de ARN ribosomal 16S y secuenciación de ADN identificando una mayor incidencia de bacterias productoras de TMA respecto a pacientes sanos.

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

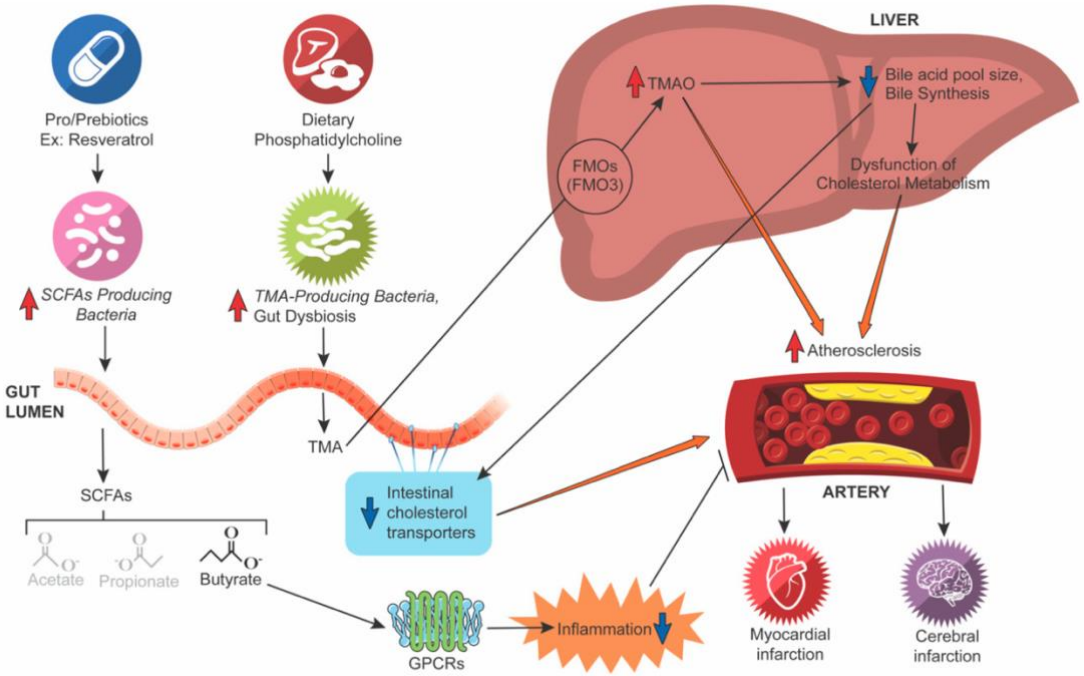

Figura 5. Metabolismo del TMAO (33).

1.4.2 Aminoácidos de cadena ramificada

Los aminoácicos de cadena ramificada o *branched chain aminoacids* (BCAA) pueden tener un papel en las enfermedades metabólicas a través de la sobreestimulación y la promoción de la resistencia a la insulina. Estos comprenden 3 aminoácidos esenciales (AA): leucina (Leu), isoleucina (Ile) y valina (Val), que representan del 35 al 40 % de los aminoácidos dietéticos indispensables en las proteínas corporales (56). Influyen en el metabolismo de la glucosa, las proteínas y los lípidos y los cambios en la disponibilidad de aminoácidos tienen efectos importantes en la señalización celular, la expresión génica y las funciones neuroendocrinas (57). Asghari et al (58) incluyeron 1205 sujetos, con edad ≥ 20 años, a los que se les hizo un seguimiento durante una duración media de 2,3 años. Se determinaron los niveles ingeridos de BCAA, utilizando un cuestionario de frecuencia de alimentos validado. La ingesta de BCAA de los participantes fue de 42,7 y 13,8 g/día, respectivamente. La incidencia de hiperinsulinemia, disfunción de las

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez
Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

células β, insensibilidad a la insulina y resistencia a la insulina fue mayor en el tercil más alto de ingestas de BCAA totales (OR = 1,67, intervalo de confianza (IC) del 95 %: 1,03–2,71), tras el ajuste por variables de confusión.

En Du et al (59), observó que niveles elevados de BCAA en plasma se asociaron con eventos cardiovasculares adversos a largo plazo en pacientes con STEMI y, además, los BCAA mejoraban el valor predictivo de NT-proBNP y la puntuación GRACE. Por otro lado, Tobias et al (60), observó una asociación positiva significativa entre los BCAA con el riesgo de ECV a largo plazo, comparable en magnitud al colesterol LDL. En concreto, esta relación fue mayor entre las mujeres que desarrollaron DT2 antes de la ECV. Esta consistencia refuerza la posible relación causal entre estos metabolitos y la ECV o al menos el papel de estos metabolitos como biomarcadores de disfunción biológica relacionada con la ECV.

Recientemente se han descrito otras rutas metabólicas asociadas con los aminoácidos de cadena ramificada. El receptor de la rapamicina en mamíferos (mTOR) es un complejo proteico sensible a los nutrientes que promueve la síntesis de proteínas y lípidos que inducen la proliferación y diferenciación celular e inhibe su autofagia (61). La señalización de mTOR exacerba la remodelación miocárdica adversa y promueve la insuficiencia cardíaca posterior al infarto de miocardio (62). Se ha demostrado que los BCAA, como Leu, desempeñan un papel fundamental en la activación de mTOR (61) a través de la sobreestimulación de dicho receptor. La desregulación de mTOR en el corazón está directamente implicada en la hipertrofia cardíaca, lo que conduce a una disfunción cardíaca y remodelación en el infarto de miocardio (63).

1.4.3 Ácidos biliares

Los ácidos biliares o *bili acids* (BA) son ácidos esteroideos producidos principalmente por el hígado y secretados en la bilis, un líquido digestivo que ayuda a descomponer las

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

grasas en el intestino delgado (64). Los BA primarios se sintetizan a partir del colesterol hepático y los BA secundarios provienen de la desconjugación facilitada por las bacterias intestinales residentes en el íleon distal (65). Si bien los ácidos biliares tienen una función importante en la digestión, también se ha descubierto que están relacionados con la enfermedad cardiovascular.

Se unen y activan el receptor X farnesoide del receptor hormonal nuclear (FXR) y el receptor de ácidos biliares acoplado a proteína G (TGR5), que están fuertemente asociados con la homeostasis de la glucosa y mejoran la tolerancia a la glucosa (66). La activación del receptor BA está muy involucrada en la modulación de la función inmune y en la prevención de ECV. El taurocolato, el tauroquenodesoxicolato, que son dos ácidos biliares esteroides, están significativamente asociados con mortalidad por ECV según Huang et al (67). Analizó un compuesto de 406 metabolitos, encontrado una estrecha asociación entre los niveles de ácidos biliares y la mortalidad por ECV (OR = 1,21, intervalo de confianza (IC) del 95 %: 1,22–1,07).

Los altos niveles de taurocolato se han relacionado con menores riesgos de hipertensión, accidente cerebrovascular y otras enfermedades ateroscleróticas. Una revisión de estudios epidemiológicos analizados por Yamori et al (20) describió una asociación inversa del taurocolato con las tasas de mortalidad ajustadas por edad de accidente cerebrovascular y ECV, obesidad, hipertensión e hipercolesterolemia, contribuyendo a la prevención nutricional de las ECV. Involucrados en la regulación de su propia síntesis a través de la circulación enterohepática, no se conoce bien el grado en que los niveles plasmáticos circulantes más altos o más bajos de taurocolato reflejan la actividad general de los ácidos biliares. En el estudio ARIC, un análisis de datos metabolómicos de 1919 participantes de raza negra, incluidos 183 a los que se les acababa de diagnosticar fibrilación auricular (FA), Yu et al (68) demostró una asociación de niveles circulantes más altos de ácidos biliares con la incidencia de FA. Alonso et al (69) en 2019 confirmaron la asociación de la FA con los niveles de ácidos biliar en una

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

cohorte de 3922 pacientes. Aunque los factores de riesgo en la fibrilación auricular están bien establecidos, los ácidos biliares podrían ser una vía involucrada en el trastorno eléctrico cardíaco que sufren estos pacientes. Además, se ha descubierto que los ácidos biliares pueden afectar directamente la función de las células endoteliales, reduciendo su capacidad para funcionar correctamente, lo que aumenta el riesgo de enfermedad cardiovascular. Se necesita más investigación para comprender mejor la relación entre el metabolismo de los ácidos biliares y la longevidad humana.

1.4.4 Derivados de triptófano e indol

El triptófano es un aminoácido esencial vital para mantener la salud y la homeostasis (71) y también tiene un fuerte impacto en la expresión de interleucinas (72) relacionadas con la presencia de enfermedades inflamatorias y autoinmunes. Además, el triptófano pertenece a un grupo de sensibilizadores de los receptores β-adrenérgicos que aumentan la contractilidad de las células del miocardio humano, demostrando una propiedad inotrópica (71). Eso fue probado por Korotaeva et al (70) que analizó la contracción miocárdica debida a la estimulación con triptófano en tiras miocárdicas (n=20) de la aurícula auricular derecha de 20 pacientes, lo que resultó en un efecto inotrópico positivo significativo. Ese hecho podría estar empeorando la congestión sistémica inducida por la IC. Sin embargo, no se ha probado en una cohorte real.

Por otro lado, la fermentación de tirosina produce p-cresol y, en última instancia, sulfato de p-cresilo (PCS). El nivel de PCS también se ha relacionado en pacientes con IC (72). El nivel de PCS está relacionado con la edad, la función renal y, probablemente, con un patrón específico de colonias de flora intestinal. Wang et al (73), encontraró una correlación después del análisis multivariable en poblaciones de pacientes con IC, entre el aumento de PCS y los eventos relacionados con la IC. Incluso proponen un modelo con una combinación de PCS y BNP para estratificar mejor el riesgo de los pacientes con IC. Sin embargo, esta relación no ha sido establecida y se necesitan más investigaciones.

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

1.5 Metabolitos derivados del ciclo del ácido tricarboxílico y de la función mitocondrial.

Las mitocondrias son unas organelas celulares encargadas de la producción de energía a través de la oxidación de ciertos metabolitos (azúcares, grasas y proteína). Diversas vías bioenergéticas son utilizadas en el interior de dichas organelas para la génesis de ATP, como la oxidación del piruvato, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, la betaoxidación mitocondrial de los ácidos grasos y la vía final común de la fosforilación oxidativa que genera el 80-90% del ATP celular (74).

En los cardiomiocitos, existen dos poblaciones mitocondriales formadas por mitocondrias interfibrilares y subsarcolémicas (Figura 6.). Las mitocondrias interfibrilares forman series longitudinales paralelas y tienen una orientación principalmente tubular de sus crestas. Las mitocondrias subsarcolemales se agrupan debajo del sarcolema y muestran una orientación de sus crestas de forma laminar (75). En las células del músculo cardíaco, ambas poblaciones mitocondriales están

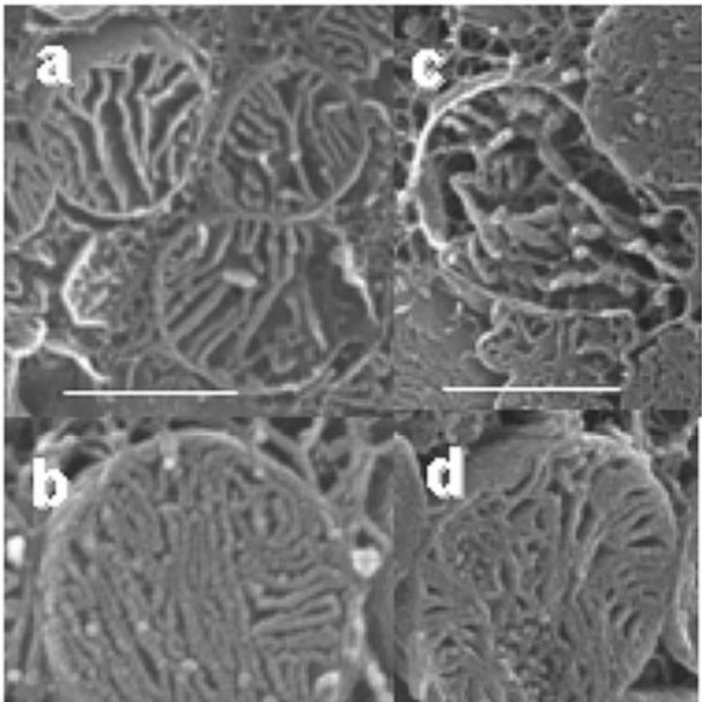

Figura 6. Formas de la mitocóndira: a,b,d corresponden a mitocondrias subsarcolemales en forma laminar, c corresponde a mitocondrias interfibrilares con forma tubular (75).

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

eléctricamente acopladas entre sí proporcionando el paso de la electricidad de una mitocondria a otra.

En diferentes patologías cardíacas se producen cambios estructurales de las mitocondrias formando las conocidas como mitocondrias gigantes (megamitocondrias) (Figura 7.) generadas por la fusión de orgánulos adyacentes debido a la sobreexpresión de proteínas de fusión, como la mitofusina 1 (Mfn1) y Mfn2 (76). Las megamitocondrias suelen ser disfuncionales y se eliminan mediante el mecanismo de la mitofagia.

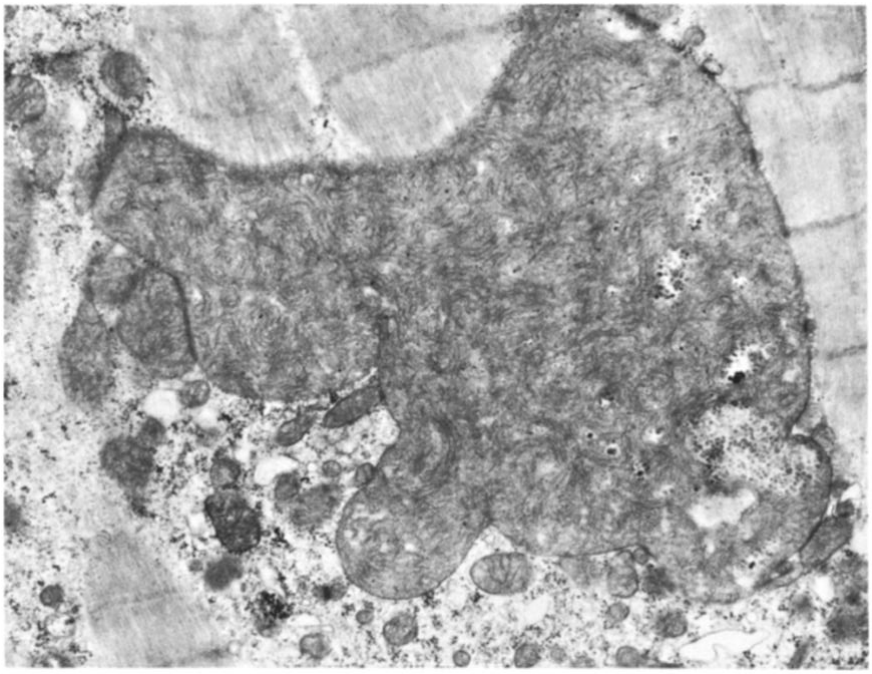

Figura 7. Megamitocondria imagen a microscopio electrónico de una megamitocondria (76).

A parte de los cambios morfológicos de las mitocondrias, diversas alteraciones en los procesos bioquímicos mitocondriales se han visto relacionadas con ciertas patologías cardíacas; tales como mutaciones en el ADN mitocondrial (ADNmt), alteraciones en el mecanismo de la mitofagia, en la fosforilación oxidativa (OXPHOS), disfunción de los ciclos metabólicos mitocondriales y en el aumento de las especies reactivas de oxígeno

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

(Figura 8). A continuación, se describen las principales vías metabólicas implicadas en la disfunción mitocondrial.

1.5.1 Mutaciones en el ADN mitocondrial

El ADN mitocondrial humano es un genoma circular de doble cadena formado por 37 genes implicados en el correcto funcionamiento de la respiración aeróbica y la producción energía a través de OXPHOS. Este ADNmt no está protegido por histonas y no se recombina, lo que genera tasas de mutación aproximadamente 10 a 100 veces más altas que el ADN nuclear (77). Las mutaciones de ADNmt incluyen deleciones puntuales, deleciones de fragmentos y reordenamientos de ADNmt a gran escala, que pueden afectar directamente a las vías de respiración celular. Estas alteraciones se han asociado con la enfermedad cardiovascular; por ejemplo, genes como el MT-RNR1, MT-TL1, MT-TL2 y MT-CYB están asociados con la aterosclerosis (78).

El efecto general de las mutaciones del ADNmt en la función mitocondrial depende del grado de heteroplasmia (la proporción de copias afectadas). El grado de heteroplasmia determina tanto la manifestación como la gravedad de la enfermedad porque se necesita un número crítico de copias de ADNmt mutadas para que los síntomas clínicos se manifiesten (efecto umbral). Este umbral patogénico varía en diferentes tejidos según su nivel de metabolismo, lo que explica por qué el cerebro y el músculo se ven afectados con relativa frecuencia (encefalomiopatías mitocondriales), aunque potencialmente todos los órganos y tejidos pueden verse afectados (78).

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

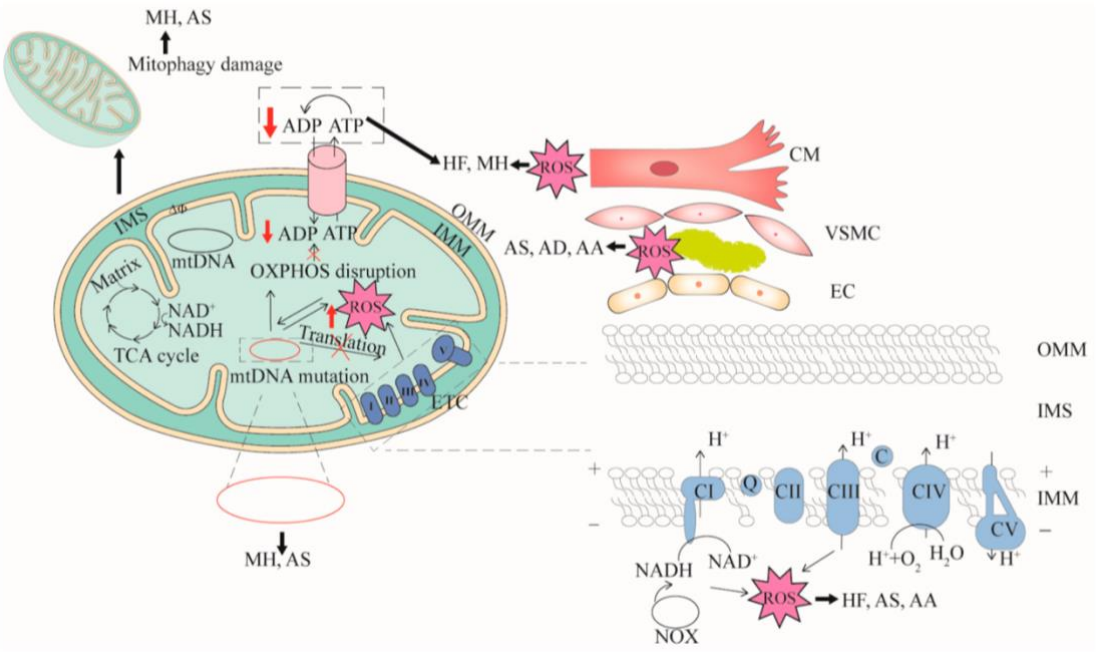

Figura 8. Mecanismo de disfunción mitocondrial en la enfermedad cardiovascular (79).

1.5.2 Alteraciones en la mitofagia (autofagia mitocondrial)

La autofagia es necesaria para mantener la homeostasis celular en la mayoría de las células del sistema cardiovascular siendo la principal de las vías de control para eliminar las mitocondrias dañadas en las células (80). Durante la mitofagia, las mitocondrias dañadas son secuestradas por vesículas de doble membrana y finalmente se hidrolizan por los lisosomas, Su alteración deriva en la acumulación de mitocondrias disfuncionales, lo que puede conducir a una función celular anormal llevando a la progresión de la enfermedad cardiovascular. La mitofagia defectuosa afecta a la progresión de las lesiones ateroscleróticas y promueve un fenotipo de placa inestable debido a la alteración en las vías de señalización intracelular PINK1/Parkin. Nahapetyan et al (81) demostró que dichas vías disfuncionaban en las células endoteliales de las arterias de los ratones estudiados producirse un déficit en los procesos de autofagia mitocondrial e induciendo disfunción del endotelio.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez
Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

1.5.3 Aumento de las especias reactivas de oxígeno

La producción de ROS mitocondrial está estrechamente relacionada con la cadena de transporte de electrones mitocondrial y la NADPH oxidasa (NOX). En el proceso de transferencia de electrones mitocondriales, el complejo I y el complejo III son los principales sitios de generación de ROS (Figura 9.) (82). El NADPH actúa como sustrato para generar ROS bajo la acción de la NOX. Como subproducto tóxico, las ROS pueden dañar las mitocondrias y están implicadas en el mecanismo patológico de las enfermedades cardiovasculares. A su vez, las mitocondrias dañadas inducen la liberación de una gran cantidad de ROS de las mitocondrias adyacentes, lo que se conoce como ROS inducida por ROS en forma de cascada (83). Se ha demostrado que el aumento de ROS mitocondrial conduce a un aumento de las células apoptóticas y promueve la aterosclerosis (84). El aumento de ROS predispone a las células endoteliales a la disfunción mitocondrial, la inflamación vascular y la acumulación de lipoproteínas de baja densidad oxidadas, lo que contribuye a la aterosclerosis y posiblemente a la ruptura de la placa (84).

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

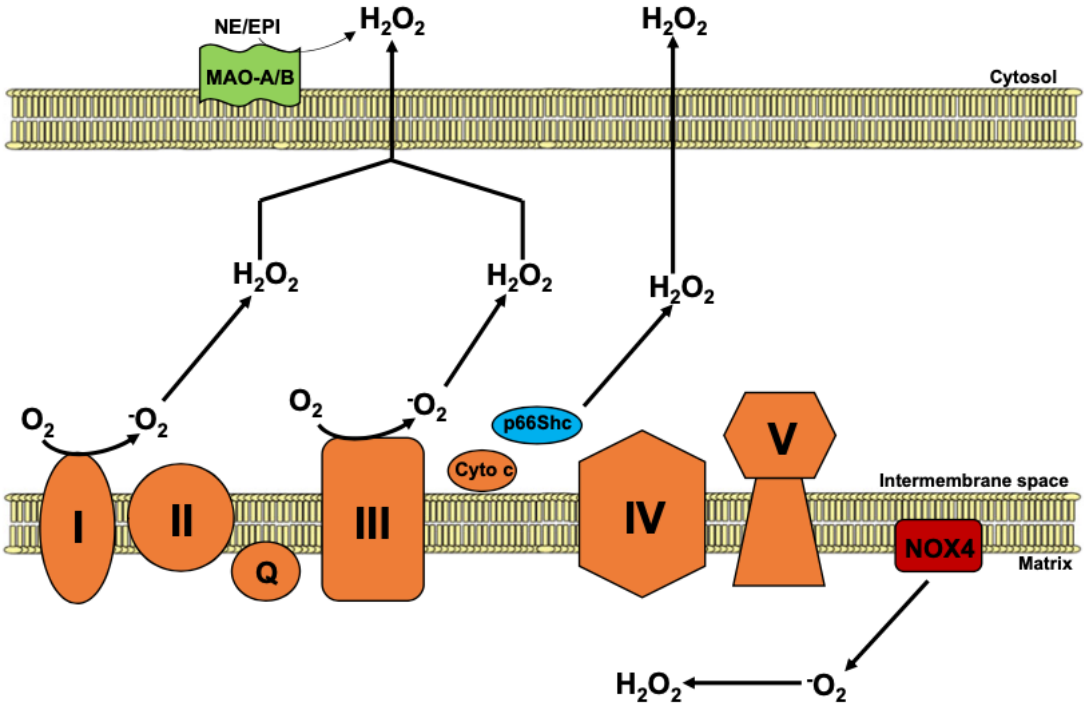

Figura 9. Cadena trasportadora de electrones y génesis de ROS (82).

Para combatir los ROS mitocondriales, estas organelas tienen un sistema de protección generado a través de la las enzimas superóxido dismutasa (SOD). Hay tres isoformas diferentes de SOD (SOD1, SOD2 y SOD3) de las cuales las actividades de SOD1 y SOD2 son fundamentales para la eliminación de ROS mitocondrial. Las alteraciones de estas enzimas pueden aumentar el estrés oxidativo en las mitocondrias viéndose implicadas en la formación de miocardiopatía hipertrófica e insuficiencia cardíaca (85,86).

1.5.4 Alteraciones en el ciclo tricarboxílico y la fosforilación oxidativa

El ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), también conocido como ciclo de Krebs, es una vía metabólica clave en la producción de energía en nuestras células. Forma la segunda etapa del metabolismo oxidativo siendo un proceso complejo que implica la oxidación de compuestos orgánicos, como el acetil-CoA, para producir ATP, la molécula de energía que las células utilizan para realizar sus funciones. El corazón necesita una gran cantidad de energía en forma de ATP que se genera principalmente a través del metabolismo

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

oxidativo en las mitocondrias. La tercera etapa que sigue al ciclo TCA es la fosforilación oxidativa en la cual el poder reductor (NADH y FADH2 principalmente) se emplea para formar más ATP.

Las alteraciones en el funcionamiento del ciclo del ácido tricarboxílico también conducen a la interrupción de los procesos de la dinámica mitocondrial. Así, una de las enzimas más importantes involucradas en el ciclo del ácido tricarboxílico es la succinil coenzima A sintetasa. Se ha demostrado mutaciones en los genes que codifican dicha proteína producen disfunción mitocondrial, alteración de la fosforilación oxidativa y aumento de la producción de ROS (88). Takada et al (87), utilizando un modelo de ratón en el que se indujo infarto de miocardio mediante la ligadura de la arteria coronaria, mostraba cuatro semanas después una disminución significativa en los niveles miocárdicos de succinil-CoA, y esta disminución afectó la capacidad de fosforilación oxidativa mitocondrial (OXPHOS).

En la misma, línea Bulló el at (89) estudió en la cohorte PREDIMED la relación de la alteración del ciclo de ácido tricarboxílico y la fibrilación auricular y insuficiencia cardíaca. Se estudiaron los niveles plasmáticos basales de citrato, aconitato, isocitrato, succinato, malato y D/L-2-hidroxiglutarato mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem. Los niveles elevados de succinato, malato, citrato y D/L-2-hidroxiglutarato se asociaron con un mayor riesgo de FA [OR Q4 vs Q1 (95% IC): 1,84 (1,25-2,71), 2,16 (1,49-3,12), 1,78 (1,22-2,61) y 1,83 (1,26-2,67), respectivamente]. Por último, en un estudio experimental dirigido por Becker et al (90) se incubaron macrófagos con LDL acetilado (acLDL) para obtener células cargadas de colesterol LDL oxidado (OxLDL) evidenciando que los macrófagos expuestos a OxLDL presentaban una respiración mitocondrial significativamente reducida y una disminución de las actividades de aconitasa, isocitrato deshidrogenasa y α-cetoglutarato deshidrogenasa, enzimas limitantes en la función del ciclo de Krebs.

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

1.6 Análisis de los metabolitos

La mayoría de los estudios de metabolómica en SCA se han realizado utilizando plasma o suero como fuente de muestra. El suero se extrae después de que la sangre se haya coagulado y se obtiene por centrifugación. Para el plasma, la sangre no está coagulada y se obtiene agregando un anticoagulante (heparina, citrato o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)) a la sangre total, seguido de centrifugación. Por lo general, el plasma constituye hasta el 55% del volumen total de sangre y contiene proteínas disueltas, factores de coagulación, sales, lípidos y otros materiales suspendidos en el agua. El suero es similar al plasma, excepto que carece de fibrinógeno. A diferencia del suero, el plasma tiene la ventaja de que puede colocarse inmediatamente en hielo, evitando así la posible pérdida de metabolitos lábiles debido a la conversión enzimática u otros procesos de degradación durante la formación del coágulo a temperatura ambiente (91). La literatura actual sugiere que, aunque ambos biofluidos son comparables en términos de rendimiento analítico, el suero puede proporcionar una mejor sensibilidad que el plasma. Yu et al (92) comparó los perfiles metabólicos en suero y plasma de 216 metabolitos identificando un 46% de diferencias siendo los niveles de todos los metabolitos más altos en el suero, aunque la reproducibilidad era ligeramente mejor en plasma. De forma que parece que la mayor sensibilidad se obtiene mediante el estudio de estos metabolitos en suero, aunque la mayor reproductibilidad y procesamiento de las muestras se obtiene mediante el plasma.

Debido a esta complejidad y naturaleza dinámica del metaboloma, ninguna plataforma de análisis disponible en la actualidad puede analizar simultáneamente todos los metabolitos presentes en una muestra biológica. En las últimas dos décadas se han desarrollado numerosas plataformas analíticas con diversos grados de especificidad y sensibilidad para medir porciones específicas del metaboloma. En la actualidad, la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (NMR) y la espectrometría de masas

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

(MS), junto con la cromatografía de gases o líquidos (GC/MS o LC/MS, respectivamente), son las herramientas analíticas más utilizadas en las investigaciones de metabolómica.

1.6.1 Resonancia magnética nuclear espectroscópica

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) o *nuclear magnetic resonance spectroscopy* (NMR) es una de las técnicas más utilizadas en la investigación metabolómica basada en las propiedades del espín magnético (momento magnético nuclear y momento angular) de los protones y neutrones en el núcleo de un átomo para proporcionar información sobre las estructuras moleculares. Se basa en el principio de que cualquier núcleo que posea un espín nuclear (distinto de cero) puede liberar ondas de radiofrecuencia características cuando se coloca en un campo magnético externo. Las frecuencias resultantes se registran como cambios químicos y sus patrones se pueden utilizar para la identificación de compuestos (93). Las principales ventajas de la RMN son su naturaleza no destructiva y su mayor reproducibilidad. Sin embargo, a menudo está limitado por la necesidad de una cantidad de muestra más grande (2–50 mg) y, por lo tanto, reduce la sensibilidad para compuestos poco abundantes, tiempos de adquisición de datos relativamente más largos y altamente sensible al pH (94).

1.6.2 Espectrometría de masas

La espectrometría de masas (EM) o *mass spectometry* (MS) separa las moléculas en función de su relación masa-carga específica (m/z) al convertirlas en iones en la fase gaseosa (Figura 10). A continuación, los iones separados se clasifican según su aceleración y desviación en un campo electromagnético externo. El resultado final se presenta como la abundancia relativa de cada ion con un espectro m/z. Esta técnica se usa ampliamente debido a su amplio rango dinámico, velocidad, alta sensibilidad y la capacidad de identificar y cuantificar más metabolitos en una sola medición en relación con la RMN. La EM tiene esencialmente tres componentes principales: (1) la fuente de

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

iones, donde se ioniza la muestra, (2) el analizador de masas, donde los iones se separan según sus valores de masa a carga (m/z), y (3) el detector, que proporciona un recuento de la intensidad de los iones separados (95).

A menudo se emplea una técnica de separación (gas chromatography o liquid chromatography) antes del análisis de EM para aislar los componentes individuales de muestras complejas que contienen cientos o miles de moléculas pequeñas. Las técnicas de separación cromatográfica utilizan las propiedades fisicoquímicas de los compuestos en una muestra, como la polaridad, el tamaño y la presencia de dobles enlaces, para separar las moléculas dentro del medio. Por lo tanto, las combinaciones de separación y MS, generalmente GC/MS o LC/MS, se han convertido en la opción analítica preferida para el análisis de moléculas pequeñas de muestras biológicas complejas (96).

En comparación con la RMN, la EM es el método de elección para el perfilado global de metabolitos y la identificación de compuestos desconocidos dentro de las muestras. La mayoría de los estudios clínicos de lipidómica en SCA se realizaron utilizando la plataforma LC/MS (95). Además, EM también proporciona una excelente plataforma analítica para perfilar la composición molecular de los complejos de lipoproteínas.

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

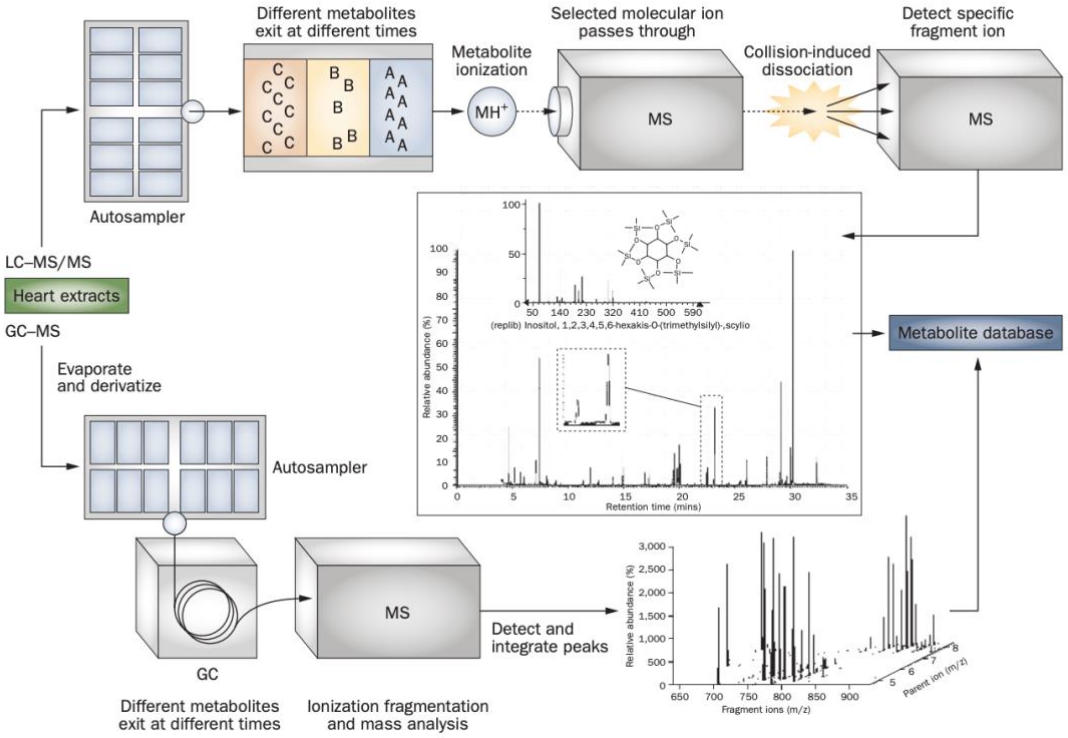

Figura 10. Esquema del mecanismo utilizado por la espectrometría de masas líquida o gaseosa (93).

1.7 Intervenciones para la regulación de la microbiota

La relación entre la microbiota intestinal alterada, los metabolitos y la susceptibilidad a las ECV y las enfermedades metabólicas han puesto de relieve el microbioma intestinal como un nuevo objetivo potencial para la terapéutica. Actualmente, la modulación de la dieta es la principal herramienta terapéutica utilizada en la práctica clínica para impactar las enfermedades metabólicas crónicas, y aunque esta interacción con el estilo de vida puede afectar claramente la estructura y función de la comunidad microbiana intestinal, hay pocos estudios que exploren el impacto de las intervenciones dietéticas en el microbioma intestinal en humanos. Existe escasa bibliografía en referencia a dichas intervenciones y actualmente los métodos terapéuticos más destacados se muestran a continuación.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez
Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

1.7.1 Modificaciones en la dieta.

Aunque la composición de la microbiota es bastante resistente a lo largo de la vida de un individuo, las intervenciones dietéticas que inducen cambios rápidos en ciertos nutrientes pueden modificar la composición de la microbiota (97). Las dietas ricas en fibra promueven el crecimiento de bacterias comensales beneficiosas y limitan el crecimiento de patógenos oportunistas demostrando una reducción de la presión arterial, la hipertrofia y la fibrosis miocárdica (98). Dado que una alteración en la composición de la microbiota intestinal se ha relacionado con diferentes enfermedades, la modulación de la composición de la microbiota a través de la intervención dietética representa un objetivo terapéutico prometedor.

1.7.2 Trasplante fecal

La modulación microbiana intestinal mediante el trasplante de microbiota fecal es una intervención terapéutica utilizada para desplazar los patógenos intestinales mediante la introducción de contenido fecal de sujetos sanos en el tracto gastrointestinal de los pacientes. Esta técnica ha ido creciendo específicamente en el ámbito de la enfermedad inflamatoria intestinal (99) y actualmente se está explorando en el campo de la enfermedad cardiovascular. Vrieze et all (100) aplicó esta técnica transplantando a pacientes con sobrepeso y síndrome metabólico sus propias heces (transferencia autóloga) o de controles sanos delgados (transferencia alogénica). Después de 6 semanas de seguimiento, la transferencia fecal alogénica había mejorado la sensibilidad a la insulina hepática y periférica en un 119 % y un 176 %, respectivamente. Otro estudio experimental en ratones mostró una reducción de la enfermedad coronaria en aquellos animales a los que se les trasplantó una flora intestinal sana (101). Sin embargo, el uso del trasplante fecal actualmente está limitado debido a sus riesgos asociados, incluida la posible transferencia de endotoxinas o agentes infecciosos que podrían causar nuevas

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

complicaciones gastrointestinales (102). Se necesitan más estudios para evaluar si el trasplante podría ser un arma terapéutica en los trastornos cardiovasculares.

1.7.3 Probióticos y antibióticos

Los probióticos son bacterias vivas "beneficiosas" que se administran para restablecer un equilibrio intestinal adecuado. Los probióticos pueden actuar potencialmente a través de diferentes mecanismos que incluyen la modulación del pH, la producción de compuestos antibacterianos y la competencia con patógenos. Varios estudios han demostrado ciertos beneficios metabólicos a nivel cardiovascular. La suplementación con *Lactobacillus reuteri* aumenta la secreción de insulina al promover la liberación de incretina en sujetos obesos (103). *Escherichia coli Nissle* redujo la obesidad inducida por una dieta alta en grasas, la resistencia a la insulina y la esteatosis hepática en ratones (104).

Por otro lado, el uso de antibióticos para eliminar las poblaciones bacterianas perjudiciales podría ser una estrategia, pero los resultados a lo largo de la historia no han sido prometedores. El uso de antibióticos en humanos durante los primeros seis meses de vida está asociado con la obesidad infantil (105). Se observaron resultados similares en ratones en los que una dosis subterapéutica de antibióticos aumentó la adiposidad abdominal (106). Por lo tanto, la terapia antimicrobiana actualmente no constituye una herramienta útil para la prevención de la enfermedad cardiovascular.

1.7.4 Inhibidores de la vía TMA-TMAO

El descubrimiento de la vía TMAO, sus numerosos vínculos clínicos con resultados adversos en ECV y sus efectos adversos en los fenotipos cardiometabólicos del huésped, ha planteado la posibilidad de dirigirse selectivamente a las enzimas sintéticas microbianas responsables de la generación de TMA como una posible estrategia

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

terapéutica. Recientemente se ha desarrollado un fármaco para la inhibición de la actividad microbiana de la colina TMA liasa (87).

Este estudio liderado por Wang et al (107) utilizó un análogo estructural de colina, 1,3 dimetilbutanol (DMB), que inhibió la generación microbiana de TMA y demostró una reducción de los niveles plasmáticos de TMA y TMAO en ratones con una dieta rica en colina o carnitina, así como la inhibición de la formación de células espumosas de macrófagos inducida por la dieta como el desarrollo de aterosclerosis de la raíz aórtica. A pesar de ser estudios experimentales, el conocimiento de nuevas vías metabólicas aporta la posibilidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para la reducción de la enfermedad cardiovascular.

1.8 Intervenciones para la regulación de la función mitocondrial

La relación entre el estrés oxidativo y la ECV se ha hecho susceptible de un gran interés científico. Múltiples estudios han explorado la utilidad de mejorar la función mitocondrial en dichos pacientes. A pesar de que se trata de una ciencia experimental y exploratoria existe evidencia del beneficio de ciertas terapias respecto a la reducción de la enfermedad cardiovascular. A continuación, se exponen las principales estrategias terapéuticas que existen actualmente en la literatura.

1.8.1 Antioxidantes

La evidencia de la acción de las ROS elevadas, el estrés oxidativo y la enfermedad cardíaca, se han convertido en un objetivo atractivo para la terapéutica, con el objetivo de muchas estrategias basadas en medicamentos para aumentar la capacidad antioxidante celular y mejorar la desintoxicación de ROS. Varios estudios han demostrado algunos efectos beneficiosos de antioxidantes, como la vitamina C, la vitamina E y la N-acetilcisteína (NAC), en el tratamiento de enfermedades

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

cardiovasculares.

NAC es un antioxidante que contiene tiol que tiene la capacidad para regenerar reservas de antioxidantes intracelulares. En el ensayo NACIAM (NAC in Acute Myocardial Infarction), que evaluó el uso de dosis altas de NAC en combinación con dosis bajas de nitroglicerina en pacientes con infarto de miocardio con elevación del segmento ST con intervención coronaria percutánea, mostró que el tratamiento combinado de NAC y nitroglicerina podría reducir significativamente el tamaño del infarto y aumentar la recuperación del miocardio (109). Un ensayo aleatorizado que analizó el impacto de la vitamina C, la vitamina E y el β-caroteno en 8171 mujeres con alto riesgo de enfermedad cardiovascular (con antecedentes de enfermedad cardiovascular o que presentaban al menos tres factores de riesgo), el tratamiento con estos suplementos no tuvo efecto en la prevención de la futura aparición de enfermedades cardiovasculares (108). Si bien el éxito de estos ensayos clínicos preliminares con un número limitado de pacientes es alentador, se necesitan ensayos clínicos multicéntricos más grandes para determinar los efectos beneficiosos de dichos tratamientos.

1.8.2 Terapias antioxidantes dirigidas a las mitocondrias

A la luz del éxito limitado de los antioxidantes en los últimos años se ha realizado un esfuerzo considerable hacia el desarrollo de antioxidantes dirigidos a las mitocondrias como agentes farmacológicos para mejorar la enfermedad. Entre ellos se encuentran MitoTEMPO, la mitoquinona (mitoQ) y SS-31/MPT-131.

MitoTEMPO es un mimético de SOD dirigido a las mitocondrias que desintoxica el superóxido mediante ciclos entre sus formas de nitróxido y oxoamonio, así como oxidando el hierro ferroso para limitar la formación de radicales libres. Se ha demostrado en animales la reducción de la producción de ROS en los compartimentos mitocondrial y citosólico en miocitos defectuosos (100).

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

MitoQ (mitoquinona) es una ubiquinona que se reduce a ubiquinol en la matriz mitocondrial, funcionando como transportador de electrones. In vivo, las ratas a las que se les administró mitoQ mostraron una reducción del daño mitocondrial, la liberación de citocromo C, la activación de la caspasa 3 y la muerte de cardiomiocitos (111).

SS-31 y su sal de acetato MTP-131 son péptidos antioxidantes dirigidos a las mitocondrias con capacidad de acumularse en la membrana interna mitocondrial. SS-31 se une a la cardiolipina modulando la interacción de esta con el citocromo C. La unión entre la cardiolipina y el citocromo C facilita y promueve la actividad de la peroxidasas reduciendo las ROS. SS-31 actúa uniéndose a la cardiolipina e interrumpiendo la interacción cardiolipina-citocromo C, promoviendo así la función del citocromo C como transportador de electrones de la cadena. Se ha demostrado que SS-31 reduce la extensión del daño microvascular en un modelo en conejos al reducir la hipertrofia cardíaca, la fibrosis y mejorar la función cardíaca (112).

Para concluir, la literatura actual, como se ha mencionado anteriormente, refleja la necesidad de estudio de nuevas vías metabólicas implicadas en la ECV para conocer mejor la etiopatogenia de esta enfermedad. El estudio de los metabolitos implicados en la disfunción de la microbiota gastrointestinal y mitocondrial es necesario para conocer mejor cual es la implicación de su disfunción en la génesis de la enfermedad aterosclerótica. El análisis de estos metabolitos como biomarcadores predictores de mayor riesgo cardiovascular y la posible implicación en nuevas armas terapéuticas generan un gran interés en el estudio de la metabolómica y por tanto es necesario ampliar el conocimiento en dicha desregulación.

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

2.HIPÓTESIS

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

2.1 Hipótesis fundamental

La alteración de las concentraciones plasmáticas de los metabolitos derivados de la flora gastrointestinal (TMAO, TMA, Colina, Betaina, Dimethilglicina y L-carnitina) y del ciclo metabólico mitocondrial del ácido tricarboxílico (Succinato, Fumarato, Malato, Citrato, Aconitato, Isocitrato, ácido α-Ketoglutárico y d/l-2-Hidroxiglutarato) en pacientes ingresados por síndrome coronario agudo favorece la identificación de sujetos con mayor riesgo de eventos cardiovasculares mayores o *major adverse cardiovascular events* (MACE) un seguimiento a largo plazo.

2.2 Hipótesis secundarias

La función renal modifica las concentraciones plasmáticas de los metabolitos derivados de la flora gastrointestinal (TMAO, TMA, Colina, Betaina, Dimethilglicina y L-carnitina) y del ciclo metabólico mitocondrial del ácido tricarboxílico (Succinato, Fumarato, Malato, Citrato, Aconitato, Isocitrato, ácido α-Ketoglutárico y d/l-2-Hidroxiglutarato) en pacientes ingresados por síndrome coronario agudo condicionando así su pronóstico.

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

3. OBJETIVOS

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

3.1 Objetivos principales

1. Revisar sistemáticamente la bibliografía sobre la asociación de los niveles circulantes de metabolitos microbianos con la enfermedad cardiovascular.
2. Analizar la capacidad de las alteraciones metabólicas de la flora gastrointestinal (TMAO, TMA, Colina, Betaina, Dimethilglicina y L-carnitina) para pronosticar nuevos eventos cardiovasculares adversos a largo plazo en pacientes que ingresan por un síndrome coronario agudo.
3. Analizar la capacidad de las alteraciones metabólicas del ciclo metabólico mitocondrial del ácido tricarboxílico (Succinato, Fumarato, Malato, Citrato, Aconitato, Isocitrato, ácido α-Ketoglutárico y d/l-2-Hidroxiglutarato) para pronosticar nuevos eventos cardiovasculares adversos a largo plazo en pacientes que ingresan por un síndrome coronario agudo.
4. Analizar la influencia de la función renal sobre la capacidad predictiva de las alteraciones metabólicas de la flora intestinal y del ciclo metabólico mitocondrial en los eventos cardiovasculares adversos a largo plazo en pacientes que ingresan por un síndrome coronario agudo.

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

4. MATERIAL Y MÉTODOS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

4.1 Población y metodología del estudio

4.1.1 Revisión sistemática

El primer trabajo se basa en una revisión sistemática de la literatura actual en referencia a los metabolitos derivados de la flora intestinal publicados hasta el 9 de junio de 2022. Se incluyeron en la búsqueda bibliográfica estudios observacionales prospectivos (incluidos estudios de cohortes y casos y controles anidados); estudios publicados en inglés y no incluidos en revisiones sistemáticas previas realizadas sobre este tema antes; estudios que incluyen TMAO, ácidos biliares secundarios, SCFA, BCAA, triptófano y derivados del indol como exposiciones principales; metabolitos medidos en suero o plasma (se excluyeron los perfiles metabolómicos realizados en muestras de orina; perfil de metabolitos realizado al inicio del estudio en el contexto de un estudio prospectivo; estudios que incluyeron los siguientes end-points: enfermedad arterial coronaria /enfermedad coronaria, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, fibrilación auricular , insuficiencia cardíaca, enfermedad arterial periférica, evento cardiovascular adverso mayor (MACE) y/o muerte (ya sea cardiovascular o por todas las causas); estudios que analizaban una medida de asociación (p.ej., odds ratio [OR], Hazard ratio [HR], riesgo relativo [RR] con sus correspondientes intervalos de confianza del 95%).
Se excluyeron los estudios si eran transversales, de intervención, informes de casos, comentarios, cartas, editoriales, estudios duplicados, revisiones narrativas o sistemáticas y protocolos de estudio. Cuando había más de un estudio de la misma cohorte, se seleccionó la publicación con mayor seguimiento o más casos incidentes.

4.1.2 Población de estudio

Los siguientes dos trabajos se caracterizan por ser estudios observacionales y retrospectivos que incluyeron de forma consecutiva pacientes ingresados en el Hospital Universitario Joan XXIII, Tarragona, España, por síndrome coronario agudo y a quienes

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

se les realizó una coronariografía entre enero 2011 y mayo de 2013 a los que se les realizó un seguimiento hasta 2022. Se siguieron las guías de la Sociedad Europea de Cardiología para definir el SCA de la siguiente manera: pacientes con infarto de miocardio con elevación del segmento ST (STEMI), infarto de miocardio sin elevación del segmento ST (NSTEMI) y angina inestable. El infarto agudo de miocardio (STEMI o NSTEMI) se diagnosticó de acuerdo con la definición universal actual de infarto de miocardio (113). La angina inestable se definió como la presencia de síntomas de SCA en reposo o con mínimos esfuerzos en ausencia de necrosis de cardiomiocitos (114). Se excluyeron de este estudio los pacientes que sufrieron un IM diferente al tipo 1 y aquellos con residencia en el extranjero. MACE se definió como la combinación de infarto de miocardio, hospitalización por insuficiencia cardíaca y mortalidad por todas las causas.

Durante el ingreso hospitalario se recogieron los datos demográficos, los factores de riesgo cardiovascular, los antecedentes médicos, el tratamiento ambulatorio, los síntomas previos y los hallazgos clínicos en el ingreso (exploración física, datos analíticos, características de la anatomía coronaria, fracción de eyección del ventrículo izquierdo y diagnóstico al alta hospitalaria). El filtrado glomerular estimado se calculó con el valor al ingreso de la creatinina sérica utilizando la fórmula Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration.

4.2 Determinación de los metabolitos implicados en las diferentes vías metabólicas.

Se recogieron muestras de plasma en tubos EDTA de pacientes durante la angiografía coronaria. Estas muestras fueron enviadas desde el Hospital Universitario Joan XXIII al Biobanco del Instituto de Investigación Sanitaria Pere Virgili, registrado en la Red Nacional de Biobancos, para su posterior procesamiento y almacenamiento. Después de la centrifugación, las alícuotas de plasma se almacenaron a -80 °C hasta su análisis.

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

4.2.1 Determinación de TMAO, TMA, colina, betaína, dimetilglicina y L-carnitina.

Estos metabolitos se cuantificaron mediante el método de dilución de isótopos estables utilizando cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem. Las muestras (50 µl de plasma) se mezclaron con 10 µl de patrón interno, 75 µl de 50 mM de bromoacetato de tert-butilo y 10 µl de hidróxido de amonio al 70 %. Posteriormente, se agitaron durante 1 min y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. Se añadió 50 µl de ácido fórmico al 1%. Y se centrifugaron nuevamente durante 5 min a 15.000 rpm y 4 ºC. Finalmente, se cromatografiaron en un ACQUITY UPLC BEH HILIC, 1,7 µm 2,1 × 100 mm (Waters, Milford, MA, EE. UU.) y en combinación con un UHPLC 1290 Infinity II (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.). El gradiente consistió en un gradiente de 0% A por 1 min, a 10% A por 4 min, a 55% A por 5 min y 55% A por 2 min. La fase móvil A estuvo compuesta por 10% de acetonitrilo y 90% de agua con 10 mmol/L de formiato de amonio y 0,125% de ácido fórmico; la fase móvil B fue 90% acetonitrilo y 10% agua con 10 mmol/L de formiato amónico y 0,125% ácido fórmico. La velocidad de flujo se mantuvo constante a 0,5 ml/min y el controlador de columna se ajustó a temperatura ambiente durante la secuencia. Para el análisis espectrométrico de masas se utilizó la serie Agilent QqQ/MS 6470 con sonda de ionización por electropulverización que funciona en modo de iones positivos. Las condiciones de la fuente se establecieron en 50 psi para el gas del nebulizador, 300 ◦C para la temperatura del gas, 11 L/min para el flujo de gas, 400 ◦C para la temperatura del gas envolvente, 12 L/min para el flujo del gas envolvente, 2500 V para el voltaje del capilar y 500 V para el voltaje de la boquilla. La garantía de calidad del ensayo se supervisó mediante análisis de rutina de plasma de control de calidad agrupado.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez
Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

4.2.2 Determinación de citrato, acónito, isocitrato, succinato, malato, fumarato, α-cetoglutarato y d/l-2-hidroxiglutarato.

Se cuantificaron mediante el método de dilución de isótopos estables utilizando cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem. Para la preparación de la muestra, se mezclaron 100 µl de plasma con 500 µl de metanol que contenía la mezcla de patrones internos. Las muestras se agitaron y centrifugaron durante 10 minutos a 15.000 rpm y 4ºC. Los sobrenadantes se evaporaron en un concentrador SpeedVac a 45 ºC. Las muestras se reconstituyeron con 100 µl de ácido fórmico al 0,9 % y se separaron en dos viales de vidrio para su análisis. En el caso de la determinación de fumarato, α-cetoglutarato y 2-hidroxiglutarato, las muestras se diluyeron con acetonitrilo. Para separar citrato, acónito, isocitrato, succinato y malato, las muestras se cromatografiaron en un Atlantis Premier BEH C18 AX de 1,7 µm, 2,1 mm x 100 mm (Waters, Milford, MA, EE. UU.) y en unión con un UHPLC 1290 Infinity II (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.). El gradiente consistió en 100 % A durante 1,4 minutos, 40 % A y 0 % B a los 1,5 minutos, 17 % A y 23 % B a las 3,51 minutos, al 0 % A y al 40 % B a los 4,00 minutos, se mantuvo al 0 % A y al 40 % B durante 0,0,3 minutos, al 5 % A y al 95 % B a los 4,4 minutos y al 5 % A y al 95 % B durante 0,1 minutos. La fase móvil A estaba compuesta por ácido fórmico al 0,9 % en agua, la fase móvil B era ácido fórmico al 0,9 % en acetonitrilo y la fase móvil C era formiato de amonio 50 mM y ácido fórmico al 0,9 % en agua. El caudal se mantuvo constante a 0,35 ml/min y el controlador de columna se fijó a 30 ºC durante la secuencia. Para separar fumarato, α-cetoglutarato y 2-hidroxiglutarato, las muestras se cromatografiaron en un ACQUITY UPLC BEH Amide, 1,7 µm, 2,1 mm x 150 mm (Waters, Milford, MA, EE. UU.) y en unión con un UHPLC 1290 Infinity II (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.). El gradiente consistió en 80 % de A durante 2 minutos, 50 % de A a los 7 minutos, 80 % de A a los 7,1 minutos y 80 % de A durante 2,9 minutos. La fase móvil A estaba compuesta por acetato de amonio 10 mM e hidróxido de amonio al 0,05%; la fase móvil B era acetonitrilo. El caudal se mantuvo constante a 0,5 ml/min y el controlador de columna

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

se fijó a 40 ºC durante la secuencia. Para el análisis espectrométrico de masas se utilizó la serie Agilent QqQ/MS 6490 con una sonda de ionización por electropulverización que funciona en modo de iones negativos. Las condiciones de la fuente se establecieron en 55 psi para el gas del nebulizador, 120 ºC para la temperatura del gas, 20 L/min para el flujo de gas, 350 ºC para la temperatura del gas envolvente, 11 L/min para el flujo del gas envolvente, 1100 V para el capilar voltaje y 500 V para el voltaje de la boquilla. La determinación cuantitativa se realizó utilizando el modo de monitoreo de reacciones múltiples. La garantía de calidad del ensayo se supervisó mediante análisis de rutina de plasma de control de calidad agrupado.

4.3 Variable de resultado principal y seguimiento.

En el primer estudio se realizó una búsqueda bibliográfica utilizando las bases de datos Scopus de MEDLINE-PubMed y Elsevier desde su inicio hasta el 9 de junio de 2022. Para las búsquedas en la base de datos, los términos relacionados con TMAO, ácidos biliares, SCFA, BCAA, triptófano y derivados del indol se combinaron con términos relacionados con las enfermedades cardiovasculares. Tres revisores independientes realizaron la selección de los estudios y la extracción de datos. En caso de desacuerdos entre los tres autores se resolvieron consultando a investigadores principales. Los datos extraídos de cada estudio incluyeron el apellido del primer autor, año de publicación, país donde se realizó el estudio, título, revista, diseño del estudio, tamaño de la muestra, duración del seguimiento, características de los participantes, método de ensayo, número, tipo e identidad de los metabolitos investigados, muestra biológica (suero/plasma), estado de ayuno, enfoque estadístico, covariables incluidas en el modelo totalmente ajustado y hallazgos principales. Los mismos investigadores evaluaron de forma independiente la calidad metodológica de cada estudio mediante la escala de Newcastle-Ottawa (NOS) para estudios de cohortes y de casos y controles anidados (115). Esta herramienta de evaluación consta de ocho ítems y divide los estudios con una escala de puntajes de 0 a

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

9 de baja a alta calidad, respectivamente. La puntuación máxima es 9, y una puntuación ≥ 6 indica alta calidad metodológica.

En los dos estudios retrospectivos se realizó un seguimiento a largo plazo con un máximo de 10 años. La mortalidad y los reingresos hospitalarios se identificaron mediante la revisión de los registros médicos electrónicos o bien mediante contacto telefónico. La variable principal a estudio fue la mortalidad por cualquier causa. También se analizó un combinado de eventos adversos cardiovasculares mayores (MACCE; por sus siglas en inglés de major adverse cardiovascular and cerebrovascular events) formado por infarto de miocardio, hospitalización por insuficiencia cardíaca y mortalidad por todas las causas.

4.4 Análisis estadístico

El primer estudio dado que no se realizó metaanálisis posterior no requirió de análisis estadístico. Los siguientes dos estudios se describen a continuación:

4.4.1 Segundo estudio

Las características basales de los pacientes se describen como media ± desviación estándar (DE) o mediana (rango intercuartílico) para variables cuantitativas y porcentajes para variables categóricas. Se aplicó una transformación logarítmica natural en las concentraciones de metabolitos para aproximarse a una distribución normal.
Utilizamos modelos de riesgos proporcionales de Cox brutos y 2 multivariables para el análisis de tiempo hasta el evento para determinar los índices de riesgo (HR) y los intervalos de confianza (IC) del 95% para MACE. Verificamos la suposición de riesgos proporcionales al examinar los residuales de Schoenfeld y encontramos que la suposición no fue violada. El primer modelo de regresión de Cox con ajuste multivariable (modelo multivariable 1) se ajustó de la siguiente manera: el modelo multivariable 1 se

ajustó por edad, sexo, IMC (kg/m^2), tabaquismo (nunca, actual o anterior), hipertensión (sí o no).), dislipemia (sí o no), DT2 (sí o no), angina inestable (sí o no), infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST (sí o no), infarto agudo de miocardio sin elevación del segmento ST (sí o no)), medicación con estatinas (sí o no), betabloqueantes (sí o no), medicación antidiabética oral (sí o no), medicación con insulina (sí o no), diuréticos (sí o no) y aspirina (sí o no) . El modelo multivariable 1 se ajustó adicionalmente para eGFR (modelo multivariable 2) para evaluar más a fondo el efecto de la función renal. Se realizaron análisis de correlación de Spearman para investigar si había una relación entre los niveles circulantes de TMAO, TMA, colina, betaína, L-carnitina y eGFR. Las pruebas de no linealidad incluyeron la prueba de razón de verosimilitud, comparando el modelo con solo el término lineal con el modelo con los términos lineales y spline cúbicos. Estos análisis se realizaron utilizando Stata 14.1 (Stata Corp.), con un α de dos colas de 0,05.

Llevamos a cabo un análisis de mediación para explorar la posibilidad de que la asociación de las concentraciones de metabolitos plasmáticos con la incidencia de MACE podría estar mediada por eGFR. El análisis de mediación bajo el marco contrafáctico tiene ventajas sobre el análisis de mediación convencional, ya que permite la incorporación de interacciones exposición-mediador, ajusta los factores de confusión intermedios medidos y trata con relaciones no lineales. Al realizar este análisis utilizando el paquete R "medflex", el efecto total de los metabolitos sobre el riesgo de MACE se puede descomponer en un efecto directo natural de los metabolitos sobre el riesgo de MACE y un efecto indirecto natural de los metabolitos explicado por el efecto del supuesto mediadores, en nuestro caso el eGFR. También tomamos en cuenta la posible confusión por las covariables incluidas en el modelo 1 de regresión multivariable de Cox. Se empleó la técnica de arranque con 1000 repeticiones para derivar los intervalos de confianza del 95 %. El análisis de mediación se realizó utilizando modelos lineales generalizados basados en Poisson al dividir el tiempo de seguimiento cada vez que se observó un evento [función survSplit en el paquete de supervivencia] de tal manera que

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

cada intervalo de tiempo contiene solo un evento y luego estimamos el efectos de los parámetros del modelo ya que los modelos de regresión de Cox actualmente no están implementados en "medflex". Se ha sugerido que se podría obtener un cociente de riesgos instantáneos similar al del modelo de regresión de Cox ajustando un modelo de Poisson a los datos de supervivencia. Para aproximarnos más a los resultados de Cox, agregamos un término de tiempo al modelo de Poisson. La proporción mediada se calculó como índices de tasas de incidentes (TIR) logarítmicos indirectos naturales divididos por el log-TIR del efecto total. Este análisis se realizó utilizando R versión 4.2.0 (R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria).

4.4.2 Tercer estudio

Las características basales de los participantes del estudio se describen como medias y desviaciones estándar (DE) o medianas y rangos intercuartílicos para variables cuantitativas y porcentajes para variables categóricas. Es importante destacar que nuestro estudio no tenía *missings* y todos los datos estaban disponibles para todos los participantes incluidos en el análisis. Se realizó una transformación logarítmica natural para aproximar una distribución normal de las concentraciones de metabolitos. En los siguientes análisis, los metabolitos se analizaron como variables continuas [incremento de 1 desviación estándar (SD) (1-SD) en sus niveles transformados en ln] y mediante el uso de terciles.

Se utilizaron un modelo crudo y dos análisis multivariables para el análisis de tiempo hasta el evento para determinar los índices de riesgo (HR). Los intervalos de confianza (IC) se estimaron del 95% para MACE y se estudió la mortalidad por todas las causas. Verificamos el supuesto de proporcionalidad de la regresión de Cox al examinar los residuos de Schoenfeld y encontramos que no se violó el supuesto de riesgos proporcionales.

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

El primer modelo de regresión multivariable de Cox (modelo multivariable 1) se ajustó por edad, sexo, IMC (kg/m^2), tabaquismo (nunca, actual o anterior), hipertensión (sí o no), dislipemia (sí o no), DT2 (sí o no), angina inestable (sí o no), infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST (sí o no) , infarto agudo de miocardio sin elevación del segmento ST (sí o no), medicación con estatinas (sí o no), bloqueadores beta (sí o no), medicación antidiabética oral (sí o no), medicación con insulina (sí o no), diuréticos (sí o no), y aspirina (sí o no). El segundo modelo multivariable (modelo multivariable 2) se ajustó adicionalmente para eGFR para evaluar más a fondo el efecto de la función renal. También examinamos las asociaciones de eGFR con MACE y mortalidad por todas las causas ajustando el modelo multivariable 1 y ajustando aún más este modelo con cada metabolito del ciclo del TCA. Para tener en cuenta las pruebas múltiples, ajustamos los valores de P de los modelos crudo y multivariable con el uso del procedimiento Benjamini-Hochberg. Se realizaron análisis de correlación de Spearman para investigar si había una relación entre los niveles circulantes de los metabolitos del ciclo TCA y la eGFR. Para probar la solidez de nuestros resultados relacionados con el sobreajuste del modelo, se utilizó el modelo de regresión de supervivencia de Weibull. Se utilizaron splines cúbicos de Hermite para ajustar los modelos de regresión de Cox a fin de examinar asociaciones no paramétricas. Las pruebas de no linealidad implicaron realizar una prueba de razón de verosimilitud para comparar el modelo con solo el término lineal con el modelo con los términos spline lineales y cúbicos. Estos análisis se realizaron con Stata 14.1 (Stata Corp.), a un α de dos colas de 0,05.

El papel mediador de la TFGe en la relación entre los metabolitos plasmáticos y los MACE o la mortalidad por todas las causas se probó en un marco hipotético. Al realizar este análisis utilizando el paquete R “medflex”, el efecto total de los metabolitos sobre el riesgo de MACE se puede descomponer en un efecto directo natural de los metabolitos sobre el riesgo de MACE o mortalidad y un efecto indirecto natural de los metabolitos explicado por el efecto de los mediadores putativos, en nuestro caso el eGFR. Los intervalos de confianza del 95 % se obtuvieron utilizando bootstrapping con 1000

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

repeticiones. El análisis de mediación se realizó utilizando modelos lineales generalizados basados en Poisson al dividir el tiempo de seguimiento cada vez que se observó un evento [función survSplit() en el paquete de supervivencia] de tal manera que cada intervalo de tiempo contiene solo un evento y luego estimamos el efectos de los parámetros del modelo ya que los modelos de regresión de Cox actualmente no están implementados en “medflex”. Para aproximarnos más a los resultados de Cox, agregamos un término de tiempo al modelo de Poisson . Incluimos todas las variables del modelo multivariable 1 como covariables para ajustar el efecto mediador de la eGFR en las asociaciones entre los metabolitos del ciclo de TCA y los resultados clínicos. La proporción mediada se calculó como índices de tasas de incidentes (TIR) logarítmicos indirectos naturales divididos por el log-TIR del efecto total. Este análisis se realizó utilizando R versión 4.2.0 (R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria).

4.5 Declaración de Ética

Los estudios fueron revisados y aprobados por el comité ético de instituto de investigación Pere Virgili asociado al Hospital Universitario Joan XXIII. Los pacientes/participantes dieron su consentimiento informado por escrito para participar en este estudio.

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

5. RESULTADOS

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

5.1 Primer estudio

Gut microbiota-derived metabolites and cardiovascular disease risk: a systematic review of prospective cohort studies.

Raul Sanchez-Gimenez, Wahiba Ahmed-Khodja, Yesica Molina, Oscar M. Peiró, Gil Bonet, Anna Carrasquer, George A. Fragkiadakis, Mònica Bulló, Alfredo Bardaji and Christopher Papandreou. Nutrients 2022, 14, 2654.

Resumen de resultados

Esta revisión sistemática resumió la evidencia hasta el momento de la asociación entre los niveles circulantes de metabolitos relacionados con la microbiota gastrointestinal y el riesgo de ECV. Se obtuvo evidencia de la asociación entre los niveles de TMAO y el riesgo de eventos CV 116,117,118) aunque no todos los estudios fueron prospectivos (119,120,121). Sin embargo, no se obtuvieron resultados consistentes para los ácidos biliares en relación a la aparición de eventos cardiovasculares (122,123) ni en relación a la mortalidad por enfermedades cardiovasculares o mortalidad por todas las causas (124,122,125). Con respecto a los BCAA (126,127), su relación con los eventos CV fue sólida entre los estudios, a pesar que un estudio mostró una asociación negativa entre el triptófano y la mortalidad (128).

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL
Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez
Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

nutrients

MDPI

Systematic Review

Gut Microbiota-Derived Metabolites and Cardiovascular Disease Risk: A Systematic Review of Prospective Cohort Studies

Raul Sanchez-Gimenez [1,2,3], Wahiba Ahmed-Khodja [2,4], Yesica Molina [2], Oscar M. Peiró [1,2,3], Gil Bonet [1,2,3], Anna Carrasquer [1,2,3], George A. Fragkiadakis [5], Mònica Bulló [2,4,6,*], Alfredo Bardaji [1,2,3,†] and Christopher Papandreou [2,*,†]

1 Department of Cardiology, Joan XXIII University Hospital, 43005 Tarragona, Spain; raul.sagi@hotmail.com (R.S.-G.); opi220290@gmail.com (O.M.P.); gil.bonet.p@gmail.com (G.B.); carrasquer1987@gmail.com (A.C.); abardaji.hj23.ics@gencat.cat (A.B.)
2 Pere Virgili Health Research Institute (IISPV), 43005 Reus, Spain; wahiba.ahmed-khodja@urv.cat (W.A.-K.); ymolinac8@gmail.com (Y.M.)
3 Department of Medicine and Surgery, Rovira i Virgili University, 43003 Tarragona, Spain
4 Department of Biochemistry and Biotechnology, Rovira i Virgili University, 43201 Reus, Spain
5 Department of Nutrition and Dietetics Sciences, School of Health Sciences, Hellenic Mediterranean University, 72300 Siteia, Greece; fragkiadakis@hmu.gr
6 CIBER Physiology of Obesity and Nutrition (CIBEROBN), Carlos III Health Institute, 28029 Madrid, Spain
* Correspondence: monica.bullo@urv.cat (M.B.); papchris10@gmail.com (C.P.); Tel.: +34-619-366-353 (C.P.)
† These authors contributed equally to this work.

Abstract: Gut microbiota-derived metabolites have recently attracted considerable attention due to their role in host-microbial crosstalk and their link with cardiovascular health. The MEDLINE-PubMed and Elsevier's Scopus databases were searched up to June 2022 for studies evaluating the association of baseline circulating levels of trimethylamine N-oxide (TMAO), secondary bile acids, short-chain fatty acids (SCFAs), branched-chain amino acids (BCAAs), tryptophan and indole derivatives, with risk of cardiovascular disease (CVD). A total of twenty-one studies were included in the systematic review after evaluating 1210 non-duplicate records. There were nineteen of the twenty-one studies that were cohort studies and two studies had a nested case–control design. All of the included studies were of high quality according to the "Newcastle–Ottawa Scale". TMAO was positively associated with adverse cardiovascular events and CVD/all-cause mortality in some, but not all of the included studies. Bile acids were associated with atrial fibrillation and CVD/all-cause mortality, but not with CVD. Positive associations were found between BCAAs and CVD, and between indole derivatives and major adverse cardiovascular events, while a negative association was reported between tryptophan and all-cause mortality. No studies examining the relationship between SCFAs and CVD risk were identified. Evidence from prospective studies included in the systematic review supports a role of microbial metabolites in CVD.

Keywords: gut microbiota; metabolites; cardiovascular disease; mortality

check for updates

Citation: Sanchez-Gimenez, R.; Ahmed-Khodja, W.; Molina, Y.; Peiró, O.M.; Bonet, G.; Carrasquer, A.; Fragkiadakis, G.A.; Bulló, M.; Bardaji, A.; Papandreou, C. Gut Microbiota-Derived Metabolites and Cardiovascular Disease Risk: A Systematic Review of Prospective Cohort Studies. *Nutrients* **2022**, *14*, 2654. https://doi.org/10.3390/nu14132654

Academic Editor: Arrigo Cicero

Received: 16 May 2022
Accepted: 23 June 2022
Published: 27 June 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Cardiovascular disease (CVD) remains a major public health issue [1]. The progress in its prevention and management depends on a better understanding of the mechanisms underlying disease development. Identification of circulating biomarkers with prognostic value may help to both identify pathophysiological processes relevant to CVD development and improve preventive cardiovascular risk reduction efforts [2]. Recent development of omics technologies has improved biomarker discovery, leading to the identification of a number of disease-associated circulating molecules [3]. Metabolomics has considerably

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL
Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez
Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

increased interest in metabolism across cardiovascular research [4] and identifying metabolites associated with disease risk can further highlight the critical metabolic pathways in CVD etiology.

Gut microbiota-derived metabolites like trimethylamine N-oxide (TMAO), secondary bile acids, short-chain fatty acids (SCFAs), branched-chain amino acids (BCAAs), tryptophan and indole derivatives have recently attracted considerable attention due to their role in host-microbial crosstalk [5,6] and their link with health. Numerous observational studies have found associations between circulating microbial metabolites and CVD risk [7]. Since the discovery of a relationship between the gut microbiota-dependent metabolite TMAO and CVD, in 2011 [8], nine systematic reviews of prospective studies published up to 2020, suggest a strong association between elevated circulating levels of TMAO with risk of several CV outcomes [9–17]. Since then, the number of prospective TMAO profiling studies on CVD risk has substantially increased [18–27]. However, less evidence exists on other microbial-related metabolites in relation to incident CVD. In this sense, two previous systematic reviews of prospective studies on BCAAs, found higher levels associated with increased risk of CVD [9] and ischemic stroke [16], whereas tryptophan levels were inversely associated with CVD risk [9]. Regarding secondary bile acids, SCFAs and indole derivatives, evidence from some, but not all, prospective studies suggest that these metabolites are associated with CV outcomes [9,28–32], and to our knowledge, no systematic review has been conducted on these metabolites yet.

Gut microbiota-derived metabolites are produced from bacterial metabolism of dietary substrates, modification of host molecules, such as bile acids, or directly from bacteria [33]. Summarizing the available evidence on the role of these metabolites on CVD risk could assist in understanding better the metabolic perturbations associated with CVD development. Therefore, we conducted a systematic review for the association of circulating levels of microbial metabolites with CVD incidence.

2. Materials and Methods

This systematic review was conducted following the Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses (PRISMA) guidelines (http://www.prisma-statement.org/ (accessed on 2 February 2022) [34,35] and the review protocol was registered with PROSPERO (PROSPERO 2022: CRD42021291322).

2.1. Eligibility Criteria

We considered: (1) prospective observational studies (including cohort, case-cohort or nested case-control) conducted in participants at least 18 years of age; (2) studies published in English and not included in previous systematic reviews performed in this topic before [9,10,12,13,15–17,36]; (3) studies including TMAO, secondary bile acids, SCFAs, BCAAs, tryptophan and indole derivatives as main exposures; (4) metabolites measured in serum or plasma (we excluded metabolomics profiling conducted in urine samples); (5) metabolite profiling conducted at baseline in the context of a prospective study; (6) studies that included the following end-points: coronary artery disease (CAD)/coronary heart disease, myocardial infarction (MI), stroke, atrial fibrillation (AF), heart failure (HF), peripheral artery disease (PAD), major adverse cardiovascular event (MACE) and/or death (either cardiovascular or all-cause mortality); (7) studies that reported a measure of association (e.g., odds ratio [OR], hazard ratio [HR], risk ratio [RR] with their corresponding 95% confidence intervals [CI]).

Studies were excluded if they were cross-sectional, interventional, case reports, comments, letters, editorials, duplicate studies, narrative or systematic reviews and study protocols. When there was more than one study from the same cohort, the publication with the longer follow-up or more incident cases was selected.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez
Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

2.2. Literature Search

A literature search was carried out using the MEDLINE-PubMed and Elsevier's Scopus databases from inception through 9 June 2022. For the database searches, terms related to TMAO, bile acids, SCFAs, BCAAs, tryptophan and indole derivatives were combined with terms related to CVDs (Table S1).

2.3. Screening and Data Extraction

Screening of eligible studies and data extraction were performed independently by three independent reviewers (R.S.G., W.A-K. and Y.M.), and disagreement between the three authors was resolved by consulting senior researchers (C.P. and A.B.).

The data extracted from each eligible study included the following: first author's surname, year of publication, country where the study was conducted, title, journal, design of the study, sample size, duration of follow-up, characteristics of participants, assay method, number, type, and identity of metabolites investigated, biospecimen (serum/plasma), fasting status, statistical approach, covariates included in the fully adjusted model and major findings.

2.4. Quality Assessment

The same investigators (R.S.G., W.A-K., and Y.M.) independently assessed each study for methodological quality using the Newcastle–Ottawa Scale (NOS) for cohort and nested case-control studies [37]. This assessment tool consists of eight items, and divides the studies with a scale of scores of 0 to 9 from poor to high quality, respectively. The maximum score is 9, and a score of ≥ 6 indicates high methodological quality.

3. Results

3.1. Selection of Studies

Literature Search

The initial search yielded 1210 non-duplicate records which were screened and 1137 records were removed based on title and abstract, leaving 73 reports for full-text examination (Figure 1). We excluded 52 reports for reasons indicated in Figure 1 and finally 21 studies were deemed eligible for inclusion in the present systematic review. Of them, 19 included prospective cohorts [18–20,22,24–31,36,38–41], one study included one nested case-control study [23] and one study included two nested case–control studies [21]. All of the included studies were of high quality with a mean of 8.9 points in the Newcastle–Ottawa scale (range: 7–9) (Tables S2 and S3).

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL
Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez
Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

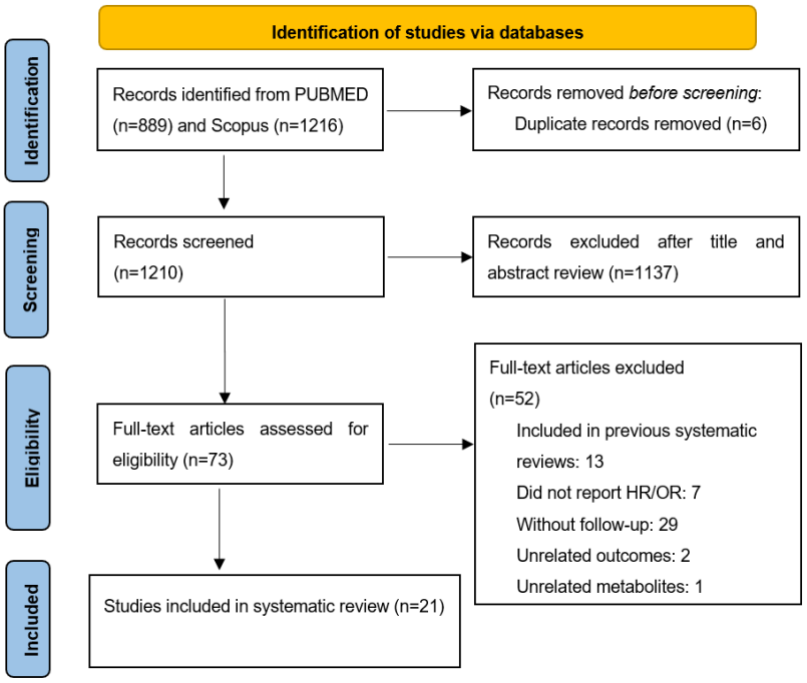

Figure 1. Flow diagram of studies assessed for eligibility per screening stage.

3.2. Study Characteristics

The main characteristics of the 21 selected articles [18–32,36,38–42] are summarized in Table 1. Most of them (n = 18) were published in the last five years (2022–2018), while none were published before 2015. A total of ten of the studies were conducted in the USA, seven in Europe, two in Taiwan and two in China. All studies used a cohort design except two that included a nested case–control design [21,23]. There was one article that included three cohorts [19] whereas two articles included two cohorts as the discovery and replication sample analyses [28,40]. The minimum and maximum follow-up was 1 month and 28 years, respectively, while in most of the studies the average follow-up was up to 10 years. In total, the studies included 58,691 participants and the number of cases in the single studies ranged from 32 to 4791. In 14 articles participants were free of CVD at baseline [18,21–24,27–32,36,39,40] but two of them were conducted in patients with type 2 diabetes (T2D) [18,22] and two studies in chronic kidney disease (CKD) patients [31,32]. On the other hand, in seven articles participants had at least one CVD condition [19,20,25,26,38,41,42]. The main outcome in most of the studies was all-cause and CVD mortality, followed by incident MACE, AF, HF, stroke, and additional CV outcomes. A total of six articles analyzed metabolites in serum [25,29–32,36] and the rest in plasma. In 13 articles blood sample was collected in fasting [21,24,26–32,36,38–40] and in five articles in non-fasting conditions [18,22,25,41,42], while in two articles the fasting status was not reported [19,20] and in one article participants provided blood samples in either fasting or non-fasting conditions [23]. In 20 studies, the analyses of metabolites were performed by using mass spectrometry (MS) coupled to different chromatography techniques, while in one study a nuclear magnetic resonance (NMR) platform was used [40].

The main characteristics of the 21 selected articles [18–32,36,38–42] are summarized in Table 1. Most of them (n = 18) were published in the last five years (2022–2018), while none were published before 2015. A total of ten of the studies were conducted in the USA, seven in Europe, two in Taiwan and two in China. All studies used a cohort design except two that included a nested case–control design [21,23]. There was one article that included three cohorts [19] whereas two articles included two cohorts as the discovery and replication sample analyses [28,40]. The minimum and maximum follow-up was 1 month and 28 years, respectively, while in most of the studies the average follow-up was up to 10 years. In total, the studies included 58,691 participants and the number of cases in the single studies ranged from 32 to 4791. In 14 articles participants were free of CVD at baseline [18,21–24,27–32,36,39,40] but two of them were conducted in patients with type 2 diabetes (T2D) [18,22] and two studies in chronic kidney disease (CKD) patients [31,32]. On the other hand, in seven articles participants had at least one CVD condition [19,20,25,26,38,41,42]. The main outcome in most of the studies was all-cause and CVD mortality, followed by incident MACE, AF, HF, stroke, and additional CV outcomes. A total of six articles analyzed metabolites in serum [25,29–32,36] and the rest in plasma. In 13 articles blood sample was collected in fasting [21,24,26–32,36,38–40] and in five articles in non-fasting conditions [18,22,25,41,42], while in two articles the fasting status was not reported [19,20] and in one article participants provided blood samples in either fasting or non-fasting conditions [23]. In 20 studies, the analyses of metabolites were performed by using mass spectrometry (MS) coupled to different chromatography techniques, while in one study a nuclear magnetic resonance (NMR) platform was used [40].

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

Table 1. Characteristics of the 21 studies included in the systematic review.

First Author	Year/Country	Title	Journal	Study Design	N, Follow-Up Time	Baseline Characteristics of Participants	Assay Method and Metabolite Targets	Biological Sample	Main Outcome	Statistical Analysis	Covariates in Fully Adjusted Model	Adjusted HR or OR (95% CI)
Amrein, M. [25]	2022/ Switzerland	Gut microbiota-dependent metabolite trimethylamine N-oxide (TMAO) and cardiovascular risk in patients with suspected functionally relevant coronary artery disease (fCAD)	Clin Res Cardiol	Cohort	1726 (223 deaths, 115 deaths due to CVD, 88 MI), 5 years	Patients with suspected functionally relevant CAD	LC-MS/MS; TMAO	Serum (non-fasting)	All-cause mortality, CVD mortality, MI	Cox regression	Age, sex, history of CAD, age, gender, BMI, smoking history, positive cardiovascular family history, hypertension, hypercholesterolemia, history of diabetes, history of stroke/TIA, history of CAD, previous MI, history of heart failure, cystatin-C	Per log2-transformed all-cause mortality HR 1.11 (95% CI 0.99–1.26), CVD mortality HR 1.19 (95% CI 1.01–1.40), MI HR 1.17 (95% CI 0.95–1.45)
Chen, Y.Y. [26]	2022/ China	TMAO as a novel predictor of major adverse vascular events and recurrence in patients with large artery atherosclerotic ischemic stroke	Clin Appl Thromb Hemost	Cohort	291 (number of major vascular event cases not indicated), 3 months	Patients with ischemic stroke	LC-MS/MS; TMAO	Plasma (fasting); anticoagulant not indicated	Major vascular event (transient ischemic attack, recurrent ischemic stroke, MI)	Cox regression	Age, sex, hypertension, T2D, smoking, creatinine	>median vs. <median HR 3.12 (95% CI 1.02–9.61)
Fretts, A.M. [27]	2022/ USA	Association of trimethylamine N-Oxide and metabolites with mortality in older adults	JAMA Network Open	Cohort	5333 (4791 total deaths), 13.2 years	20% of participants had CHD and 15% had T2D at baseline	LC-MS/MS; TMAO	Plasma (fasting); anticoagulant: EDTA	All-cause mortality	Cox regression	Age, sex, race, ethnicity, educational level, household income, smoking status, BMI, physical activity, treated hypertension, instrumental activities of daily living, self-reported health status, SBP, HDL-C, prevalent AF, prevalent CHD, history of MI, prevalent T2D, prevalent COPD, foods consumption	5th vs. 1st quintile all-cause mortality HR 1.30 (95% CI 1.17–1.44)

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez
Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

Table 1. *Cont.*

First Author	Year/Country	Title	Journal	Study Design	N, Follow-Up Time	Baseline Characteristics of Participants	Assay Method and Metabolite Targets	Biological Sample	Main Outcome	Statistical Analysis	Covariates in Fully Adjusted Model	Adjusted HR or OR (95% CI)
Liu, J. [23]	2021/ USA	Gut microbiota–derived metabolites and risk of coronary artery disease: a prospective study among US men and women	Am J Clin Nutr	Nested case—control	1216 (608 CAD), not indicated	Participants were free of diabetes, cardiovascular disease, and cancer	LC-MS/MS; TMAO	Plasma (fasting and non-fasting); anticoagulant: EDTA	CAD	Conditional logistic regression	Age, sex, month of sample collection, fasting status at time of collection, smoking status, alcohol intake, physical activity, BMI, menopause status, family history of MI, aspirin use, T2D, hypertension, dyslipidemia, foods consumption	3rd vs. 1st tertile OR 1.23 (95% CI 0.89–1.70)
Lee, Y. [24]	2021/ USA	Longitudinal plasma measures of trimethylamine N-Oxide and risk of atherosclerotic cardiovascular disease events in community-based older adults	J Am Heart Assoc	Cohort	4131 (1766 ASCVD), 15.0 years	Participants free of CVD at baseline	LC-MS/MS; TMAO	Plasma (fasting); anticoagulant: EDTA	ASCVD	Cox regression	Age, sex, race, study site, education, income, health status, smoking status, alcohol intake, physical activity, BMI, WC, lipid-lowering medication, antihypertensive medication, antibiotics, T2D, HDL-C, LDL-C, TG, CRP, SBP, DBP, diet, eGFR	5th vs. 1st quintile HR 0.98 (95% CI 0.80–1.20)
Frazier, R. [32]	2021/ USA	Deoxycholic acid and risks of cardiovascular events, ESKD, and mortality in CKD: The CRIC study	Kidney Med	Cohort	3147 (512 CVD), 6.7 years; (575 HF), 7.0 years; (411 all-cause mortality), 7.9 years	Patients with chronic kidney disease but free of CVD at baseline	LC-MS/MS; deoxy-cholic acid	Serum (fasting)	CVD, HF, all-cause mortality	Cox regression	Age, sex, race, study site, eGFR, urinary protein, T2D, SBP, antihypertensive medications, smoking status, history of CVD, TChol, statin use, Il-6, CRP, fibroblast growth factor 23, parathyroid hormone, phosphate, calcium, albumin	>median vs. <median CVD HR 1.52 (0.74–3.12), HF 1.22 (95% CI 0.63–2.38), mortality HR 2.13 (95% CI 1.25–3.64)

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

Table 1. *Cont.*

First Author	Year/Country	Title	Journal	Study Design	N, Follow-Up Time	Baseline Characteristics of Participants	Assay Method and Metabolite Targets	Biological Sample	Main Outcome	Statistical Analysis	Covariates in Fully Adjusted Model	Adjusted HR or OR (95% CI)
Winther, S.A. [18]	2021/ Denmark	Plasma trimethylamine N-oxide and its metabolic precursors and risk of mortality, cardiovascular and renal disease in individuals with type 2-diabetes and albuminuria	PLoS One	Cohort	311 (106 deaths 116 CVD, 44 deaths due to CVD), 21.9 years (6.8 years for death, 6.5 years for CVD)	Patients with T2D but free of CVD at baseline	LC-MS/MS; TMAO	Plasma (non-fasting); anticoagulant not indicated	CVD (cardiovascular mortality, non-fatal MI, ischaemic CVD, non-fatal stroke, amputation due to ischemia and cardiac or peripheral revascularization), CVD mortality and all-cause mortality	Cox regression	Age, sex, HbA1c, SBP, BMI, TChol, smoking, urinary albumin excretion rate and eGFR at baseline.	Per SD all-cause mortality HR 1.02 (95% CI 0.83–1.26), CV mortality 0.98 (95% CI 0.70–1.37), CVD 1.11 (95% CI 0.93–1.33)

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

Table 1. *Cont.*

First Author	Year/Country	Title	Journal	Study Design	N, Follow-Up Time	Baseline Characteristics of Participants	Assay Method and Metabolite Targets	Biological Sample	Main Outcome	Statistical Analysis	Covariates in Fully Adjusted Model	Adjusted HR or OR (95% CI)
Ringel, C. [19]	2021/ Germany	Association of plasma trimethylamine N-oxide levels with atherosclerotic cardiovascular disease and factors of the metabolic syndrome	Athero-sclerosis	3 Cohorts	1666 (99 deaths in LIFE-CAD), 9 years; (26 deaths in LIFE-AMI), 9 years; (194 deaths in CULPRIT-SHOCK), 30 days	Patients with ≥50% stenosis in at least one major coronary artery, and patients with angio-graphically normal coronary arteries ("LIFE-CAD"); patients with AMI ("LIFE-AMI"); patients with AMI with CS ("CULPRIT-SHOCK")	LC-MS/MS; TMAO	Plasma (fasting status not indicated); anticoagu-lant: EDTA	All-cause mortality during 30 days and long term	Cox regression (LIFE-CAD, LIFE-AMI); logistic regression (CULPRIT-SHOCK)	Age, sex, BMI, T2D, eGFR, smoking status, SBP, DBP, high-sensitivity CRP, HDL-C, LDL-C, white blood cell count) and in LIFE-CAD additionally for presence of CAD.	Per SD (LIFE-CAD) HR 1.24 (95% CI 1.01–1.51), (LIFE-AMI) HR 1.07 (95% CI 0.70–1.63), (CULPRIT-SHOCK) OR 1.14 (95% CI 0.86–1.51)
Israr, M.Z. [20]	2021/ UK	Association of gut-related metabolites with outcome in acute heart failure	Am Heart J	Cohort	806 (62 deaths), 30 days; (213 deaths), 1 year; (98 deaths/HF), 30 days; (313 deaths/HF), 1 year	Patients with acute HF at baseline	UHPLC-MS/MS; TMAO	Plasma (fasting status not indicated); anticoagu-lant: EDTA	All-cause mortality (death) and a compos-ite of death and/or rehospital-ization caused by HF (death/HF) at 30 days and 1 year	Cox regression	Sex, age, previous medical history (HF, ischemic heart disease, hypertension, and diabetes mellitus), NYHA class, smoking status, edema, AF, SBP, DBP, heart rate, hemoglobin, respiratory rate, blood sodium, and (log) N-terminal proBNP.	TMAO per SD death HR 1.39 (95% CI 1.05–1.84), 1 year HR 1.26 (95% CI 1.08–1.47); death/HF HR 1.38 (95% CI 1.10–1.73), 1 year HR 1.25 (95% CI 1.09–1.42)

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

Table 1. *Cont.*

First Author	Year/Country	Title	Journal	Study Design	N, Follow-Up Time	Baseline Characteristics of Participants	Assay Method and Metabolite Targets	Biological Sample	Main Outcome	Statistical Analysis	Covariates in Fully Adjusted Model	Adjusted HR or OR (95% CI)
Papandreou, C. [21]	2021/ Spain	Choline metabolism and risk of atrial fibrillation and heart failure in the PREDIMED study	Clin Chem	2 Nested case-control	1127 (509 AF); 752 (326 HF), 10 years	Almost half of participants had T2D and were free of CVD at baseline	LC-MS/MS; TMAO	Plasma (fasting); anticoagulant: EDTA	AF and HF	Conditional logistic regression	Smoking, family history of premature CHD, physical activity, alcohol intake, BMI, intervention group, dyslipidemia, hypertension, T2D, medication use	TMAO per SD AF OR 1.04 (95% CI 0.92–1.17); HF OR 0.91 (95% CI 0.77–1.08) TMAO 4th vs. 1st quartile AF OR 1.02 (95% CI 0.72–1.44); HF OR 0.72 (95% CI 0.45–1.15)
Balasubramanian, R. [40]	2020/ USA	Metabolomic profiles associated with all-cause mortality in the Women's Health Initiative	Int J Epidemiol	2 Cohorts (discovery and replication sets)	943 (417 all-cause mortality (discovery)); 1355 (685 all-cause mortality (replication)), 10 years	10.9% and 14.8% of participants had T2D in the discovery and replication sets, respectively, and were free of CVD at baseline	LC-MS/MS; 470 metabolites (tryptophan)	Plasma (fasting); anticoagulant: EDTA	All-cause mortality	Cox regression	Age, WHI arm and CHD, BMI, SBP, hypertension treatment, T2D, smoking status, TChol, HDL-C	Tryptophan per SD WHI-HT HR 0.87 (95% CI 0.81–0.94); WHI-OS HR 0.82 (95% CI 0.75–0.89)
Croyal, M. [22]	2020/ France	Plasma trimethylamine N-Oxide and risk of cardiovascular events in patients with type 2 diabetes	J Clin Endocrinol Metab	Cohort	1463 (403 MACEs and 538 deaths), 7.1 years	Patients with T2D at baseline	LC-MS/MS; TMAO	Plasma (non-fasting); anticoagulant not indicated	MACE (CV death, non-fatal MI and non-fatal stroke and all-cause mortality) and all-cause mortality	Cox regression	For MACE: sex, age, personal history of MI, eGFR, uACR, NT-proBNP; for all-cause mortality: sex, age, sinus rhythm, SBP, TNF receptor 1, angiopoietin-like 2	MACE 4th vs. 1st quartile HR 1.29 (95% CI 1.02–1.64), all-cause mortality 4th vs. 1st quartile HR 1.16 (95% CI 0.95–1.42)

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

Table 1. *Cont.*

First Author	Year/Country	Title	Journal	Study Design	N, Follow-Up Time	Baseline Characteristics of Participants	Assay Method and Metabolite Targets	Biological Sample	Main Outcome	Statistical Analysis	Covariates in Fully Adjusted Model	Adjusted HR or OR (95% CI)
Alonso, A. [29]	2019/ USA	Serum metabolomics and incidence of atrial fibrillation (from the Atherosclerosis Risk in Communities Study)	Am J Cardiol	Cohort	3922 (608 AF), 20.4 years	14% of participants had T2D and were free of CVD at baseline	GC-MS/MS, LC-MS/MS; glycocholenate sulfate, glycolithocholate sulfate	Serum (fasting)	AF	Cox regression	Age, sex and race, smoking, BMI, SBP, use of antihypertensive medication, T2D, prevalent heart failure, and prevalent CHD, eGFR	Glycocholenate sulfate per SD HR 1.12 (95% CI 1.04–1.21) Glycolithocholate sulfate per SD HR 1.07 (95% CI 0.99–1.15)
Roncal, C. [38]	2019/ Spain	Trimethylamine-N-oxide (TMAO) predicts cardiovascular mortality in peripheral artery disease	Sci Rep	Cohort	262 (135 MACE, 101 all-cause mortality and 39 cardiovascular mortality, 4 years	Patients with PAD at baseline	UHPLC-MS/MS; TMAO	Plasma (fasting); anticoagulant: citrate	All-cause mortality, CVD mortality, MACE (amputation, stroke, myocardial infarction and all-cause mortality)	Cox regression	Sex, age, hs-CRP, smoking, T2D, hypertension, dyslipidemia, HDL-C, eGFR (<60 mL/min/1.73 m2)	All-cause mortality per log unit HR 1.09 (95% CI 0.94–1.26), CV mortality TMAO per log unit HR 1.52 (95% CI 1.27–1.82), TMAO >2.26 µmol/L HR 3.36 (95% CI 1.68–6.70), MACE per log unit HR 1.08 (95% CI 0.95–1.23)
Fan, P.C. [31]	2019/ Taiwan	Serum indoxyl sulfate predicts adverse cardiovascular events in patients with chronic kidney disease	J Formos Med Assoc	Cohort	147 (47 MACE), 3 years	Patients with chronic kidney disease but free of CVD at baseline	LC-MS/MS; indoxyl sulfate	Serum (fasting)	MACE (all-cause mortality, admission for HF and attack of acute coronary syndrome)	Cox regression	Age, sex, T2D, hypertension, SBP, left ventricular ejection fraction, hemoglobin, creatinine, albumin, hsCRP, LDL, TChol, medications	Per log unit HR 1.45 (95% CI 1.02–2.06)

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL
Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

Table 1. *Cont.*

First Author	Year/Country	Title	Journal	Study Design	N, Follow-Up Time	Baseline Characteristics of Participants	Assay Method and Metabolite Targets	Biological Sample	Main Outcome	Statistical Analysis	Covariates in Fully Adjusted Model	Adjusted HR or OR (95% CI)
Tobias, D.K. [39]	2018/ USA	Circulating, branched-chain amino acids and incident cardiovascular disease in a prospective cohort of US women	Circ Genom Precis Med	Cohort	27041 (2207 CVD), 18.6 years	Participants free of CVD at baseline	NMR; BCAAs	Plasma (fasting in 72.9%); anticoagulant: EDTA	CVD (MI, stroke, and coronary revascularization)	Cox regression	Age, randomized treatment assignments, fasting status at blood draw, menopausal status, current hormone therapy use, family history of MI, Caucasian race/ethnicity, smoking status, current 15+ c/d), AHEI diet quality score, alcohol intake, total physical activity MET-hrs/wk, cholesterol, hypertension, BMI	BCAAs per SD total CVD HR 1.13 (95% CI 1.08–1.18), MI HR 1.16 (95% CI 1.06–1.26); revascularization HR 1.17 (95% CI 1.11–1.25), stroke HR 1.07 (95% CI 0.99–1.15) Isoleucine per SD total CVD HR 1.14 (95% CI 1.09–1.19), MI HR 1.19 (95% CI 1.09–1.31); revascularization HR 1.24 (95% CI 1.16–1.32), stroke HR 1.05 (95% CI 0.97–1.13) Leucine per SD total CVD HR 1.06 (95% CI 1.02 -1.11), MI HR 1.05 (95% CI 0.97–1.15); revascularization HR 1.08 (95% CI 1.02–1.14), stroke HR 1.04 (95% CI 0.97–1.12) Valine per SD total CVD HR 1.13 (95% CI 1.08–1.18), MI HR 1.16 (95% CI 1.06–1.27); revascularization HR 1.16 (95% CI 1.09–1.24), stroke HR 1.06 (95% CI 0.99–1.15)

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL
Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

Table 1. *Cont.*

First Author	Year/Country	Title	Journal	Study Design	N, Follow-Up Time	Baseline Characteristics of Participants	Assay Method and Metabolite Targets	Biological Sample	Main Outcome	Statistical Analysis	Covariates in Fully Adjusted Model	Adjusted HR or OR (95% CI)
Huang, J. [30]	2018/ USA	Serum metabolomic profiling of all-cause mortality: A prospective analysis in the alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention (ATBC) study cohort	Am J Epidemiol	Cohort	620 (435 deaths (197 CVD and 107 cancer), 28 years	Participants free of CVD at baseline	UHPLC-MS/MS, GC-MS/MS; 406 metabolites (glycocholate, glycochenodeoxycholate, glycohyocholate, glycolithocholate_sulfate, glycoursodeoxycholate, taurocholenate_sulfate, tauroursodeoxycholate, taurolithocholate_3_sulfate, taurohyocholate)	Serum (fasting)	All-cause mortality	Cox regression	Age, BMI, number of cigarettes per day, TChol, HDL-C, hypertension, T2D, serum creatinine	No significant associations. HR with 95% CI were not indicated
Du, X. [41]	2018/ China	Increased branched-chain amino acid levels are associated with long-term adverse cardiovascular events in patients with STEMI and acute heart failure	Life Sci	Cohort	138 (32 deaths and 21 hospitalizations for heart failure), 3 years	Patients with STEMI and AHF at baseline	LC-MS/MS; 26 amino acids (BCAAs)	Plasma (non-fasting); anticoagulant not indicated	Adverse cardiac events (composite of death and HF hospitalization)	Cox regression	Age, sex, history of T2D, history of hypertension, current smoking, and Killip class	Per SD HR 2.67 (95% CI: 2.41–4.41)

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

Table 1. *Cont.*

First Author	Year/Country	Title	Journal	Study Design	N, Follow-Up Time	Baseline Characteristics of Participants	Assay Method and Metabolite Targets	Biological Sample	Main Outcome	Statistical Analysis	Covariates in Fully Adjusted Model	Adjusted HR or OR (95% CI)
Yu, B. [36]	2016/ USA	Associations between the serum metabolome and all-cause mortality among African Americans in the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study	Am J Epidemiol	Cohort	1887 (671 deaths), 22.5 years	10.9% of participants had T2D and 6.3% had CVD at baseline	GC-MS/MS, LC-MS/MS; 600 metabolites (glyco-cholate)	Serum (fasting)	All-cause mortality, CVD mortality	Cox regression	Age, sex, BMI, SBP, antihypertensive medication use, diabetes status, current smoking status, prevalent cardiovascular disease status, HDL-C, TChol, and eGFR	Glycocholate per SD all-cause mortality HR 1.12 (95% CI 1.07–1.16), CV mortality HR 1.14 (95% CI 1.07–1.22)
Wang, C. [42]	2016/ Taiwan	Increased p-cresyl sulfate level is independently associated with poor outcomes in patients with heart failure	Heart Vessels	Cohort	187 (35 composite event of death or HF-related re-hospitalization), 2.3 years	136 patients with HF and 51 participants without HF at baseline	LC-MS/MS; indoxyl sulfate	Plasma (non-fasting); anticoagulant: EDTA	Composite event of death or HF-related re-hospitalization	Cox regression	Age, LVEF, T2D, eGFR, and BNP	Indoxyl sulfate per µM HR 1.01 (95% CI 0.98–1.04)
Cheng, S. [28]	2015/ USA	Distinct metabolomic signatures are associated with longevity in humans	Nat Commun	2 Cohorts (discovery and replication sets)	2327 (358 CVD, 439 all-cause mortality (discovery)), 13.6 years; 325 (36 all-cause mortality (replication)), 15.8 years	10% of participants had T2D and were free of CVD at baseline	LC-MS/MS; 217 metabolites (glyco-cholate, glyco-codeoxy-cholates, deoxy-cholates)	Plasma (fasting); anticoagulant: EDTA	CVD (coronary heart disease, HF, or stroke) and all-cause mortality	Cox regression	For CVD and all-cause mortality: age, sex, BMI, SBP, anti-hypertensive treatment, diabetes, smoking status, and total/HDL cholesterol	No significant associations. HR with 95% CI were not indicated

Abbreviations: AF, atrial fibrillation; AHEI, alternative healthy eating index; AML acute myocardial infarction; ASCVD, atherosclerotic cardiovascular disease; BCAAs, branched-chain amino acids (BCAAs); BMI, body mass index; CAD, coronary artery disease; CHD, coronary heart disease; CI, confidence interval; CRP, C-reactive protein; CVD, cardiovascular disease; DBP, diastolic blood pressure; eGFR, estimated glomerular filtration rate; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; GC-MS/MS, gas chromatography–mass spectrometry; HbA1c, glycated hemoglobin; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; HF, heart failure; HR, hazard ratio; hs-CRP, high-sensitivity C-reactive protein; HT, hormone trials; LC-MS/MS, liquid chromatography with tandem mass spectrometry; LDL, low-density lipoprotein; Log, logarithm; MACE, major adverse cardiac events; MET-hrs/wk, metabolic equivalent of task-hours per week; MI, myocardial infarction; NMR, nuclear magnetic resonance; NT-proBNP, N-terminal pro-brain natriuretic peptide; OR, odds ratio; OS, observational study; SBP, systolic blood pressure; SD, standard deviation; STEMI, ST-elevation myocardial infarction; TChol, total cholesterol; T2D, type 2 diabetes; TMAO, trimethylamine N-oxide; UHPLC-MS-MS, ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry; WHI, Women's health initiative.

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL
Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez
Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS
EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

3.3. Metabolites Associated with CVD Risk

Among the 21 selected studies, 15 [18,21–26,28,29,31,32,38,39,41,42] examined associations of microbial metabolites with risk of CVD, CAD, MACE, major vascular event, AF, HF, MI, stroke, coronary revascularization and a composite event of death or HF-related re-hospitalization.

3.3.1. Total CVD

Lee et al. used time-varying cumulative averaging of serial TMAO measures (assessed at baseline and 7 years) in relation to risk of CVD in 4131 participants free of CVD [24] During a median follow-up of 15 years, 1766 CVD events occurred. After extensive adjustment for demographics, traditional CVD risk factors, medications, diet and renal function, no significant associations were observed.

Similarly, in the Winther et al. study of 311 patients with T2D but free of CVD no significant associations were found between TMAO and risk of CVD (116 cases after 6.5 years) after adjustment for demographics, traditional factors for CVD and renal function markers [18].

With regards to bile acids, Cheng and colleagues performed metabolite profiling (LC-MS) on plasma samples collected from 2327 participants of the Framingham Offspring Study who underwent a routine examination between 1991 and 1995 and were followed up to 20 years [28]. During this period, 358 individuals developed CVD. Of the 217 metabolites analyzed, three secondary bile acids (glycocholate, glycodeoxycholates, deoxycholates) were not significantly associated with CVD [28].

Another secondary bile acid, the deoxycholic acid was also not significantly associated with risk of CVD in 3147 patients with chronic kidney disease after the inclusion of many potential confounders in the analyses conducted by Frazier et al. [32].

On the other hand, in a large cohort of women free of CVD (Women's Health Study) 27,041 subjects who were followed over a mean 18.6 years elevated baseline plasma levels of total BCAAs assessed by NMR were found associated with higher risk of CVD (per 1SD increase; HR 1.14 [95% CI 1.08–1.18]) [39].

3.3.2. MACE

The MACE components varied by studies and a detailed description can been seen in Table 1.

In 1463 patients with T2D, associations between TMAO plasma concentrations and MACE were investigated by Croyal et al. [22]. During a follow-up of 7.1 years, 403 MACE cases were ascertained. In multivariate Cox regression models (covariates: demographics, personal history of MI, renal function markers, NT-proBNP), compared with the first quartile, those patients in the fourth quartile of TMAO concentrations were at increased risk for MACE (HR 1.29 [95% CI 1.02–1.64]) [22].

In another prospective analysis of plasma TMAO conducted in 262 symptomatic PAD patients by Roncal et al., during a mean period of 4 years, 135 cases were recorded. Multivariable Cox regression analyses (covariates: demographics, CRP, smoking, T2D, hypertension, dyslipidemia, HDL-C, renal function) did not reveal significant associations between one log unit increase in TMAO concentrations and risk of MACE [38].

In a study by Fan et al., 147 patients with CKD stage 1–5 were followed over a 3-year period, and 47 of them developed MACE [31]. Elevated levels of serum indoxyl sulfate were associated with an increased risk of MACE even after adjustment for demographics, traditional CVD risk factors, medications, renal function markers (HR 1.45 [95% CI 1.02–2.06]) [31].

3.3.3. CAD, Major Vascular Event, AF, HF, MI, Stroke, Coronary Revascularization

Liu et al. analyzed data from two cohorts, the Nurses' Health Study II and the Health Professionals Follow-up Study, 1216 participants free of CVD and T2D were followed and

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL
Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez
Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS
EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

608 developed CAD. TMAO was not independently associated with CAD risk in pooled analysis [23].

In another recent study by Papandreou, C et al., associations of plasma TMAO and its precursors with incident AF and HF were examined among 1879 subjects at high CV risk [21]. A total of two nested case-control studies were conducted within the PREDIMED study and after a mean follow-up for about 10 years, 512 AF and 334 HF incident cases were ascertained. Contrary to choline, betaine and dimethylglycine, TMAO was not associated with AF and HF [21].

TMAO was also not significantly associated with MI in a cohort of 1726 patients with suspected functionally relevant CAD [25].

Contrary to these findings, a more recent study by Chen et al. revealed that TMAO levels above the median were associated with higher risk of a major vascular event defined as a composite of transient ischemic attack, recurrent ischemic stroke, and MI in 291 patients with ischemic stroke [26].

In the Atherosclerosis Risk in Communities Study (ARIC) 3922 participants were included in the analyses performed by Alonso et al. and followed for over 20 years, 608 AF incident cases were reported [31]. MS measurements of 245 metabolites in serum were performed. Among two secondary bile acids measured (glycocholenate sulfate, glycolithocolate sulfate) only glycocholenate sulfate was associated with AF (per SD, HR 1.12 [95% CI 1.04–1.21]) [29]. Deoxycholic acid, however, was not associated with HF events in the CRIC study [32].

In another study (Du et al.) of 138 patients with ST-segment elevation MI with acute HF, 16 plasma amino acids were measured with MS. During a follow-up of 3 years, 32 deaths and 21 hospitalizations for HF were registered [41]. Multivariable Cox regression analysis revealed that increased plasma concentrations of BCAAs were associated with a composite of death and HF hospitalization (per SD HR 2.67 [95% CI: 2.41–4.41]) [41].

In the Women's Health Study, Tobias et al. found increased total BCAAs plasma concentrations associated with MI (HR 1.16 [95% CI 1.06–1.26]) and coronary revascularization (HR 1.17 [95% CI, 1.11–1.25]) [39].

In the Wang et al. study, 136 patients with HF and 51 participants without HF were followed for a mean of 2.3 years and 35 of them had a composite event of death or HF-related re-hospitalization [42]. In the multivariable Cox regression analysis, plasma concentrations of indoxyl sulfate measured by MS were not significantly associated with the composite event.

3.4. Metabolites Associated with CVD Mortality and All-Cause Mortality

Eleven of the included studies in this systematic review (Table 1) examined the relationship of microbial metabolites and risk of CVD mortality and/or all-cause mortality [18–20,22,25,27,28,30,32,36,40]. Six, four and one of the studies examined the relationship of TMAO [18–20,22,25,27,38], bile acids [28,30,32,39] and tryptophan [41], respectively, with these outcomes.

3.4.1. TMAO

In a very recent study by Amrein et al., higher TMAO concentrations were associated with all-cause mortality (per log2-transformed increase; HR 1.19 [95% CI 1.01–1.40]) but not CVD-mortality (HR 1.11 [95% CI 0.99–1.26]) [25].

Significant associations were also reported lately in a large cohort of 5331 participants. During 13.2 years, 4791 deaths were recorded and after adjusting for many potential confounders increased plasma levels of TMAO were associated with an increased risk of all-cause mortality (HR 1.30 [95% CI 1.17–1.44]) [27].

In the Winther et al. study after a median follow-up of 6.8 years and 6.5 years, 106 total deaths and 44 CVD deaths were reported, respectively [18]. No significant associations between one SD increase in TMAO plasma concentrations and any of these outcomes were found in the fully adjusted model. Likewise, in another cohort study conducted

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez
Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

by Croyal et al. 1463 patients with T2D were followed for 7.1 years and 538 death cases were recorded. Plasma TMAO was not independently associated with risk of all-cause mortality [22].

In contrast, Ringel et al. investigated associations of plasma TMAO with short- (30 days) and long-term (9 years) all-cause mortality in three independent cohorts of 1666 patients with stable atherosclerotic CVD (449 patients with CVD in a cohort of 904 patients), acute MI (326 patients), cardiogenic shock (436 patients), and T2D (28.7%, 27.3%, 32.4% respectively) [19]. After 1 month, 194 deaths were reported in the CULPRIT-SHOCK cohort, whereas after 9 years, 99 deaths were reported in the LIFE-CAD cohort and 26 deaths in the AMI cohort. Significant associations between TMAO and mortality were found in the LIFE-CAD study of patients with suspected coronary artery disease (multivariate-adjusted HR 1.24 [95% CI 1.01–1.51]) [19]. Similarly, in another cohort study conducted by Israr et al. in 806 acute HF patients, plasma TMAO was quantified and associated with short- (30 days) and long-term (1 year) all-cause mortality [20]. Multivariate analysis revealed significant associations between increased plasma concentrations of TMAO with risk of mortality after 30 days (62 deaths; HR 1.39 [95% CI 1.05–1.84]) and 1 year (213 deaths; HR 1.26 [95% CI 1.08–1.47]) [20].

Finally, Roncal et al. determined TMAO in plasma using MS in 262 patients with symptomatic PAD who were followed for a mean period of 4 years [38]. During this period, 101 all-cause and 39 CVD mortality cases were reported. A significant association between high TMAO levels and all-cause mortality was found in the unadjusted model, but not in the multivariate-adjusted model. However, higher TMAO levels were associated with CVD-mortality (per one SD increase; HR 1.52 [95% CI 1.27–1.82]) and also when TMAO was treated as a binary variable (> 2.26 µmol/L vs. <2.26 µmol/L; HR 3.36 [95% CI 1.68–6.70]) [38].

3.4.2. Secondary Bile Acids

Yu et al. analyzed 204 serum metabolites in 1887 African Americans from the ARIC Study using MS techniques [36]. During a median follow-up period of 22.5 years 671 deaths were reported. Glycocholate was the only bile acid independently associated with the risk of CVD mortality (HR 1.14 [95% CI 1.07–1.22]) and all-cause mortality (HR 1.12 [95% CI 1.07–1.16]) [36].

Significant results were also obtained for the relationship between deoxycholic acid and all-cause mortality (HR 2.13 [95% CI 1.25–3.64]) in patients with chronic kidney disease [32].

On the other hand, Huang et al. analyzed data from the Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention (ATBC) Study Cohort of 620 men free of CVD, who were followed for 28 years. Of the 406 metabolites quantified in serum using MS techniques no significant associations of the ten secondary bile acids analyzed with CVD or all-cause mortality were observed [30].

No significant associations between three secondary bile acids and all-cause mortality were also reported in an earlier study by Cheng et al. among 2327 participants free of CVD [28].

3.4.3. Tryptophan and Indole Derivatives

Balasubramanian et al. used two datasets created from the Women's Health Initiative study consisting of 943 subjects (discovery set; 417 deaths) and 1355 subjects (replication set; 685 deaths) free of CVD [40]. Of the 470 metabolites measured in plasma with LC-MS/MS the amino acid, tryptophan was inversely associated with all-cause mortality in the discovery (HR 0.82 [95% CI 0.75–0.89]) and replication set (HR 0.87 [95% CI 0.81–0.94]) [40]. No studies examining associations between indole derivatives and mortality were identified in the present review, and more work is needed in this area.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL
Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez
Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

4. Discussion

This systematic review summarized the evidence of the associations between circulating microbial-related metabolite levels and risk of CVD. Associations of TMAO and subsequent risk of CV outcomes were supported by some [19,20,22] but not all prospective studies [18,21,22,38]. Inconsistent results were also obtained for secondary bile acids in relation to CVD and related outcomes [30,31], and CVD/all-cause mortality [28,30,36]. With regards to BCAAs [39,41], their associations with CV outcomes were robust among the studies, whereas one study reported a negative relationship between tryptophan and mortality [40] and another study revealed an association between indole derivatives and MACE [30].

4.1. TMAO

In recent years, several systematic reviews of prospective studies have suggested that TMAO is an independent risk factor for CVD [9–17]. Several mechanisms have been described in the literature that could explain these associations. TMAO production from ingestion of animal foods such as red meat may affect cholesterol and lipid metabolism, and endothelial dysfunction as well as platelet activity, which could result in atherosclerosis development [8] the dominant cause of CVD [43]. On the other hand, a recent Mendelian randomization analysis examining the causal direction between TMAO and cardiometabolic diseases suggested that CVD may increase circulating TMAO levels and that observational evidence for CVD may be due to confounding or reverse causality [44].

Our updated systematic review included a total of 11 individual studies that examined the associations of TMAO with CV outcomes. Among them, four outcomes (MACE, major vascular event, CVD mortality, all-cause mortality) were found to be positively associated with TMAO levels in some but not all of the included studies. In three previous meta-analyses of 19, [10], 11 [12] and 17 [11] prospective cohort studies published in 2017, elevated circulating levels of TMAO were associated with higher risk of MACE and all-cause mortality with low to moderate and moderate to high heterogeneity, respectively. A more recent systematic review with meta-analysis of three cohort studies also found moderate heterogeneity across the studies examining associations between TMAO and MACE incidence with no evidence of heterogeneity in the association between TMAO and all-cause mortality [13]. Another recent meta-analysis of nine cohort studies revealed that elevated plasma TMAO concentrations were associated with higher risk of MACE evidence of moderate heterogeneity [17]. In our systematic review the discrepancies in the results of the included studies may be due to differences in: disease status, study geographical locations, number of cases, fasting status at blood draw, adjustments for confounders and follow-up length. Disease status might affect the association between TMAO and CV outcomes through affecting microbiota composition which regulate the circulating TMAO levels [45,46]. The role of geographical location in the above associations could be possibly due to the role of diet in regulation of blood TMAO levels [47,48]. Variation in the number of cases among the included studies may have affected statistical power to detect associations. In two studies, blood samples were collected in non-fasting conditions, while in two others fasting status was not indicated which might have affected TMAO concentrations. Finally, uncontrolled confounding factors such as dietary habits, gut microbiota composition and genetic variation may significantly affect the concentrations of TMAO representing an important source of variability in interpretations.

4.2. BCAAs

The findings of the present review confirm previous findings of a former systematic review on the strong positive prospective associations between BCAAs and CVD risk [9]. In Tobias et al. study [39], a significant positive association was observed between BCAAs with long-term CVD risk, comparable in magnitude to LDL cholesterol, an established CVD biomarker. Notably, this relationship was prominent among women who developed T2D prior to CVD. Also, in Du et al. [41], increased plasma BCAAs levels were associated

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL
Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez
Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

with long-term adverse cardiac events in patients with STEMI and AHF and additionally, BCAAs improved the predictive value of NT-proBNP and the GRACE score. These consistent findings reinforce the role of these metabolites as potential biomarkers of biological dysfunction related to CVD.

Potential mechanisms explaining the relationship between elevated BCAAs levels and risk of CVD include activation of the mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling, which leads to exacerbated cardiac dysfunction, and remodeling in myocardial infarction [49].

4.3. Secondary Bile Acids

To our knowledge, this is the first systematic review of secondary bile acids in relation to CVD risk. Inconsistent results were obtained for these relationships. No significant results were shown for total CVD [30,34], whereas increased levels of glycocholenate sulfate and glycocholate were associated with risk of AF [31], CVD mortality and all-cause mortality [11], respectively. However, the associations of glycocholate, and several other secondary bile acids with mortality were not confirmed in another three studies [27,30,32]. Potential mechanisms underlying the relationship between glycocholenate and AF may include potential arrhythmogenic effects of this bile acid. With regards to glycocholate, is an indirect cholesterol-derived bile acid involved in cholesterol metabolism and is it considered to be a key factor for mortality [50]? Another bile acid, the deoxycholic acid, was also associated with mortality [32]. Elevated levels of this bile acid may contribute to inflammation and immune dysregulation, and vascular calcification and may hasten chronic kidney disease progression.

4.4. Tryptophan and Indole Derivatives

In our systematic review tryptophan was inversely associated with all-cause mortality (Women's Health Initiative study) [40]. Tryptophan is an essential amino acid vital for maintaining health and homeostasis [51]. Given that a higher kynurenine/tryptophan ratio reflects an increased indoleamine 2,3-dioxygenase activity and predicts mortality [52] we can speculate that the effect of tryptophan on mortality might depends on its degradation rate to kynurenine and thus higher circulating tryptophan levels may be due to a low rate of conversion.

Of indole derivatives, indoxyl sulfate is a protein-binding molecule that exhibits CV toxicity and in our systematic review was associated with risk of MACE in CKD patients [31]. Some prospective studies suggested that elevated circulating indoxyl sulfate levels may have a significant role in the vascular dysfunction in CKD patients [53]. When dietary tryptophan is metabolized into indole by intestinal bacteria and absorbed, then it is converted to indoxyl sulfate in the liver. In patients with impaired renal function indoxyl sulfate is not removed effectively [54] and accumulates in the blood exerting its deleterious effects on the endothelium by increasing vascular calcification and stiffness [55,56].

4.5. SCFA

Altered circulating SCFA profiles may be related to several metabolic conditions. SCFA are produced in the gut by the metabolic activity of the intestinal microbiota as catabolic end-products from the fermentation of undigested dietary components, mainly complex carbohydrates. Although studies have focused on different clinical conditions, evidence on the role of these mediators in CVD is lacking [57].

4.6. Strengths and Limitations

To the best of our knowledge, this systematic review provided the most comprehensive evidence on the associations of microbial metabolites with risk of several CV outcomes. Focusing on prospective studies allowed us to limit the influence of reverse causality and selection bias, and all of the included studies were evaluated to be of high quality, as assessed with the "Newcastle–Ottawa Scale".

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL
Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez
Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS
EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

There are several limitations to be considered. First, the lack of studies on SCFAs limited conclusions about the role of main metabolites produced by intestinal bacteria in CVD and this is an area that needs development. Second, due to the observational nature of the studies included in the review, potential causal mechanisms underlying the above associations cannot be inferred. Third, confounder adjustment differed across the studies, which may have resulted in different associations between metabolites such as TMAO or bile acids and CV outcomes. Fourth, we were unable to conduct a meta-analysis, mainly because of the heterogeneity of the included articles. Differences in metabolite targets, characteristics of the study populations and differential reporting of associations could increase the possibility the results of the meta-analysis not to be useful and meaningful.

5. Conclusions

In conclusion, our systematic review summarized the evidence on the associations of gut microbiota-derived metabolites with CV outcomes and showed inconsistent results for TMAO and bile acids but robust ones for the relationships between BCAAs and CVD. There are still a small number of longitudinal studies assessing the association of tryptophan and indole derivatives with the risk of CV outcomes. Further studies are needed to investigate whether circulating microbial metabolites could be an intervention target for CVD.

Supplementary Materials: The following are available online at https://www.mdpi.com/article/10.3390/nu14132654/s1, Table S1: PubMed search strategy, Table S2: Quality assessment of the prospective cohort studies, based on the NEWCASTEL-OTTAWA criteria, Table S3: Quality assessment of the nested case-control studies, based on the NEWCASTEL-OTTAWA criteria.

Author Contributions: Conceptualization, C.P., A.B., M.B.; methodology, C.P., A.B., M.B., R.S.-G., W.A.-K., Y.M.; data curation, C.P., R.S.-G., W.A.-K., Y.M.; writing—original draft preparation, C.P., R.S.-G.; writing—review and editing, C.P., A.B., M.B., G.A.F., R.S.-G., W.A.-K., Y.M., O.M.P., G.B., A.C.; funding acquisition, C.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the Spanish Ministry of Health (Institute of Health Carlos III-Miguel Servet fellowship [grant CP 19/00189]. W.A.-K. is a recipient of the URV fellowship (grant 2021-12-863-FOLCH, Jaume).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: No new data were created or analyzed in this study. Data sharing is not applicable to this article.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Roth, G.A.; Mensah, G.A.; Johnson, C.O.; Addolorato, G.; Ammirati, E.; Baddour, L.M.; Barengo, N.C.; Beaton, A.Z.; Benjamin, E.J.; Benziger, C.P.; et al. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990–2019: Update From the GBD 2019 Study. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2020**, *76*, 2982–3021. [CrossRef] [PubMed]
2. Atkinson, A.J.; Colburn, W.A.; DeGruttola, V.G.; DeMets, D.L.; Downing, G.J.; Hoth, D.F.; Oates, J.A.; Peck, C.C.; Schooley, R.T.; Spilker, B.A.; et al. Biomarkers and Surrogate Endpoints: Preferred Definitions and Conceptual Framework. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2001**, *69*, 89–95. [CrossRef]
3. Leon-Mimila, P.; Wang, J.; Huertas-Vazquez, A. Relevance of Multi-Omics Studies in Cardiovascular Diseases. *Front. Cardiovasc. Med.* **2019**, *6*, 91. [CrossRef] [PubMed]
4. Taegtmeyer, H.; Young, M.E.; Lopaschuk, G.D.; Abel, E.D.; Brunengraber, H.; Darley-Usmar, V.; des Rosiers, C.; Gerszten, R.; Glatz, J.F.; Griffin, J.L.; et al. Assessing Cardiac Metabolism. *Circ. Res.* **2016**, *118*, 1659–1701. [CrossRef]
5. Rooks, M.G.; Garrett, W.S. Gut Microbiota, Metabolites and Host Immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2016**, *16*, 341–352. [CrossRef]
6. Sonnenburg, J.L.; Bäckhed, F. Diet-Microbiota Interactions as Moderators of Human Metabolism. *Nature* **2016**, *535*, 56–64. [CrossRef] [PubMed]
7. Murphy, K.; O'donovan, A.N.; Caplice, N.M.; Ross, R.P.; Stanton, C. Exploring the Gut Microbiota and Cardiovascular Disease. *Metabolites* **2021**, *11*, 493. [CrossRef]
8. Wang, Z.; Klipfell, E.; Bennett, B.J.; Koeth, R.; Levison, B.S.; Dugar, B.; Feldstein, A.E.; Britt, E.B.; Fu, X.; Chung, Y.M.; et al. Gut Flora Metabolism of Phosphatidylcholine Promotes Cardiovascular Disease. *Nature* **2011**, *472*, 57–65. [CrossRef]

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez
Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

9. Ruiz-Canela, M.; Hruby, A.; Clish, C.B.; Liang, L.; Martínez-González, M.A.; Hu, F.B. Comprehensive Metabolomic Profiling and Incident Cardiovascular Disease: A Systematic Review. *J. Am. Heart Assoc.* **2017**, *6*, e005705. [CrossRef]
10. Heianza, Y.; Ma, W.; Manson, J.A.E.; Rexrode, K.M.; Qi, L. Gut Microbiota Metabolites and Risk of Major Adverse Cardiovascular Disease Events and Death: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Studies. *J. Am. Heart Assoc.* **2017**, *6*, e004947. [CrossRef]
11. Schiattarella, G.G.; Sannino, A.; Toscano, E.; Giugliano, G.; Gargiulo, G.; Franzone, A.; Trimarco, B.; Esposito, G.; Perrino, C. Gut Microbe-Generated Metabolite Trimethylamine-N-Oxide as Cardiovascular Risk Biomarker: A Systematic Review and Dose-Response Meta-Analysis. *Eur. Heart J.* **2017**, *38*, 2948–2956. [CrossRef] [PubMed]
12. Qi, J.; You, T.; Li, J.; Pan, T.; Xiang, L.; Han, Y.; Zhu, L. Circulating Trimethylamine N-Oxide and the Risk of Cardiovascular Diseases: A Systematic Review and Meta-Analysis of 11 Prospective Cohort Studies. *J. Cell. Mol. Med.* **2018**, *22*, 185–194. [CrossRef] [PubMed]
13. Guasti, L.; Galliazzo, S.; Molaro, M.; Visconti, E.; Pennella, B.; Gaudio, G.V.; Lupi, A.; Grandi, A.M.; Squizzato, A. TMAO as a Biomarker of Cardiovascular Events: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Intern. Emerg. Med.* **2021**, *16*, 201–207. [CrossRef] [PubMed]
14. Farhangi, M.A.; Vajdi, M.; Asghari-Jafarabadi, M. Gut Microbiota-Associated Metabolite Trimethylamine N-Oxide and the Risk of Stroke: A Systematic Review and Dose-Response Meta-Analysis. *Nutr. J.* **2020**, *19*, 1–15. [CrossRef]
15. McGranaghan, P.; Saxena, A.; Rubens, M.; Radenkovic, J.; Bach, D.; Schleußner, L.; Pieske, B.; Edelmann, F.; Trippel, T.D. Predictive Value of Metabolomic Biomarkers for Cardiovascular Disease Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Biomarkers* **2020**, *25*, 101–111. [CrossRef]
16. Ke, C.; Pan, C.W.; Zhang, Y.; Zhu, X.; Zhang, Y. Metabolomics Facilitates the Discovery of Metabolic Biomarkers and Pathways for Ischemic Stroke: A Systematic Review. *Metabolomics* **2019**, *15*, 152. [CrossRef]
17. Yao, M.E.; Liao, P.D.; Zhao, X.J.; Wang, L. Trimethylamine-N-Oxide Has Prognostic Value in Coronary Heart Disease: A Meta-Analysis and Dose-Response Analysis. *BMC Cardiovasc. Disord.* **2020**, *20*, 7–9. [CrossRef]
18. Winther, S.A.; Øllgaard, J.C.; Hansen, T.W.; von Scholten, B.J.; Reinhard, H.; Ahluwalia, T.S.; Wang, Z.; Gæde, P.; Parving, H.H.; Hazen, S.; et al. Plasma Trimethylamine N-Oxide and Its Metabolic Precursors and Risk of Mortality, Cardiovascular and Renal Disease in Individuals with Type 2-Diabetes and Albuminuria. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0244402. [CrossRef]
19. Ringel, C.; Dittrich, J.; Gaudl, A.; Schellong, P.; Beuchel, C.F.; Baber, R.; Beutner, F.; Teren, A.; Engel, C.; Wirkner, K.; et al. Association of Plasma Trimethylamine N-Oxide Levels with Atherosclerotic Cardiovascular Disease and Factors of the Metabolic Syndrome. *Atherosclerosis* **2021**, *335*, 62–67. [CrossRef]
20. Israr, M.Z.; Bernieh, D.; Salzano, A.; Cassambai, S.; Yazaki, Y.; Heaney, L.M.; Jones, D.J.L.; Ng, L.L.; Suzuki, T. Association of Gut-Related Metabolites with Outcome in Acute Heart Failure. *Am. Heart J.* **2021**, *234*, 71–80. [CrossRef]
21. Papandreou, C.; Bulló, M.; Hernández-Alonso, P.; Ruiz-Canela, M.; Li, J.; Guasch-Ferré, M.; Toledo, E.; Clish, C.; Corella, D.; Estruch, R.; et al. Choline Metabolism and Risk of Atrial Fibrillation and Heart Failure in the PREDIMED Study. *Clin. Chem.* **2021**, *67*, 288–297. [CrossRef]
22. Croyal, M.; Saulnier, P.-J.; Aguesse, A.; Gand, E.; Ragot, S.; Roussel, R.; Halimi, J.-M.; Ducrocq, G.; Cariou, B.; Montaigne, D.; et al. Plasma Trimethylamine N-Oxide and Risk of Cardiovascular Events in Patients with Type 2 Diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2020**, *105*, 2371–2380. [CrossRef] [PubMed]
23. Liu, G.; Li, J.; Li, Y.; Hu, Y.; Franke, A.A.; Liang, L.; Hu, F.B.; Chan, A.T.; Mukamal, K.J.; Rimm, E.B.; et al. Gut Microbiota-Derived Metabolites and Risk of Coronary Artery Disease: A Prospective Study among US Men and Women. *Am. J. Clin. Nutr.* **2021**, *114*, 238–247. [CrossRef] [PubMed]
24. Lee, Y.; Nemet, I.; Wang, Z.; Lai, H.T.M.; de Oliveira Otto, M.C.; Lemaitre, R.N.; Fretts, A.M.; Sotoodehnia, N.; Budoff, M.; Didonato, J.A.; et al. Longitudinal Plasma Measures of Trimethylamine N-Oxide and Risk of Atherosclerotic Cardiovascular Disease Events in Community-Based Older Adults. *J. Am. Heart Assoc.* **2021**, *10*, e020646. [CrossRef] [PubMed]
25. Amrein, M.; Li, X.S.; Walter, J.; Wang, Z.; Zimmermann, T.; Strebel, I.; Honegger, U.; Leu, K.; Schäfer, I.; Twerenbold, R.; et al. Gut Microbiota-Dependent Metabolite Trimethylamine N-Oxide (TMAO) and Cardiovascular Risk in Patients with Suspected Functionally Relevant Coronary Artery Disease (FCAD). *Clin. Res. Cardiol.* **2022**, *111*, 692–704. [CrossRef]
26. Chen, Y.Y.; Ye, Z.S.; Xia, N.G.; Xu, Y. TMAO as a Novel Predictor of Major Adverse Vascular Events and Recurrence in Patients with Large Artery Atherosclerotic Ischemic Stroke. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* **2022**, *28*, 10760296221090503. [CrossRef]
27. Fretts, A.M.; Hazen, S.L.; Jensen, P.; Budoff, M.; Sitlani, C.M.; Wang, M.; de Oliveira Otto, M.C.; DiDonato, J.A.; Lee, Y.; Psaty, B.M.; et al. Association of Trimethylamine N -Oxide and Metabolites With Mortality in Older Adults. *JAMA Netw. Open* **2022**, *5*, e2213242. [CrossRef]
28. Cheng, S.; Larson, M.G.; McCabe, E.L.; Murabito, J.M.; Rhee, E.P.; Ho, J.E.; Jacques, P.F.; Ghorbani, A.; Magnusson, M.; Souza, A.L.; et al. Distinct Metabolomic Signatures Are Associated with Longevity in Humans. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 6791. [CrossRef]
29. Alonso, A.; Yu, B.; Sun, Y.V.; Chen, L.Y.; Loehr, L.R.; O'Neal, W.T.; Soliman, E.Z.; Boerwinkle, E. Serum Metabolomics and Incidence of Atrial Fibrillation (from the Atherosclerosis Risk in Communities Study). *Am. J. Cardiol.* **2019**, *123*, 1955–1961. [CrossRef]
30. Huang, J.; Weinstein, S.J.; Moore, S.C.; Derkach, A.; Hua, X.; Liao, L.M.; Gu, F.; Mondul, A.M.; Sampson, J.N.; Albanes, D.; et al. Serum Metabolomic Profiling of All-Cause Mortality: A Prospective Analysis in the Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention (ATBC) Study Cohort. *Am. J. Epidemiol.* **2018**, *187*, 1721–1732. [CrossRef]

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL
Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez
Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

31. Fan, P.C.; Chang, J.C.H.; Lin, C.N.; Lee, C.C.; Chen, Y.T.; Chu, P.H.; Kou, G.; Lu, Y.A.; Yang, C.W.; Chen, Y.C. Serum Indoxyl Sulfate Predicts Adverse Cardiovascular Events in Patients with Chronic Kidney Disease. *J. Formos. Med. Assoc.* **2019**, *118*, 1099–1106. [CrossRef] [PubMed]
32. Frazier, R.; Cai, X.; Lee, J.; Bundy, J.D.; Jovanovich, A.; Chen, J.; Deo, R.; Lash, J.P.; Anderson, A.H.; Go, A.S.; et al. Deoxycholic Acid and Risks of Cardiovascular Events, ESKD, and Mortality in CKD: The CRIC Study. *Kidney Med.* **2021**, *4*, 100387. [CrossRef] [PubMed]
33. Lavelle, A.; Sokol, H. Gut Microbiota-Derived Metabolites as Key Actors in Inflammatory Bowel Disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2020**, *17*, 223–237. [CrossRef] [PubMed]
34. Page, M.J.; McKenzie, J.E.; Bossuyt, P.M.; Boutron, I.; Hoffmann, T.C.; Mulrow, C.D.; Shamseer, L.; Tetzlaff, J.M.; Akl, E.A.; Brennan, S.E.; et al. The PRISMA 2020 Statement: An Updated Guideline for Reporting Systematic Reviews. *BMJ* **2021**, *88*, 105906. [CrossRef]
35. Page, M.J.; Moher, D.; Bossuyt, P.M.; Boutron, I.; Hoffmann, T.C.; Mulrow, C.D.; Shamseer, L.; Tetzlaff, J.M.; Akl, E.A.; Brennan, S.E.; et al. PRISMA 2020 Explanation and Elaboration: Updated Guidance and Exemplars for Reporting Systematic Reviews. *BMJ* **2021**, *372*, n160. [CrossRef] [PubMed]
36. Yu, B.; Heiss, G.; Alexander, D.; Grams, M.E.; Boerwinkle, E. Associations between the Serum Metabolome and All-Cause Mortality among African Americans in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am. J. Epidemiol.* **2016**, *183*, 650–656. [CrossRef] [PubMed]
37. Wells, G.; Shea, B.; O'Connell, D.; Peterson, J.; Welch, V.; Losos, M.; Tugwell, P. Ottawa Hospital Research Institute. Available online: http://www.ohri.ca/programs/clinical_epidemiology/oxford.asp (accessed on 11 May 2022).
38. Roncal, C.; Martínez-Aguilar, E.; Orbe, J.; Ravassa, S.; Fernandez-Montero, A.; Saenz-Pipaon, G.; Ugarte, A.; Estella-Hermoso de Mendoza, A.; Rodriguez, J.A.; Fernández-Alonso, S.; et al. Trimethylamine-N-Oxide (TMAO) Predicts Cardiovascular Mortality in Peripheral Artery Disease. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–8. [CrossRef] [PubMed]
39. Tobias, D.K.; Lawler, P.R.; Harada, P.H.; Demler, O.V.; Ridker, P.M.; Manson, J.A.E.; Cheng, S.; Mora, S. Circulating Branched-Chain Amino Acids and Incident Cardiovascular Disease in a Prospective Cohort of US Women. *Circ. Genom. Precis. Med.* **2018**, *11*, e002157. [CrossRef]
40. Balasubramanian, R.; Paynter, N.P.; Giulianini, F.; Manson, J.E.; Zhao, Y.; Chen, J.C.; Vitolins, M.Z.; Albert, C.A.; Clish, C.; Rexrode, K.M. Metabolomic Profiles Associated with All-Cause Mortality in the Women's Health Initiative. *Int. J. Epidemiol.* **2019**, *49*, 289–300. [CrossRef]
41. Du, X.; Li, Y.; Wang, Y.; You, H.; Hui, P.; Zheng, Y.; Du, J. Increased Branched-Chain Amino Acid Levels Are Associated with Long-Term Adverse Cardiovascular Events in Patients with STEMI and Acute Heart Failure. *Life Sci.* **2018**, *209*, 167–172. [CrossRef]
42. Wang, C.H.; Cheng, M.L.; Liu, M.H.; Shiao, M.S.; Hsu, K.H.; Huang, Y.Y.; Lin, C.C.; Lin, J.F. Increased P-Cresyl Sulfate Level Is Independently Associated with Poor Outcomes in Patients with Heart Failure. *Heart Vessel.* **2016**, *31*, 1100–1108. [CrossRef] [PubMed]
43. Frostegård, J. Immunity, Atherosclerosis and Cardiovascular Disease. *BMC Med.* **2013**, *11*, 117. [CrossRef] [PubMed]
44. Jia, J.; Dou, P.; Gao, M.; Kong, X.; Li, C.; Liu, Z.; Huang, T. Assessment of Causal Direction between Gut Microbiota-Dependent Metabolites and Cardiometabolic Health: A Bi-Directional Mendelian Randomisation Analysis. *Diabetes* **2019**, *68*, 1745–1755. [CrossRef] [PubMed]
45. Wang, J.; Qin, J.; Li, Y.; Cai, Z.; Li, S.; Zhu, J.; Zhang, F.; Liang, S.; Zhang, W.; Guan, Y.; et al. A Metagenome-Wide Association Study of Gut Microbiota in Type 2 Diabetes. *Nature* **2012**, *490*, 55–60. [CrossRef]
46. Trøseid, M.; Andersen, G.Ø.; Broch, K.; Hov, J.R. The Gut Microbiome in Coronary Artery Disease and Heart Failure: Current Knowledge and Future Directions. *EBioMedicine* **2020**, *52*, 102649. [CrossRef]
47. Hazen, S.L.; Brown, J.M. Eggs as a Dietary Source for Gut Microbial Production of Trimethylamine-N-Oxide. *Am. J. Clin. Nutr.* **2014**, *100*, 741–743. [CrossRef]
48. Koeth, R.A.; Wang, Z.; Levison, B.S.; Buffa, J.A.; Org, E.; Sheehy, B.T.; Britt, E.B.; Fu, X.; Wu, Y.; Li, L.; et al. Intestinal Microbiota Metabolism of L-Carnitine, a Nutrient in Red Meat, Promotes Atherosclerosis. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 576–585. [CrossRef]
49. Malsam, J.; Satoh, A.; Pelletier, L.; Warren, G. Golgin Tethers Define Subpopulations of COPI Vesicles. *Science (1979)* **2005**, *307*, 1095–1098. [CrossRef]
50. Stamler, J.; Daviglus, M.L.; Garside, D.B.; Ma, A.R.; Dyer, P.; Greenland, J.D.; Neaton, F. Relationship of Baseline Serum Cholesterol Levels in 3 Large Cohorts of Younger Men to Long-Term Coronary, Cardiovascular, and All-Cause Mortality and to Longevity. *JAMA* **2000**, *284*, 311–318. [CrossRef]
51. Konopelski, P.; Mogilnicka, I. Biological Effects of Indole-3-Propionic Acid, a Gut Microbiota-Derived Metabolite, and Its Precursor Tryptophan in Mammals' Health and Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 1222. [CrossRef]
52. Pertovaara, M.; Raitala, A.; Lehtimäki, T.; Karhunen, P.J.; Oja, S.S.; Jylhä, M.; Hervonen, A.; Hurme, M. Indoleamine 2,3-Dioxygenase Activity in Nonagenarians Is Markedly Increased and Predicts Mortality. *Mech. Ageing Dev.* **2006**, *127*, 497–499. [CrossRef]
53. Barreto, F.C.; Barreto, D.V.; Liabeuf, S.; Meert, N.; Glorieux, G.; Temmar, M.; Choukroun, G.; Vanholder, R.; Massy, Z.A. Serum Indoxyl Sulfate Is Associated with Vascular Disease and Mortality in Chronic Kidney Disease Patients. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2009**, *4*, 1551–1558. [CrossRef] [PubMed]

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL
Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez
Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

54. Niwa, T.; Takeda, N.; Maeda, K.; Shibata, M.; Tatematsu, A. Accumulation of Furancarboxylic Acids in Uremic Serum as Inhibitors of Drug Binding. *Clin. Chim. Acta* **1988**, *173*, 127–138. [CrossRef]
55. Dou, L.; Jourde-Chiche, N.; Faure, V.; Cerini, C.; Berland, Y.; Dignat-George, F.; Brunet, P. The Uremic Solute Indoxyl Sulfate Induces Oxidative Stress in Endothelial Cells. *J. Thromb. Haemost.* **2007**, *5*, 1302–1308. [CrossRef] [PubMed]
56. Dou, L.; Bertrand, E.; Cerini, C.; Faure, V.; Sampol, J.; Vanholder, R.; Berland, Y.; Brunet, P. The Uremic Solutes P-Cresol and Indoxyl Sulfate Inhibit Endothelial Proliferation and Wound Repair. *Kidney Int.* **2004**, *65*, 442–451. [CrossRef]
57. Rodríguez-Carrio, J.; Salazar, N.; Margolles, A.; González, S.; Gueimonde, M.; de los Reyes-Gavilán, C.G.; Suárez, A. Free Fatty Acids Profiles Are Related to Gut Microbiota Signatures and Short-Chain Fatty Acids. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 823. [CrossRef]

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez
Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

5.2 Segundo estudio

Plasma trimethylamine-N-oxide, its precursors and risk of cardiovascular events in patients with acute coronary syndrome: Mediating effects of renal function

Raul Sanchez-Gimenez, Oscar M. Peiró, Gil Bonet, Anna Carrasquer, George A. Fragkiadakis, Mònica Bulló, Christopher Papandreou and Alfredo Bardaji. Front. Cardiovasc. Med. 2022, 9, 1000815.

Resumen de resultados

Este estudio de cohorte prospectivo de 309 pacientes con SCA demostró que las concentraciones plasmáticas iniciales de TMAO y dimetilglicina se asociaron con un mayor riesgo de MACE después de un seguimiento medio de 6,7 años. La fuerte asociación positiva para TMAO se atenuó y se volvió no significativa después del ajuste para eGFR. Es importante destacar que, en el análisis por mediación, el eGFR, un marcador de la función renal, mediaba completamente la asociación entre TMAO y MACE. Además, eGFR actuó como mediador parcial en la relación entre dimetilglicina y MACE. No se observaron asociaciones significativas para otros precursores de TMAO TMA, colina, betaína y L-carnitina.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL
Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez
Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

frontiers | Frontiers in Cardiovascular Medicine

TYPE Original Research
PUBLISHED 21 September 2022
DOI 10.3389/fcvm.2022.1000815

Check for updates

OPEN ACCESS

EDITED BY
Fernanda Priviero,
University of South Carolina,
United States

REVIEWED BY
Évila Salles,
Augusta University, United States
Amanda Almeida De Oliveira,
University of Alberta, Canada
Chang Liu,
Emory University, United States

*CORRESPONDENCE
Christopher Papandreou
papchris10@gmail.com

†These authors have contributed equally to this work and share senior authorship

SPECIALTY SECTION
This article was submitted to Cardiovascular Epidemiology and Prevention,
a section of the journal
Frontiers in Cardiovascular Medicine

RECEIVED 22 July 2022
ACCEPTED 05 September 2022
PUBLISHED 21 September 2022

CITATION
Sanchez-Gimenez R, Peiró ÓM, Bonet G, Carrasquer A, Fragkiadakis GA, Bulló M, Papandreou C and Bardaji A (2022) Plasma trimethylamine-N-oxide, its precursors and risk of cardiovascular events in patients with acute coronary syndrome: Mediating effects of renal function.
Front. Cardiovasc. Med. 9:1000815.
doi: 10.3389/fcvm.2022.1000815

COPYRIGHT
© 2022 Sanchez-Gimenez, Peiró, Bonet, Carrasquer, Fragkiadakis, Bulló, Papandreou and Bardaji. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Plasma trimethylamine-N-oxide, its precursors and risk of cardiovascular events in patients with acute coronary syndrome: Mediating effects of renal function

Raul Sanchez-Gimenez[1,2,3], Óscar M. Peiró[1,2,3], Gil Bonet[1,2,3], Anna Carrasquer[1,2,3], Georgios A. Fragkiadakis[4], Mònica Bulló[2,5,6], Christopher Papandreou[2*†] and Alfredo Bardaji[1,2,3†]

[1]Department of Cardiology, Joan XXIII University Hospital, Tarragona, Spain, [2]Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV), Reus, Spain, [3]Department of Medicine and Surgery, Rovira i Virgili University, Tarragona, Spain, [4]Department of Nutrition and Dietetics Sciences, School of Health Sciences, Hellenic Mediterranean University (HMU), Siteia, Greece, [5]Department of Biochemistry and Biotechnology, Rovira i Virgili University, Reus, Spain, [6]Centro de Investigación Biomédica en Red Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

Aims: To examine associations of the gut microbial metabolite trimethylamine-N-oxide (TMAO) and its precursors with risk of cardiovascular events in acute coronary syndrome (ACS), and determine whether these associations were mediated by renal function.

Methods: In this prospective cohort study, we included 309 patients with ACS. During a mean follow-up of 6.7 years, 131 patients developed major adverse cardiovascular events (MACE) (myocardial infarction, hospitalization for heart failure, and all-cause mortality). Plasma concentrations of TMAO, trimethylamine (TMA), choline, betaine, dimethylglycine and L-carnitine were profiled by liquid chromatography tandem mass spectrometry. Hazard ratios were estimated with multivariable Cox regression models. The mediating role of estimated glomerular filtration rate (eGFR) was tested under a counterfactual framework.

Results: After adjustment for traditional cardiovascular risk factors and medications, participants in the highest tertile vs. the lowest tertile of baseline TMAO and dimethylglycine concentrations had a higher risk of MACE [(HR: 1.83; 95% CI: 1.08, 3.09) and (HR: 2.26; 95% CI: 1.17, 3.99), respectively]. However, with regards to TMAO these associations were no longer significant, whereas for dimethylglycine, the associations were attenuated after additional adjustment for eGFR. eGFR mediated the associations of TMAO (58%) and dimethylglycine (32%) with MACE incidence. The associations between dimethylglycine and incident MACE were confirmed in an internal validation. No significant associations were found for TMA, choline, betaine and L-carnitine.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL
Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez
Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS
EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

Conclusion: These findings suggest that renal function may be a key mediator in the association of plasma TMAO with the development of cardiovascular events after ACS. The present findings also support a role of dimethylglycine in the pathogenesis of MACE, which may be mediated, at least partially, by renal function.

KEYWORDS

trimethylamine-N-oxide, metabolites, acute coronary syndrome, major adverse cardiovascular events, prognostic

Introduction

Acute coronary syndrome (ACS) is a leading cause of morbidity, mortality, and health care cost worldwide (1, 2). Patients with ACS are at high risk for recurrent cardiovascular events (3, 4) and therefore secondary prevention is paramount. Although many prognostic tools have been developed for, efforts are still ongoing to identify reliable and predictive biomarkers, which may help predict clinical outcomes of high-risk ACS patients (5). Given the fact that metabolic perturbations are frequent in ACS (6, 7), metabolomics seems a promising approach to reveal these perturbations and to identify metabolite-based biomarkers to aid in both the identification of pathophysiological processes relevant to adverse events development and improve preventive clinical outcomes reduction efforts after ACS.

Lately, the gut microbiota-related metabolite trimethylamine-N-oxide (TMAO) has attracted considerable attention across cardiovascular research due to its association with the risk of cardiovascular outcomes (8). Since the discovery of a relationship between TMAO and major adverse cardiovascular events (MACE) in ACS patients, in 2017 (9), few studies were conducted and a recent meta-analysis of prospective studies revealed positive pooled estimates with substantial methodologic heterogeneity among the studies indicating the need for more prospective researches to evaluate this relationship (10). Little evidence also exists on the relationship between TMAO precursors and risk of MACE after ACS. A previous study suggested that higher choline and betaine concentrations in plasma were associated with greater risk of incident MACE, but only among those ACS patients with concomitantly elevated plasma TMAO concentrations (11). In another small study with short follow-up time, plasma dimethylglycine, the immediate product of betaine, was associated with increased risk of all-cause death, acute myocardial infarction (MI), and hospitalization for heart failure (12); still, associations with a composite of these clinical events have not been examined. In addition, the prognostic role of trimethylamine (TMA), the immediate precursor of TMAO, and L-carnitine in ACS remains unknown. Because circulating levels of these metabolites have been inversely correlated with levels of the renal function marker, glomerular filtration rate (GFR), in previous studies (13–16) and some studies suggest that GFR can be a mediator in these associations (17, 18) further studies exploring the mediating role of renal function are needed.

The aim of the present prospective cohort study was (i) to investigate associations between baseline plasma concentrations of TMAO and its precursors with incident MACE among patients with ACS and (ii) to determine whether these associations are mediated by renal function.

Materials and methods

Study design and participants

The study was approved by the Institutional Ethical Committee and was conducted in accordance with the ethical principles set forth of the Declaration of Helsinki. All patients gave their written consent for participation in the study.

Patients with ACS admitted to Joan XXIII University Hospital and underwent a coronary angiography from January 2011 to May 2013, were included in this study and followed-up until 2022. The European Society of Cardiology guidelines were followed to define ACS as follows: patients with ST-segment elevation myocardial infarction (STEMI), non-ST-segment elevation myocardial infarction (NSTEMI) and unstable angina. Acute myocardial infarction (STEMI or NSTEMI) was diagnosed according to the current universal definition of myocardial infarction (19). Unstable angina was defined as the presence of ACS symptoms at rest or with minimal exertion in the absence of cardiomyocyte necrosis (20). Patients that suffered a MI other than type 1, and those with foreign residency were excluded from this study. The Joan XXIII University Hospital is a tertiary hospital located in South Europe (Tarragona, Spain) and the only hospital in the region for performing angiograms and percutaneous coronary interventions. This could result in difficulties to follow-up patients treated at the hospital during the acute phase. Therefore, many patients were only treated at the hospital during the acute phase and then followed-up by their local cardiologist after discharge.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez
Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

Ascertainment of MACE cases

Information on clinical outcomes was obtained by contacting patients every year and by analysis of the hospital's patient management information system [myocardial infarction (ICD-10-CM I21), hospitalization for heart failure (ICD-10-CM I50)]. MACE was defined as the composite of myocardial infarction, hospitalization for heart failure, and all-cause mortality.

Metabolomic profiling

Blood samples were collected into EDTA tubes from patients during coronary angiography. These samples were shipped from the Joan XXIII University Hospital to the Biobank of the Pere Virgili Health Research Institute, registered in the National Biobank Network, for further processing and storage. After centrifugation, plasma aliquots were stored at −80°C until analysis. TMAO, TMA, choline, betaine, dimethylglycine and L-carnitine were quantified by stable-isotope dilution method using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. Samples (50 µl plasma) were mixed with 10 µl of internal standard, 75 µl of 50 mM tert-Butyl bromoacetate in ACN and 10 µl of 70% ammonium hydroxide. Samples were vortexed for 1 min and incubated for 30 min at room temperature. A volume of 50 µl of 1% formic acid in ACN was added. Samples were centrifuged for 5 minat 15,000 rpm and 4°C. Samples were chromatographed on an ACQUITY UPLC BEH HILIC, 1.7 µm 2.1 × 100 mm (Waters, Milford, MA, USA) and in junction with a UHPLC 1290 Infinity II (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The gradient consisted of a gradient of 0% A for 1 min, to 10% A at 4 min, to 55% A at 5 min and 55% A for 2 min. Mobile phase A was composed of 10% acetonitrile and 90% water with 10 mmol/L of ammonium formate and 0.125% formic acid; mobile phase B was 90% acetonitrile and 10% water with 10 mmol/L of ammonium formate and 0.125% formic acid. Flow rate was kept constant at 0.5 mL/min, and the column manager was set at room temperature for the duration of the sequence. Agilent QqQ/MS 6470 Series with an electrospray ionization probe operating in positive-ion mode was used for mass spectrometric analysis. The source conditions were set at 50 psi for the nebulizer gas, 300°C for the gas temperature, 11 L/min for the gas flow, 400°C for the sheath gas temperature, 12 L/min for the sheath gas flow, 2,500 V for the capillary voltage, and 500 V for the nozzle voltage. Quantitative determination was performed using the multiple reaction monitoring mode, and the transitions for each compound are detailed in Supplementary Table S1. Assay quality assurance was monitored by routine analysis of pooled quality control plasma. Information about the mass to charge ratio and retention time is shown in Supplementary Table S1. The metabolite identification confidence level according to the published criteria (21) is Level 1: confirmed structure with MS, MS^2, RT and reference standard.

Covariates

Information about demographics, smoking status, medical conditions, and medication use were collected during hospital admission. Body mass index (BMI) was calculated as weight divided by height squared (kg/m^2). The estimated GFR (eGFR) was calculated by using the Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration creatinine equation (22). Participants were considered having type 2 diabetes (T2D), dyslipidemia, or hypertension if they had previously been diagnosed.

Statistical analyses

Baseline characteristics of patients are described as mean ± standard deviation (SD) or median (interquartile range) for quantitative variables and percentages for categorical variables. A natural logarithmic transformation in metabolites' concentrations was applied to approximate a normal distribution.

We used crude and 2 multivariable Cox proportional hazards models for time-to-event analysis to determine hazard ratios (HRs) and 95% confidence intervals (CIs) for MACE. We checked the proportional hazards assumption by examining the Schoenfeld residuals and found that the assumption was not violated. The first multivariable-adjusted Cox regression model (multivariable model 1) was fitted as follows: multivariable model 1 was adjusted for age, sex, BMI (kg/m^2), smoking (never, current, or former), hypertension (yes or no), dyslipidemia (yes or no), T2D (yes or no), unstable angina (yes or no), acute ST-segment elevation myocardial infarction (yes or no), non-ST-segment elevation acute myocardial infarction (yes or no), statin medication (yes or no), beta-blockers (yes or no), oral antidiabetic medication (yes or no), insulin medication (yes or no), diuretics (yes or no), and aspirin (yes or no). The multivariable model 1 was additionally adjusted for eGFR (multivariable model 2) to further assess the effect of renal function. Spearman's correlation analyses were performed to investigate whether there was a relationship between circulating levels of TMAO, TMA, choline, betaine, L-carnitine and eGFR.

Metabolites were analyzed as both continuous variables [1-standard deviation (SD) (1-SD) increment in their ln-transformed levels] and by using tertiles. To appraise the linear trend across tertiles, the median metabolite concentration within each tertile was included in the Cox regression models as a continuous variable. Bootstrap resampling of the original sets (1,000-fold) was performed to internally validate the associations. Non-parametric associations were examined by

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL
Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez
Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

fitting cubic splines to the Cox regression model. Tests for non-linearity involved the likelihood ratio test, comparing the model with only the linear term to the model with the linear and the cubic spline terms. These analyses were performed using Stata 14.1 (Stata Corp.), at a two-tailed α of 0.05.

We carried out a counterfactual-based mediation analysis (23) to explore the possibility that the association of plasma metabolites concentrations with MACE incidence might be mediated by eGFR. Mediation analysis under the counterfactual framework has advantages over conventional mediation analysis since it enables the incorporation of exposure-mediator interactions, adjusts for measured intermediate confounders, and deals with non-linear relationships. By performing this analysis using the R package "medflex" (24), the total effect of metabolites on MACE risk can be decomposed into a natural direct effect of metabolites on MACE risk and a natural indirect effect of metabolites accounted by the effect of the putative mediators, in our case the eGFR. We also accounted for potential confounding by the covariates included in the multivariable Cox regression model 1. The bootstrapping technique with 1,000 replications was employed to derive the 95% confidence intervals. The mediation analysis was performed using Poisson based Generalized Linear Models by splitting the follow-up time every time an event was observed [survSplit() function in the survival package] in such a way every time interval contains only one event and thereafter we estimated the effects of the model parameters (25, 26) as Cox regression models are currently not implemented in "medflex". It has been suggested that a similar hazard ratio to that of the Cox regression model could be obtained by fitting a Poisson model on survival data (27, 28). To approximate more the Cox results we added a time term to the Poisson model. The mediated proportion was calculated as natural indirect log-incident rate ratios (IRR) divided by total effect log-IRR. This analysis was performed using R version 4.2.0 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

Results

Baseline characteristics of patients

Baseline characteristics of this cohort are shown in Table 1. A total of 309 patients with ACS were included in the study. The mean age was 64.9 years and 28.8% were women. The mean values of BMI and eGFR were 28.1 kg/m^2 and 81.3 mL/min/1.73 m^2, respectively. Of all patients, 62.0% were admitted with NSTEMI, 22.0% with STEMI and 15.9% with unstable angina. Half of them were following statins medication, followed by those taking aspirin (40.5%), beta-blockers (30.4%), diuretics (25.2%) and oral antidiabetic agents (22.7%). The median (interquartile range) of metabolites' concentrations can also be seen in Table 1.

TABLE 1 Baseline characteristics of patients.

Characteristics	Patients ($N = 309$)
Age (years)	64.9 ± 12.3
Sex, %	
Women	28.8
Men	71.2
Body mass index, kg/m^2	28.1 ± 4.0
eGFR (mL/min/1.73 m^2)	81.3 (62.1–96.7)
Type 2 diabetes, %	37.2
Hypertension, %	67.6
Dyslipidemia, %	60.8
Smoking, %	
Never	35.6
Former	33.9
Current	30.4
Discharge diagnostic, %	
Unstable angina	15.9
STEMI	22.0
NSTEMI	62.0
Medications, %	
Statins	50.5
Beta-blockers	30.4
Aspirin	40.5
Diuretics	25.2
Oral antidiabetic agents	22.7
Insulin medication	8.7
Metabolites	
TMAO, μmol/L	9.98 (7.42–19.19)
TMA, nmol/L	49.41 (32.17–88.32)
Choline, μmol/L	11.81 (9.59–14.30)
Betaine, μmol/L	41.01 (32.46–50.62)
Dimethylglycine, μmol/L	3.26 (2.42–4.19)
L-carnitine, μmol/L	47.26 (40.0–57.0)

Continuous data are presented as mean ± standard deviation or median (interquartile range), and categorical variables are presented as %. eGFR, estimated glomerular filtration rate; STEMI, ST elevation myocardial infarction; NSTEMI, non-ST elevation myocardial infarction, TMAO, trimethylamine N-oxide; TMA, trimethylamine.

Baseline metabolites and risk of MACE

ACS patients were followed for a mean of 6.7 (SD = 3.6) years for MACE occurrence. The associations of TMAO and its precursors with MACE risk are displayed in Table 2. In the multivariable model 1, the estimated HR for incident MACE reached significance only in the highest, compared with the lowest tertile of plasma concentrations of TMAO (HR: 1.83; 95% CI: 1.08, 3.09). Furthermore, the risk of MACE significantly increased per 1-SD increase in TMAO concentrations (HR: 1.25; 95% CI: 1.07, 1.46; $p = 0.005$). Spearman's correlation analyses revealed a significant negative

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL
Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez
Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS
EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

TABLE 2 Associations of baseline individual metabolites concentrations with the risk of MACE[a].

Metabolite	Tertiles of plasma metabolite concentrations T1	T2	T3	*P* trend	HR per 1 SD increment	*P*-value
TMAO						
Concentrations (μmol/L)	<8.01	8.01–<14.96	≥14.96			
Cases	29	45	57			
Crude model	Ref.	1.81 (1.15–2.85)	2.63 (1.69–4.08)	**<0.001**	1.42 (1.24–1.64)	**<0.001**
MV1	Ref.	1.45 (0.85–2.46)	1.83 (1.08–3.09)	**0.043**	1.25 (1.07–1.46)	**0.005**
MV2	Ref.	1.43 (0.84–2.42)	1.66 (0.98–2.82)	0.119	1.15 (0.96–1.37)	0.121
TMA						
Concentrations (nmol/L)	<36.09	36.09–<70.24	≥70.24			
Cases	38	45	48			
Crude model	Ref.	1.33 (0.87–2.04)	1.47 (0.95–2.25)	0.117	1.11 (0.95–1.29)	0.187
MV1	Ref.	1.18 (0.73–1.92)	1.21 (0.75–1.96)	0.534	1.05 (0.89–1.25)	0.568
MV2	Ref.	1.13 (0.70–1.83)	1.10 (0.68–1.81)	0.792	1.01 (0.85–1.21)	0.894
Choline						
Concentrations (μmol/L)	<10.39	10.39–<13.35	≥13.35			
Cases	38	42	51			
Crude model	Ref.	1.14 (0.74–1.75)	1.66 (1.08–2.55)	**0.019**	1.37 (1.16–1.61)	**<0.001**
MV1	Ref.	0.99 (0.61–1.63)	0.96 (0.58–1.58)	0.865	1.15 (0.95–1.40)	0.146
MV2	Ref.	0.99 (0.61–1.63)	0.87 (0.53–1.40)	0.530	1.02 (0.84–1.24)	0.840
Betaine						
Concentrations (μmol/L)	<35.27	35.27–<47.02	≥47.02			
Cases	48	38	45			
Crude model	Ref.	0.75 (0.50–1.14)	0.99 (0.66–1.48)	0.964	1.02 (0.84–1.23)	0.863
MV1	Ref.	0.70 (0.43–1.12)	0.84 (0.50–1.40)	0.586	0.97 (0.77–1.22)	0.771
MV2	Ref.	0.64 (0.39–1.03)	0.80 (0.49–1.31)	0.504	0.96 (0.77–1.20)	0.742
Dimethylglycine						
Concentrations (μmol/L)	<2.69	2.69–<3.80	≥3.80			
Cases	31	46	54			
Crude model	Ref.	1.60 (1.02–2.50)	2.31 (1.49–3.60)	**<0.001**	1.47 (1.22–1.76)	**<0.001**
MV1	Ref.	1.63 (0.94–2.84)	2.56 (1.44–4.54)	**0.001**	1.53 (1.23–1.90)	**<0.001**
MV2	Ref.	1.53 (0.89–2.65)	2.16 (1.17–3.99)	**0.012**	1.41 (1.10–1.81)	**0.007**
L-carnitine						
Concentrations (μmol/L)	<42.51	42.51–<53.74	≥53.74			
Cases	43	39	49			
Crude model	Ref.	0.88 (0.57–1.36)	1.20 (0.80–1.81)	0.316	1.01 (0.82–1.24)	0.934
MV1	Ref.	0.71 (0.43–1.16)	1.23 (0.74–2.03)	0.281	1.06 (0.85–1.32)	0.622
MV2	Ref.	0.77 (0.47–1.26)	1.21 (0.73–2.00)	0.352	1.06 (0.87–1.30)	0.548

[a]Values are HR (hazard ratios) with 95% confidence intervals. A natural logarithmic transformation was applied to the raw values of individual metabolites. Cox regression analysis was used. MV1 adjusted for age, sex, body mass index (kg/m^2), smoking, hypertension, dyslipidemia, type 2 diabetes, unstable angina, acute ST-segment elevation myocardial infarction, non-ST-segment elevation acute myocardial infarction, statin medication, beta-blockers, oral antidiabetic medication, insulin medication, diuretics, aspirin. MV2 additionally adjusted for estimated glomerular filtration rate.
MV, multivariable; Ref, reference; MACE, major adverse cardiovascular events; TMAO, trimethylamine N-oxide; TMA, trimethylamine.
Bold text indicates statistically significant *P*-values.

correlation between plasma TMAO and eGFR levels (r = −0.40, $P < 0.001$) (Supplementary Figure S1A). Importantly, the associations between TMAO and risk of MACE were no longer significant after additional adjustment for eGFR. With regard to dimethylglycine, in the multivariable model 1 the estimated HR for incident MACE in the highest compared with the lowest tertile was 2.56 (95% CI: 1.44, 4.54; p trend = 0.001) and this association remained significant after

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL
Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez
Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS
EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

inclusion of eGFR into the Cox regression model (HR: 2.26; 95% CI: 1.17, 3.99; p trend = 0.012). Kaplan–Meier survival analysis demonstrated a significant difference in MACE incidence across tertiles of dimethylglycine concentration subgroups (log-rank, $P < 0.001$; Supplementary Figure S2). Similarly, significant positive associations with MACE incidence were observed for dimethylglycine when was modeled continuously (per 1 SD) in the multivariable model 1 (HR: 1.53; 95% CI: 1.23, 1.90; $p < 0.001$) and these associations were attenuated after adjusting for eGFR but remained statistically significant (HR: 1.41; 95% CI: 1.10, 1.81; $p = 0.007$). Dimethylglycine concentrations were inversely correlated with eGFR levels ($r = -0.29$, $P < 0.001$) (Supplementary Figure S1E). Cubic spline curves (Supplementary Figure S3) showed that dimethylglycine was non-linearly associated with MACE risk (P-value for non-linearity with MACE risk was = 0.003). Internal validation by bootstrap resampling confirmed the significant findings for dimethylglycine (Supplementary Table S3). No significant associations for TMA, choline, betaine, L-carnitine and MACE risk were observed (Table 2).

Mediation of the association between TMAO and dimethylglycine with MACE

Results from the mediation analyses are displayed in Table 3. Overall 58% of the total effect of TMAO (per 1-SD increase) on risk for MACE was mediated through eGFR, with natural direct effect of IRR: 1.15 (95% CI: 0.98–1.34) and natural indirect effect of IRR: 1.22 (95% CI: 1.10–1.34). Significant indirect effect on MACE risk was also found for dimethylglycine (per 1-SD increase). The magnitude of mediation was 32%, with natural direct effect of IRR: 1.17 (95% CI: 0.94–1.44) and natural indirect effect of IRR: 1.09 (95% CI: 1.01–1.19).

TABLE 3 Medflex counterfactual mediation analysis for MACE incident rate ratios (IRR) per 1 SD increment in TMAO and dimethylglycine concentrations; proportion mediated by eGFR with bootstrap 95% confidence intervals (1,000 iterations).

Metabolite	Effect	IRR	95% lower CI	95% upper CI	Proportion mediated
TMAO	Natural direct effect	1.15	0.98	1.34	58%
	Natural indirect effect	1.22	1.10	1.34	
	Total effect	1.38	1.22	1.55	
Dimethylglycine	Natural direct effect	1.17	0.94	1.44	32%
	Natural indirect effect	1.09	1.01	1.19	
	Total effect	1.28	1.04	1.54	

MACE, major adverse cardiovascular events; TMAO, trimethylamine N-oxide; eGFR, glomerular filtration rate; CI, confidence intervals.

Discussion

This prospective cohort study of 309 patients with ACS demonstrated that baseline plasma concentrations of TMAO and dimethylglycine were associated with higher risk of MACE after a mean follow-up of 6.7 years. Notably, the strong positive associations for TMAO were attenuated and became insignificant after adjustment for eGFR. Importantly, eGFR, a marker of renal function, fully mediated the association between TMAO and MACE. Additionally, eGFR acted as a partial mediator in the relationship between dimethylglycine and MACE. No significant risk associations were observed for other TMAO precursors TMA, choline, betaine and L-carnitine.

TMAO and MACE

To our knowledge, data on the relationship between TMAO and risk of MACE in patients with ACS are limited to prospective cohort studies from USA, UK, New Zealand, China and Japan that were recently meta-analyzed and revealed pooled HR estimates of 1.87 (95% CI: 1.41, 2.47) (10). Our study is the first conducted in ACS patients from the Mediterranean region with a long follow-up and high median TMAO concentrations of 9.98 μmol/L vs. 2.87–7.50 μmol/L in the studies included in the previous meta-analysis. Differences in genetic variation, dietary habits and gut microbiota composition may have affected the concentrations of TMAO in ACS patients from different geographical locations. Our results suggested that patients with elevated plasma TMAO concentrations were at high risk of developing MACE, after extensive adjustment for traditional cardiovascular risk factors and medications. However, the association of TMAO with MACE became insignificant after adjustment for eGFR, raising the possibility the renal function may mediate this association. Of note, we found a negative correlation between TMAO and eGFR, in agreement with previous studies among patients with chronic kidney disease (CKD) (13) and the general population (17), implying that TMAO may accumulate in the circulation in patients with impaired renal function. Therefore, TMAO could be a marker of reduced renal clearance. However, studies in mice suggest that TMAO may directly contribute to decreased renal function (29). Thus, it is possible that elevated circulating concentrations of TMAO may have a direct effect on renal impairment which in turn is a

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez
Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

determinant of MACE (30). Our mediation analysis provides further evidence by documenting a strong mediating role of eGFR in the relationship between TMAO and MACE, and extend prior results on the mediating role of renal function in the association between TMAO and all-cause mortality (18). Understanding how renal function underlies the relation between TMAO and MACE risk is of great public health importance given the coexistence of reduced renal function in ACS patients (31).

Dimethylglycine and MACE

Our findings concerning the positive relationship between dimethylglycine, a product of choline metabolic pathway, and MACE incidence in ACS patients extend the current knowledge of the role of this metabolite in cardiovascular health. Although unexplored in relation to a composite of cardiovascular events, higher concentrations of this metabolite were previously found to be associated with risk of acute myocardial infarction, and hospitalization for heart failure after ACS (12), incident acute myocardial infarction in patients with stable angina pectoris (32), atrial fibrillation and heart failure in individuals at high cardiovascular risk (33) and mortality in patients with coronary heart disease (34). In our study, the association between dimethylglycine and MACE risk was non-linear and more pronounced among patients with higher dimethylglycine concentrations.

Dimethylglycine, the by-product of the betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT) reaction which catalyzes the transfer of methyl groups from betaine to homocysteine to form dimethylglycine and methionine (35), is oxidatively demethylated to sarcosine (36). Elevated concentrations of dimethylglycine could be caused either by a decreased activity of the enzyme dimethylglycine dehydrogenase that converts dimethylglycine to sarcosine or by inflammation and oxidative stress in ACS (37, 38) altering the flux through BHMT (39). It has been suggested that dimethylglycine may be related to adverse cardiovascular outcomes through its effect on the regulation of lipid and energy metabolism (32).

Adding eGFR to the Cox regression model attenuated the association between dimethylglycine and MACE risk. We also found an inverse association between plasma dimethylglycine concentrations and eGFR, in agreement with studies among patients with renal failure (40) and patients with stable angina pectoris (32). Notably, eGFR partially mediated this association offering new insight into understanding the relationship between dimethylglycine, renal function, and cardiovascular events. Given that declined renal function is a risk factor for MACE, we might speculate that there may be a synergistic relationship of increased dimethylglycine concentrations and decreased renal function with the increased risk for developing MACE.

CKD is defined for patients younger than 40 years by eGFR below 75 mL/min/1.73 m^2; between 40 and 65 years by 60 mL/min/1.73 m^2; for older than 65 years without albuminuria or proteinuria by eGFR below 45 mL/min/1.73 m^2 (41). Since the eGFR range in our sample was close to normal renal function (age 64.9 ± 12.3, eGFR 62.1–96.7), further studies are necessary to quantitate the effects of TMAO and dimethylglycine on MACE during the development of CKD.

Strengths and limitations

The main strengths of this study include its prospective design with a long-term follow-up. Furthermore, the extensive measure of metabolites involved in TMAO biosynthesis, may broaden our understanding of the metabolic processes related to TMAO pathway and the development of cardiovascular events in ACS.

With regard to limitations, even though we adjusted for many potential confounders, residual confounding by unknown or unmeasured factors may exist. For example, information about gut microbiota composition and dietary habits that could affect TMAO concentrations was not available. The generalizability of the findings is also limited to younger adults and individuals with clinical features other than ACS. Another limitation is the use of single measure of metabolites at baseline that may have limited the precision of their long-term exposure due to the within-individual variability over time (i.e., TMAO). Finally, although the associations between dimethylglycine and MACE risk were internally validated, external replication would give greater validity to the findings.

Conclusions

This prospective cohort study of ACS patients suggests that high plasma TMAO concentrations are related to the risk of developing MACE and this relationship is substantially mediated by renal function. Our results also extend previous research findings, showing that elevated dimethylglycine concentrations are associated with increased risk of MACE, and that renal function partially mediates this relationship. Understanding the potential interplay of TMAO and dimethylglycine with renal function, and incident MACE, may contribute to novel prevention and treatment efforts in ACS.

Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary material, further inquiries can be directed to the corresponding author.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL
Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez
Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

Ethics statement

The studies involving human participants were reviewed and approved by Joan XXIII University Hospital. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

Author contributions

CP and AB designed the research and were the coordinators of the study. AB recruited patients and conducted the research. CP conducted the statistical analyses. RS-G and CP drafted the paper. All authors revised the manuscript for important intellectual content, read, and approved the final version.

Funding

CP was recipient of the Instituto de Salud Carlos III Miguel Servet fellowship (Grant: CP 19/00189).

Acknowledgments

We thank Iris Samarra, Maria Guirro, Antoni del Pino, Salvador Fernández Arroyo, and Nuria Canela from the Metabolomics Facility of the Centre for Omic Sciences (COS) Joint Unit of the Universitat Rovira i Virgili-Eurecat, for their contribution to mass spectrometry analysis.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcvm.2022.1000815/full#supplementary-material

References

1. Mueller C. Biomarkers and acute coronary syndromes: an update. *Eur Heart J.* (2014) 35:552–6. doi: 10.1093/eurheartj/eht530

2. Hammer Y, Iakobishvili Z, Hasdai D, Goldenberg I, Shlomo N, Einhorn M, et al. Guideline-recommended therapies and clinical outcomes according to the risk for recurrent cardiovascular events after an acute coronary syndrome. *J Am Heart Assoc.* (2018) 7:e009885. doi: 10.1161/JAHA.118.009885

3. O'Gara PT, Kushner FG, Ascheim DD, Casey Jr DE, Chung MK, de Lemos JA, et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation.* (2013) 127:e362–425. doi: 10.1161/CIR.0b013e3182742cf6

4. Amsterdam EA, Wenger NK, Brindis RG, Casey Jr DE, Ganiats TG, Holmes Jr DR, et al. 2014 AHA/ACC guideline for the management of patients with non-ST-elevation acute coronary syndromes: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation.* (2014) 130:e344–426. doi: 10.1161/CIR.0000000000000134

5. Salvagno GL, Pavan C. Prognostic biomarkers in acute coronary syndrome. *Ann Transl Med.* (2016) 4:258. doi: 10.21037/atm.2016.06.36

6. Ali SE, Farag MA, Holvoet P, Hanafi RS, Gad MZ. A comparative metabolomics approach reveals early biomarkers for metabolic response to acute myocardial infarction. *Sci Rep.* (2016) 6:36359. doi: 10.1038/srep36359

7. Fromentin S, Forslund SK, Chechi K, Aron-Wisnewsky J, Chakaroun R, Nielsen T, et al. Microbiome and metabolome features of the cardiometabolic disease spectrum. *Nat Med.* (2022) 28:303–14. doi: 10.1038/s41591-022-01688-4

8. Sanchez-Gimenez R, Ahmed-Khodja W, Molina Y, Peiro OM, Bonet G, Carrasquer A, et al. Gut microbiota-derived metabolites and cardiovascular disease risk: a systematic review of prospective cohort studies. *Nutrients.* (2022) 14:2654. doi: 10.3390/nu14132654

9. Li XS, Obeid S, Klingenberg R, Hencer B, Mach F, Räber L, et al. Gut microbiota-dependent trimethylamine N-oxide in acute coronary syndromes: a prognostic marker for incident cardiovascular events beyond traditional risk factors. *Eur Heart J.* (2017) 38:814–24. doi: 10.1093/eurheartj/ehw582

10. Yao ME, Liao PD, Zhao XJ, Wang L. Trimethylamine-N-oxide has prognostic value in coronary heart disease: a meta-analysis and dose-response analysis. *BMC Cardiovasc Disord.* (2020) 20:7. doi: 10.1186/s12872-019-01310-5

11. Wang Z, Tang WH, Buffa JA, Fu X, Britt EB, Koeth RA, et al. Prognostic value of choline and betaine depends on intestinal microbiota-generated metabolite trimethylamine-N-oxide. *Eur Heart J.* (2014) 35:904–10. doi: 10.1093/eurheartj/ehu002

12. Lever M, George PM, Elmslie JL, Atkinson W, Slow S, Molyneux SL, et al. Betaine and secondary events in an acute coronary syndrome cohort. *PLoS ONE.* (2012) 7:e37883. doi: 10.1371/journal.pone.0037883

13. Missailidis C, Hällqvist J, Qureshi AR, Barany P, Heimbürger O, Lindholm B, et al. Serum trimethylamine-N-oxide is strongly related to renal function and predicts outcome in chronic kidney disease. *PLoS ONE.* (2016) 11:e0141738. doi: 10.1371/journal.pone.0141738

14. Guo F, Qiu X, Tan Z, Li Z, Ouyang D. Plasma trimethylamine n-oxide is associated with renal function in patients with heart failure with preserved ejection fraction. *BMC Cardiovasc Disord.* (2020) 20:394. doi: 10.1186/s12872-020-01669-w

15. Pelletier CC, Croyal M, Ene L, Aguesse A, Billon-Crossouard S, Krempf M, et al. Elevation of trimethylamine-N-oxide in chronic kidney disease: contribution of decreased glomerular filtration rate. *Toxins.* (2019) 11:635. doi: 10.3390/toxins11110635

16. Guo F, Dai Q, Zeng X, Liu Y, Tan Z, Zhang H, et al. Renal function is associated with plasma trimethylamine-N-oxide, choline, L-carnitine and betaine: a pilot study. *Int Urol Nephrol.* (2021) 53:539–51. doi: 10.1007/s11255-020-02632-6

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL
Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez
Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

17. Mueller DM, Allenspach M, Othman A, Saely CH, Muendlein A, Vonbank A, et al. Plasma levels of trimethylamine-N-oxide are confounded by impaired kidney function and poor metabolic control. *Atherosclerosis.* (2015) 243:638–44. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.10.091

18. Gruppen EG, Garcia E, Connelly MA, Jeyarajah EJ, Otvos JD, Bakker SJL, et al. TMAO is associated with mortality: impact of modestly impaired renal function. *Sci Rep.* (2017) 7:13781. doi: 10.1038/s41598-017-13739-9

19. Thygesen K, Alpert JS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD, et al. Third universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J.* (2012) 33:2551–67. doi: 10.1093/eurheartj/ehs184

20. Roffi M, Patrono C, Collet JP, Mueller C, Valgimigli M, Andreotti F, et al. 2015 ESC guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: Task force for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J.* (2016) 37:267–315. doi: 10.1093/eurheartj/ehv320

21. Schymanski EL, Jeon J, Gulde R, Fenner K, Ruff M, Singer HP, et al. Identifying small molecules via high resolution mass spectrometry: communicating confidence. *Environ Sci Technol.* (2014) 48:2097–8. doi: 10.1021/es5002105

22. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang Y, Castro III AF, Feldman HI, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med.* (2009) 150:604–12. doi: 10.7326/0003-4819-150-9-200905050-00006

23. Lange T, Hansen KW, Sørensen R, Galatius S. Applied mediation analyses: a review and tutorial. *Epidemiol Health.* (2017) 39:e2017035. doi: 10.4178/epih.e2017035

24. Steen J, Loeys T, Moerkerke B, Vansteelandt S. Medflex: an R package for flexible mediation analysis using natural effect models. *J Stat Softw.* (2017) 2017:76. doi: 10.18637/jss.v076.i11

25. Ma R, Krewski D, Burnett RT. Random effects Cox models: a Poisson modelling approach. *Biometrika.* (2003) 90:157–69. doi: 10.1093/biomet/90.1.157

26. Lambert PC, Smith LK, Jones DR, Botha JL. Additive and multiplicative covariate regression models for relative survival incorporating fractional polynomials for time-dependent effects. *Stat Med.* (2005) 24:3871–85. doi: 10.1002/sim.2399

27. Royston P, Lambert P C. *Flexible Parametric Survival Analysis Using Stata: Beyond the Cox Model.* College Station, TX: StataPress (2011).

28. Crowther MJ, Riley RD, Staessen JA, Wang J, Gueyffier F, Lambert PC. Individual patient data meta-analysis of survival data using Poisson regression models. *BMC Med Res Methodol.* (2012) 12:34. doi: 10.1186/1471-2288-12-34

29. Tang WH, Wang Z, Kennedy DJ, Wu Y, Buffa JA, Agatisa-Boyle B, et al. Gut microbiota-dependent trimethylamine N-oxide (TMAO) pathway contributes to both development of renal insufficiency and mortality risk in chronic kidney disease. *Circ Res.* (2015) 116:448–55. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.305360

30. Currie CJ, Berni ER, Berni TR, Jenkins-Jones S, Sinsakul M, Jermutus L, et al. Major adverse cardiovascular events in people with chronic kidney disease in relation to disease severity and diabetes status. *PLoS ONE.* (2019) 14:e0221044. doi: 10.1371/journal.pone.0221044

31. Marenzi G, Cabiati A, Assanelli E. Chronic kidney disease in acute coronary syndromes. *World J Nephrol.* (2012) 1:134–45. doi: 10.5527/wjn.v1.i5.134

32. Svingen GF, Ueland PM, Pedersen EKR, Schartum-Hansen H, Seifert R, Ebbing M, et al. Plasma dimethylglycine and risk of incident acute myocardial infarction in patients with stable angina pectoris. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (2013) 33:2041–8. doi: 10.1161/ATVBAHA.113.301714

33. Papandreou C, Bulló M, Hernández-Alonso P, Ruiz-Canela M, Li J, Guasch-Ferré M, et al. Choline metabolism and risk of atrial fibrillation and heart failure in the PREDIMED study. *Clin Chem.* (2021) 67:288–97. doi: 10.1093/clinchem/hvaa224

34. Svingen GF, Schartum-Hansen H, Ueland PM, Pedersen ER, Seifert R, Ebbing M, et al. Elevated plasma dimethylglycine is a risk marker of mortality in patients with coronary heart disease. *Eur J Prev Cardiol.* (2015) 22:743–52. doi: 10.1177/2047487314529351

35. Millian NS, Garrow TA. Human betaine-homocysteine methyltransferase is a zinc metalloenzyme. *Arch Biochem Biophys.* (1998) 356:93–8. doi: 10.1006/abbi.1998.0757

36. Lever M, McEntyre CJ, George PM, Chambers ST. Is N,N-dimethylglycine N-oxide a choline and betaine metabolite? *Biol Chem.* (2017) 398:775–84. doi: 10.1515/hsz-2016-0261

37. Wang H, Liu Z, Shao J, Lin L, Jiang M, Wang L, et al. Immune and inflammation in acute coronary syndrome: molecular mechanisms and therapeutic implications. *J Immunol Res.* (2020) 2020:4904217. doi: 10.1155/2020/4904217

38. Lubrano V, Pingitore A, Traghella I, Storti S, Parri S, Berti S, et al. Emerging biomarkers of oxidative stress in acute and stable coronary artery disease: levels and determinants. *Antioxidants.* (2019) 8:115. doi: 10.3390/antiox8050115

39. Strakova J, Gupta S, Kruger WD, Dilger RN, Tryon K, Li L, et al. Inhibition of betaine-homocysteine S-methyltransferase in rats causes hyperhomocysteinemia and reduces liver cystathionine β-synthase activity and methylation capacity. *Nutr Res.* (2011) 31:563–571. doi: 10.1016/j.nutres.2011.06.004

40. McGregor DO, Dellow WJ, Lever M, George PM, Robson RA, Chambers ST. Dimethylglycine accumulates in uremia and predicts elevated plasma homocysteine concentrations. *Kidney Int.* (2001) 59:2267–72. doi: 10.1046/j.1523-1755.2001.00743.x

41. Delanaye P, Glassock RJ, Pottel H, Rule AD. An age-calibrated definition of chronic kidney disease: rationale and benefits. *Clin Biochem Rev.* (2016) 37:17–26.

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

5.3 Tercer estudio

TCA cycle metabolites associated with adverse outcomes after acute coronary syndrome: mediating effect of renal function

Raul Sanchez-Gimenez, Oscar M. Peiró, Gil Bonet, Anna Carrasquer, George A. Fragkiadakis, Mònica Bulló, Christopher Papandreou and Alfredo Bardaji. Front. Cardiovasc. Med. 2023, 10, 1157325.

Resumen de resultados

Este estudio de cohorte prospectivo de 309 pacientes con SCA, de los 8 metabolitos del ciclo de TCA en plasma medidos en este estudio, las concentraciones más altas de isocitrato se asociaron consistentemente con MACE y mortalidad por todas las causas, mientras que estas asociaciones se volvieron no significativos después del ajuste por eGFR. Se obtuvieron resultados similares para el acónito y el d/l-2-hidroxiglutarato, que se asociaron positivamente con la mortalidad por todas las causas, mientras que la eGFR atenuó sustancialmente estas asociaciones. En particular, eGFR medió completamente todas las asociaciones anteriores.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez
Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

frontiers | Frontiers in Cardiovascular Medicine

TYPE Original Research
PUBLISHED 27 June 2023
DOI 10.3389/fcvm.2023.1157325

Check for updates

OPEN ACCESS

EDITED BY
Dexter Canoy,
Newcastle University, United Kingdom

REVIEWED BY
Simon Kraler,
University of Zurich, Switzerland
Hong Cheng,
Capital Medical University, China

*CORRESPONDENCE
Christopher Papandreou
✉ christoforos.papandreou@iispv.cat

†These authors have contributed equally to this work and share senior authorship

RECEIVED 02 February 2023
ACCEPTED 13 June 2023
PUBLISHED 27 June 2023

CITATION
Sanchez-Gimenez R, Peiró OM, Bonet G, Carrasquer A, Fragkiadakis GA, Bulló M, Papandreou C and Bardaji A (2023) TCA cycle metabolites associated with adverse outcomes after acute coronary syndrome: mediating effect of renal function.
Front. Cardiovasc. Med. 10:1157325.
doi: 10.3389/fcvm.2023.1157325

COPYRIGHT
© 2023 Sanchez-Gimenez, Peiró, Bonet, Carrasquer, Fragkiadakis, Bulló, Papandreou and Bardaji. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

TCA cycle metabolites associated with adverse outcomes after acute coronary syndrome: mediating effect of renal function

Raul Sanchez-Gimenez[1,2,3], Óscar M. Peiró[1,2,3], Gil Bonet[1,2,3], Anna Carrasquer[1,2,3], George A. Fragkiadakis[4], Mònica Bulló[2,5,6,7], Christopher Papandreou[2,4,5,6*†] and Alfredo Bardaji[1,2,3†]

[1]Department of Cardiology, Joan XXIII University Hospital, Tarragona, Spain, [2]Institute of Health Pere Virgili (IISPV), Tarragona-Reus, Spain, [3]Department of Medicine and Surgery, Rovira I Virgili University, Tarragona, Spain, [4]Department of Nutrition and Dietetics Sciences, School of Health Sciences, Hellenic Mediterranean University, Siteia, Greece, [5]Nutrition and Metabolic Health Research Group, Department of Biochemistry and Biotechnology, Rovira I Virgili University, Reus, Spain, [6]Center of Environmental, Food and Toxicological Technology – TecnATox, Rovira i Virgili University, Reus, Spain, [7]CIBER Physiology of Obesity and Nutrition (CIBEROBN), Carlos III Health Institute, Madrid, Spain

Aims: To examine relationships of tricarboxylic acid (TCA) cycle metabolites with risk of cardiovascular events and mortality after acute coronary syndrome (ACS), and evaluate the mediating role of renal function in these associations.
Methods: This is a prospective study performed among 309 ACS patients who were followed for a mean of 6.7 years. During this period 131 patients developed major adverse cardiovascular events (MACE), defined as the composite of myocardial infarction, hospitalization for heart failure, and all-cause mortality, and 90 deaths were recorded. Plasma concentrations of citrate, aconitate, isocitrate, succinate, malate, fumarate, α-ketoglutarate and d/l-2-hydroxyglutarate were quantified using LC-tandem MS. Multivariable Cox regression models were used to estimate hazard ratios, and a counterfactual-based mediation analysis was performed to test the mediating role of estimated glomerular filtration rate (eGFR).
Results: After adjustment for traditional cardiovascular risk factors and medications, positive associations were found between isocitrate and MACE (HR per 1 SD, 1.25; 95% CI: 1.03, 1.50), and between aconitate, isocitrate, d/l-2-hydroxyglutarate and all-cause mortality (HR per 1 SD, 1.41; 95% CI: 1.07, 1.84; 1.58; 95% CI: 1.23, 2.02; 1.38; 95% CI: 1.14, 1.68). However, these associations were no longer significant after additional adjustment for eGFR. Mediation analyses demonstrated that eGFR is a strong mediator of these associations.
Conclusion: These findings underscore the importance of TCA metabolites and renal function as conjunctive targets in the prevention of ACS complications.

KEYWORDS

tricarboxylic acid cycle, metabolomics, mass spectrometry, acute coronary syndrome, major adverse cardiovascular events, mortality

1. Introduction

Cardiovascular disease (CVD) and acute coronary syndrome (ACS) are the leading causes of morbidity and mortality worldwide causing a high health cost due to their consequences (1). Prognostic classification in patients admitted with ACS is necessary for providing efficient follow-up and guiding treatment. During the last years, many efforts

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez
Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

have been made to identify predictive biomarkers for adverse outcomes following ACS (2) and metabolomics seems a promising approach (3).

Since metabolic perturbations are frequent in ACS (4), tricarboxylic acid cycle (TCA) disturbances could be related to mitochondrial dysfunction, causing oxidative stress and introducing a pro-inflammatory state (5). The role of TCA cycle enzymes and metabolites in various human diseases, i.e., neurologic or tumoral, has received increased attention in recent years (6). Although, their role in cardiovascular development is still uncertain, recently plasma TCA cycle-related metabolites were associated with heart failure and atrial fibrillation in an older population at high CVD risk (7). However, their prognostic role in ACS is unclear.

Furthermore, TCA cycle metabolites are involved in several kidney functions (8, 9), whereas renal function is an important regulator of circulating TCA metabolites levels (10, 11), which raises the question to whether these metabolites are directly associated with risk of adverse clinical outcomes after ACS or if renal function plays potentially mediating role in these associations.

The aim of this prospective cohort study was to investigate the relationships of TCA cycle disturbances as monitored by plasma metabolites, with risk of major adverse cardiovascular events (MACE), and all-cause mortality in ACS patients and examine whether and to what extend these associations are mediated by renal function, assessed by estimated glomerular filtration rate (eGFR).

2. Materials and methods

2.1. Study design and participants

All patients provided written informed consent to participate in the study. The Institutional Ethical Committee approved the study which was conducted in accordance with the ethical principles of the Declaration of Helsinki.

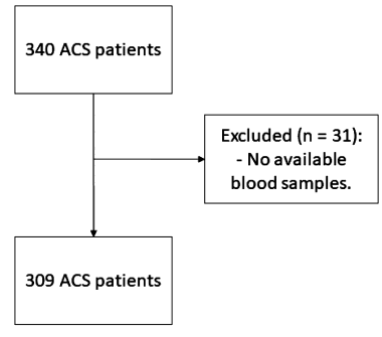

FIGURE 1
Flowchart of study participants. ACS, acute coronary syndrome.

This analysis used data from patients with ACS admitted to Joan XXIII University Hospital in Tarragona, Spain. The design and methods of this study have been described in detail elsewhere (12). Briefly, from January 2011 to May 2013, ACS patients who underwent coronary angiography and followed until 2022 were included in this study. A detailed description of the definition of ACS can be found here (12). Patients that suffered a MI other than type 1, and those with foreign residency were excluded from this study. From the initial sample of 340 patients recruited, we excluded 31 participants without blood samples (**Figure 1**).

2.2. Definitions of outcomes

Information on clinical outcomes was obtained by contacting patients every year, and by analysis of the hospital's patient-management information system [MI (ICD-10-CM I21) and hospitalization for heart failure (HF) (ICD-10-CM I50)]. MACE was defined as the composite of MI, hospitalization for HF, and all-cause mortality. All-cause mortality included cardiac, vascular (such as stroke, acute pulmonary edema, non-ischemic fatal arrythmia) and non-cardiovascular causes.

2.3. Quantification of TCA cycle metabolites

Plasma aliquots derived from blood samples (containing EDTA) collected from patients during coronary angiography have been stored at −80°C until analysis at the Biobank of the Pere Virgili Health Research Institute.

Citrate, aconitate, isocitrate, succinate, malate, fumarate, α-ketoglutarate and d/l-2-hydroxyglutarate were quantified by stable-isotope dilution method using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. For sample preparation, 100 µl plasma were mixed with 500 µl of methanol containing the mix of internal standards. Samples were vortexed and centrifuged for 10 min at 15,000 rpm and 4°C. Supernatants were evaporated in a SpeedVac concentrator at 45°C. Samples were reconstituted with 100 µl of 0.9% formic acid and separated in two glass vials for their analysis. In the case of fumarate, α-ketoglutarate and 2-hydroxyglutarate determination, samples were diluted with acetonitrile. To separate citrate, aconitate, isocitrate, succinate and malate, samples were chromatographed on an Atlantis Premier BEH C18 AX 1.7 µm, 2.1 mm × 100 mm (Waters, Milford, MA, USA) and in junction with a UHPLC 1290 Infinity II (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The gradient consisted of 100% A for 1.4 min, to 40% A and 0% B at 1.5 min, to 17% A and 23% B at 3.51 min, to 0% A and 40% B at 4.00 min, kept 0% A and 40% B for.0.3 min, to 5% A and 95% B at 4.4 min and 5% A and 95% B for 0.1 min. Mobile phase A was composed of 0.9% formic acid in water, mobile phase B was 0.9% formic acid in acetonitrile and mobile phase C was 50 mm ammonium formate and 0.9% formic acid in water. Flow rate was kept constant at 0.35 ml/min, and the column manager was set at 30°C for the duration of the sequence. To separate fumarate, α-ketoglutarate and 2-hydroxyglutarate, samples were chromatographed on an ACQUITY UPLC BEH Amide,

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez
Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

1.7 µm, 2.1 mm × 150 mm (Waters, Milford, MA, USA) and in junction with a UHPLC 1290 Infinity II (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The gradient consisted of 80% A for 2 min, to 50% A at 7 min, to 80% A at 7.1 min and 80% A for 2.9 min. Mobile phase A was composed of 10 mm ammonium acetate 0.05% ammonium hydroxide; mobile phase B was acetonitrile. Flow rate was kept constant at 0.5 ml/min, and the column manager was set at 40°C for the duration of the sequence. Agilent QqQ/MS 6490 Series with an electrospray ionization probe operating in negative ion mode was used for mass spectrometric analysis. The source conditions were set at 55 psi for the nebulizer gas, 120°C for the gas temperature, 20 L/min for the gas flow, 350° C for the sheath gas temperature, 11 L/min for the sheath gas flow, 1,100 V for the capillary voltage, and 500 V for the nozzle voltage. Detailed information of the quantitative determination for each compound and the mass to charge ratio and retention time are shown in **Supplementary Table S1** (13). Assay quality assurance was monitored by routine analysis of pooled quality control plasma. The metabolite identification confidence level according to the published criteria (14) is Level 1: confirmed structure with MS, MS^2, RT and reference standard.

2.4. Covariates

During hospital admission, demographics, clinical risk factors, previous medical conditions and medication use were registered. Participants were considered having type 2 diabetes (T2D), dyslipidemia, or hypertension if they had previously been diagnosed and/or used medications such as antidiabetic, cholesterol-lowering, or antihypertensive agents. Body mass index (BMI) was estimated as weight divided by height squared (kg/m^2). The Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration creatinine equation was used to calculate eGFR (15).

2.5. Statistical analyses

Baseline characteristics of study participants are described as means and standard deviations (SD) or medians and interquartile ranges for quantitative variables, and percentages for categorical variables. Importantly, our study had no missing data, and complete data were available for all participants included in the analysis. A natural logarithmic transformation was performed to approximate a normal distribution of metabolites' concentrations. In the following analyses, metabolites were analyzed as both continuous variables [1-standard deviation (SD) (1-SD) increment in their ln-transformed levels] and by using tertiles.

A crude and 2 multivariable Cox proportional hazards models were used for time-to-event analysis to determine hazard ratios (HRs) and 95% confidence intervals (CIs) for MACE and all-cause mortality. We checked the proportionality assumption of Cox regression by examining the Schoenfeld residuals and found that the proportional hazards assumption was not violated.

The first multivariable Cox regression model (multivariable model 1) was adjusted for age, sex, BMI (kg/m^2), smoking (never, current, or former), hypertension (yes or no), dyslipidemia (yes or no), T2D (yes or no), unstable angina (yes or no), acute ST-segment elevation myocardial infarction (yes or no), non-ST-segment elevation acute myocardial infarction (yes or no), statin medication (yes or no), beta-blockers (yes or no), oral antidiabetic medication (yes or no), insulin medication (yes or no), diuretics (yes or no), and aspirin (yes or no). The second multivariable model (multivariable model 2) was additionally adjusted for eGFR to further assess the effect of renal function. We also examined associations of eGFR with MACE and all-cause mortality fitting the multivariable model 1 and further adjusting this model with each TCA cycle metabolite. To account for multiple testing, we adjusted P values of the crude and multivariable models with the use of the Benjamini-Hochberg false discovery rate procedure. Spearman's correlation analyses were performed to investigate whether there was a relationship between circulating levels of TCA cycle metabolites and eGFR. To test the robustness of our results related to model's overfitting, Weibull survival regression modelling was used. Cubic splines were used to fit the Cox regression models in order to examine non-parametric associations. Tests for non-linearity involved conducting a likelihood ratio test to compare the model with only the linear term to the model with both the linear and cubic spline terms. These analyses were performed using Stata 14.1 (Stata Corp.), at a two-tailed α of 0.05.

The mediating role of eGFR on the relationship between plasma metabolites and MACE or all-cause mortality was tested under a counterfactual framework (16). By performing this analysis using the R package "medflex" (17), the total effect of metabolites on MACE risk can be decomposed into a natural direct effect of metabolites on MACE or mortality risk and a natural indirect effect of metabolites accounted by the effect of the putative mediators, in our case the eGFR. The 95% confidence intervals were derived using bootstrapping with 1,000 replications. The mediation analysis was performed using Poisson based Generalized Linear Models by splitting the follow-up time every time an event was observed [survSplit() function in the survival package] in such a way every time interval contains only one event and thereafter we estimated the effects of the model parameters (18) as Cox regression models are currently not implemented in "medflex". To approximate more the Cox results we added a time term to the Poisson model (19). We included all variables from the multivariable model 1 as covariates to adjust for the mediating effect of eGFR on the associations between TCA cycle metabolites and clinical outcomes. The mediated proportion was calculated as natural indirect log-incident rate ratios (IRR) divided by total effect log-IRR. This analysis was performed using R version 4.2.0 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

3. Results

3.1. Baseline characteristics of patients

Patients' characteristics are summarized in **Table 1**. The majority of them were men (71.2%) and the mean age and eGFR of patients

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL
Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez
Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS
EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

TABLE 1 Baseline characteristics of the patients in the cohort.

Characteristics	Patients ($N = 309$)
Age (years)	64.9 ± 12.3
Sex, %	
Women	28.8
Men	71.2
Body mass index, kg/m^2	28.1 ± 4.0
eGFR (ml/min/1.73 m^2)	81.3 (62.1–96.7)
Type 2 diabetes, %	37.2
Hypertension, %	67.6
Dyslipidemia, %	60.8
Smoking, %	
Never	35.6
Former	33.9
Current	30.4
Discharge diagnostic, %	
Unstable angina	15.9
STEMI	22.0
NSTEMI	62.0
Medications, %	
Statins	50.5
Beta-blockers	30.4
Aspirin	40.5
Diuretics	25.2
Oral antidiabetic agents	22.7
Insulin medication	8.7
Metabolites	
Succinate, µmol/L	3.26 (2.48–3.99)
Fumarate, µmol/L	0.86 (0.71–1.05)
Malate, µmol/L	6.15 (4.99–7.84)
Citrate, µmol/L	86.26 (70.76–104.20)
Aconitate, µmol/L	2.02 (1.65–2.48)
Isocitrate, µmol/L	2.61 (1.87–3.63)
α-Ketoglutaric acid, µmol/L	9.25 (7.61–11.34)
d/l-2-Hydroxyglutarate, µmol/L	0.58 (0.45–0.81)

Continuous data are presented as mean ± standard deviation or median (interquartile range), and categorical variables are presented as %.
eGFR, estimated glomerular filtration rate; STEMI, ST elevation myocardial infarction; NSTEMI, non-ST elevation myocardial infarction; TMAO, trimethylamine N-oxide; TMA, trimethylamine.

were 64.9 years, and 81.3 ml/min/1.73 m^2, respectively. The majority of them had hypertension (67.6%) and dyslipidemia (60.8%). The prevalence of T2D was 37.2%, while current and former smokers were 30.4% and 33.9%, respectively. Of all patients, 62.0% were admitted with NSTEMI, 22.0% with STEMI and 15.9% with unstable angina. The median (interquartile range) of metabolites' concentrations can also be seen in Table 1.

3.2. Associations with the risk of MACE

During a mean follow-up time of 6.7 years (SD = 3.6), there were 131 incident MACE cases. In multivariable analyses, eGFR was associated with incident MACE (Supplementary Table S2). After further adjustment for TCA cycle metabolites, these associations were not attenuated. The associations between TCA cycle metabolites and MACE risk are displayed in Table 2. In the crude model, the estimated HR for incident MACE reached significance in the highest, compared with the lowest tertile of plasma concentrations of malate, aconitate, isocitrate and d/l-2-hydroxyglutarate, and these significant associations remained when these metabolites were treated as continuous (per 1 SD increment). However, in the multivariable model 1, only isocitrate remained significant (HR per 1 SD increment: 1.25; 95% CI: 1.03, 1.50; $P = 0.020$), while this association did not remain significant after accounting for multiple comparisons or Weibull survival analysis (Supplementary Table S3). Further adjustment for eGFR attenuated the associations between isocitrate and MACE. Spearman's correlation analyses revealed significant negative correlations between the majority of TCA cycle metabolites and eGFR levels (Supplementary Figure S1). No evidence for non-linearity in the association between isocitrate and MACE was found (P-value = 0.507) (Supplementary Figure S2).

3.3. Associations with the risk of all-cause mortality

During a mean follow-up period of 7.8 years (SD = 3.1), 90 deaths were recorded, of which 35 were specifically attributed to cardiovascular causes. eGFR was significantly associated with all-cause mortality in the multivariable models (Supplementary Table S2). The associations between TCA cycle metabolites and all-cause mortality are shown in Table 3. In the multivariable model 1, the estimated HR for all-cause mortality reached significance only in the highest, compared with the lowest, tertile of plasma concentrations of d/l-2-hydroxyglutarate [2.20 (95% CI: 1.21, 3.98; P trend = 0.009). Significant positive associations with mortality were observed for aconitate, isocitrate and d/l-2-hydroxyglutarate when were modeled continuously (per 1 SD) (HR: 1.41; 95% CI: 1.07, 1.84; $P = 0.014$, HR: 1.58; 95% CI: 1.23, 2.02; $P < 0.001$ and HR: 1.38; 95% CI: 1.14, 1.68; $P < 0.001$, respectively). The associations between these metabolites and mortality persisted and remained significant after sensitivity analysis (Supplementary Table S4). These associations remained significant after accounting for multiple comparisons. However, these associations did not remain significant after inclusion of eGFR into the Cox regression model 1. Also, there was no evidence of non-linearity in these associations (P-value >0.05) (Supplementary Figure S3).

3.4. Mediation of the association between TCA cycle metabolites, MACE and all-cause mortality

The mediation analyses were performed to assess the mediating role of eGFR in the relationships of TCA cycle metabolites with MACE and all-cause mortality. Results from these analyses are displayed in Table 4. A substantial proportion (75%) of the total effect of isocitrate (per 1-SD increase) on risk for MACE was mediated through eGFR, with natural direct effect of IRR: 1.08

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez
Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

TABLE 2 Associations of baseline individual metabolites concentrations with the risk of MACE[a].

		Tertiles of plasma metabolite concentrations					
Metabolite	T1	T2	T3	*P* trend	HR per 1 SD increment	*P* value	FDR-adjusted *P* value
Succinate							
Concentrations (μmol/L)	<2.66	2.66–<3.69	≥3.69				
Cases	41	40	50				
Crude model	Ref.	0.87 (0.56–1.35)	1.22 (0.81–1.84)	0.338	1.10 (0.92–1.33)	0.292	0.333
MV1	Ref.	0.66 (0.41–1.08)	0.93 (0.59–1.46)	0.904	0.97 (0.80–1.19)	0.801	0.958
MV2	Ref.	0.70 (0.43–1.13)	0.88 (0.56–1.40)	0.688	0.95 (0.78–1.16)	0.605	0.806
Fumarate							
Concentrations(μmol/L)	<0.76	0.76–<0.97	≥0.97				
Cases	36	47	48				
Crude model	Ref.	1.36 (0.88–2.12)	1.48 (0.96–2.28)	0.090	1.23 (1.03–1.47)	**0.019**	**0.030**
MV1	Ref.	1.14 (0.69–1.88)	0.88 (0.54–1.44)	0.472	0.98 (0.81–1.20)	0.865	0.958
MV2	Ref.	1.12 (0.69–1.80)	0.69 (0.41–1.16)	0.100	0.88 (0.71–1.09)	0.247	0.806
Malate							
Concentrations (μmol/L)	<5.35	5.35–<7.27	≥7.27				
Cases	36	45	50				
Crude model	Ref.	1.39 (0.90–2.14)	1.78 (1.14–2.76)	**0.011**	1.33 (1.12–1.59)	**0.001**	**0.002**
MV1	Ref.	1.04 (0.62–1.74)	1.12 (0.67–1.88)	0.632	1.09 (0.89–1.33)	0.416	0.958
MV2	Ref.	0.95 (0.57–1.56)	0.86 (0.51–1.46)	0.562	0.98 (0.79–1.21)	0.833	0.833
Citrate							
Concentrations (μmol/L)	<75.34	75.34–<97.52	≥97.52				
Cases	44	40	47				
Crude model	Ref.	0.95 (0.63–1.50)	1.22 (0.81–1.84)	0.321	1.17 (0.98–1.41)	0.087	0.116
MV1	Ref.	0.75 (0.46–1.22)	0.68 (0.41–1.13)	0.152	0.95 (0.76–1.19)	0.672	0.958
MV2	Ref.	0.73 (0.45–1.17)	0.64 (0.39–1.07)	0.103	0.92 (0.73–1.15)	0.446	0.806
Aconitate							
Concentrations (μmol/L)	<1.79	1.79–<2.26	≥2.26				
Cases	32	41	58				
Crude model	Ref.	1.44 (0.90–2.29)	2.59 (1.66–4.03)	**<0.001**	1.44 (1.21–1.72)	**<0.001**	**0.002**
MV1	Ref.	1.14 (0.68–1.91)	1.64 (0.96–2.83)	0.060	1.20 (0.99–1.47)	0.065	0.260
MV2	Ref.	1.06 (0.64–1.78)	1.42 (0.81–2.48)	0.192	1.07 (0.85–1.34)	0.569	0.806
Isocitrate							
Concentrations (μmol/L)	<2.11	2.11–<3.19	≥3.19				
Cases	32	43	56				
Crude model	Ref.	1.61 (1.02–2.56)	2.52 (1.62–3.92)	**<0.001**	1.47 (0.23–1.75)	**<0.001**	**0.002**
MV1	Ref.	1.22 (0.71–2.08)	1.50 (0.88–2.56)	0.131	1.25 (1.03–1.50)	**0.020**	0.160
MV2	Ref.	1.17 (0.69–2.00)	1.28 (0.73–2.24)	0.411	1.11 (0.90–1.38)	0.334	0.806
α–Ketoglutaric acid							
Concentrations (μmol/L)	<8.06	8.06–<10.36	≥10.36				
Cases	41	46	44				
Crude model	Ref.	1.12 (0.73–1.71)	1.15 (0.74–1.78)	0.540	1.01 (0.85–1.19)	0.910	0.910
MV1	Ref.	1.18 (0.72–1.93)	1.17 (0.72–1.91)	0.552	0.99 (0.81–1.22)	0.958	0.958
MV2	Ref.	1.15 (0.71–1.85)	1.08 (0.66–1.78)	0.787	0.97 (0.79–1.19)	0.781	0.833
d/l-2-Hydroxyglutarate							
Concentrations (μmol/L)	<0.49	0.49–<0.72	≥0.72				
Cases	35	46	50				
Crude model	Ref.	1.53 (0.99–2.37)	1.68 (1.09–2.58)	**0.030**	1.26 (1.07–1.49)	**0.005**	**0.010**
MV1	Ref.	1.25 (0.74–2.12)	1.14 (0.69–1.86)	0.803	1.02 (0.85–1.23)	0.802	0.958
MV2	Ref.	1.13 (0.67–1.91)	0.88 (0.51–1.49)	0.422	0.89 (0.72–1.10)	0.288	0.806

FDR, false discovery rate; MV, multivariable; Ref, reference; MACE, major adverse cardiovascular events.
Bold text indicates statistically significant *P* values. FDR-controlled adjustments were conducted by applying the method of Benjamini and Hochberg.
[a]Values are HR (95% CI). A natural logarithmic transformation was applied to the raw values of individual metabolites. Cox regression analysis was used. MV1 adjusted for age, sex, body mass index (kg/m^2), smoking, hypertension, dyslipidemia, type 2 diabetes, unstable angina, acute ST-segment elevation myocardial infarction, non-ST-segment elevation acute myocardial infarction, statin medication, beta-blockers, oral antidiabetic medication, insulin medication, diuretics, aspirin. MV2 additionally adjusted for estimated glomerular filtration rate.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez
Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

TABLE 3 Associations of baseline individual metabolites concentrations with the risk of all-cause mortality[a].

		Tertiles of plasma metabolite concentrations					
Metabolite	T1	T2	T3	*P* trend	HR per 1 SD increment	*P* value	FDR-adjusted *P* value
Succinate							
Concentrations (μmol/L)	<2.66	2.66–<3.69	≥3.69				
Cases	28	26	36				
Crude model	Ref.	0.81 (0.47–1.39)	1.19 (0.73–1.94)	0.451	1.10 (0.88–1.38)	0.404	0.461
MV1	Ref.	0.61 (0.33–1.10)	0.85 (0.48–1.52)	0.688	0.96 (0.73–1.25)	0.738	0.738
MV2	Ref.	0.62 (0.36–1.09)	0.76 (0.43–1.35)	0.421	0.90 (0.70–1.16)	0.435	0.597
Fumarate							
Concentrations(μmol/L)	<0.76	0.76–<0.97	≥0.97				
Cases	24	32	34				
Crude model	Ref.	1.40 (0.82–2.38)	1.61 (0.96–2.72)	0.079	1.36 (1.10–1.67)	**0.004**	**0.006**
MV1	Ref.	0.84 (0.45–1.58)	0.68 (0.35–1.30)	0.230	0.95 (0.74–1.21)	0.674	0.738
MV2	Ref.	0.66 (0.37–1.19)	0.42 (0.21–0.83)	0.015	0.76 (0.56–1.03)	0.077	0.298
Malate							
Concentrations (μmol/L)	<5.35	5.35–<7.27	≥7.27				
Cases	21	32	37				
Crude model	Ref.	1.78 (1.03–3.08)	2.17 (1.26–3.74)	**0.007**	1.54 (1.26–1.88)	**<0.001**	**0.002**
MV1	Ref.	1.01 (0.52–1.96)	0.96 (0.51–1.82)	0.870	1.12 (0.87–1.45)	0.376	0.601
MV2	Ref.	0.92 (0.50–1.70)	0.63 (0.32–1.23)	0.118	0.95 (0.73–1.24)	0.714	0.714
Citrate							
Concentrations (μmol/L)	<75.34	75.34–<97.52	≥97.52				
Cases	25	26	39				
Crude model	Ref.	1.21 (0.69–2.14)	1.88 (1.14–3.10)	**0.010**	1.36 (1.09–1.69)	**0.006**	**0.008**
MV1	Ref.	0.62 (0.32–1.19)	0.53 (0.28–1.03)	0.078	0.84 (0.62–1.13)	0.244	0.488
MV2	Ref.	0.62 (0.32–1.21)	0.53 (0.27–1.03)	0.075	0.79 (0.59–1.08)	0.138	0.298
Aconitate							
Concentrations (μmol/L)	<1.79	1.79–<2.26	≥2.26				
Cases	16	27	47				
Crude model	Ref.	1.98 (1.05–3.75)	4.26 (2.40–7.56)	**<0.001**	1.85 (1.48–2.29)	**<0.001**	**0.002**
MV1	Ref.	0.88 (0.41–1.89)	1.34 (0.65–2.74)	0.269	1.41 (1.07–1.84)	**0.014**	**0.037**
MV2	Ref.	0.73 (0.35–1.52)	1.00 (0.49–2.05)	0.666	1.12 (0.84–1.48)	0.448	0.597
Isocitrate							
Concentrations (μmol/L)	<2.11	2.11–<3.19	≥3.19				
Cases	13	29	48				
Crude model	Ref.	2.92 (1.50–5.70)	6.18 (3.31–11.54)	**<0.001**	1.98 (1.56–2.50)	**<0.001**	**0.002**
MV1	Ref.	1.21 (0.51–2.85)	1.87 (0.85–4.12)	**0.046**	1.58 (1.23–2.02)	**<0.001**	**0.004**
MV2	Ref.	1.03 (0.44–2.41)	1.47 (0.66–3.26)	0.157	1.25 (0.95–1.06)	0.106	0.298
α-Ketoglutaric acid							
Concentrations (μmol/L)	<8.06	8.06–<10.36	≥10.36				
Cases	28	32	30				
Crude model	Ref.	1.16 (0.69–1.93)	1.14 (0.68–1.92)	0.632	0.98 (0.80–1.20)	0.846	0.846
MV1	Ref.	1.33 (0.72–2.44)	1.02 (0.59–1.75)	0.951	0.92 (0.73–1.17)	0.509	0.678
MV2	Ref.	1.34 (0.74–2.42)	1.01 (0.59–1.71)	0.892	0.94 (0.74–1.19)	0.614	0.701
d/l-2-Hydroxyglutarate							
Concentrations (μmol/L)	<0.49	0.49–<0.72	≥0.72				
Cases	17	29	44				
Crude model	Ref.	1.96 (1.10–3.49)	3.27 (1.89–5.67)	**<0.001**	1.62 (1.34–1.95)	**<0.001**	**0.002**
MV1	Ref.	1.44 (0.77–2.70)	2.20 (1.21–3.98)	**0.009**	1.38 (1.14–1.68)	**0.001**	**0.004**
MV2	Ref.	1.44 (0.78–2.66)	1.71 (0.94–3.11)	0.117	1.16 (0.95–1.42)	0.149	0.298

FDR, false discovery rate; MV, multivariable; Ref, reference.
Bold text indicates statistically significant *P* values. FDR-controlled adjustments were conducted by applying the method of Benjamini and Hochberg.
[a]Values are HR (95% CI). A natural logarithmic transformation was applied to the raw values of individual metabolites. Cox regression analysis was used. MV1 adjusted for age, sex, body mass index (kg/m^2), smoking, hypertension, dyslipidemia, type 2 diabetes, unstable angina, acute ST-segment elevation myocardial infarction, non-ST-segment elevation acute myocardial infarction, statin medication, beta-blockers, oral antidiabetic medication, insulin medication, diuretics, aspirin. MV2 additionally adjusted for estimated glomerular filtration rate.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez
Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

TABLE 4 Medflex counterfactual mediation analysis for MACE and all-cause mortality incident rate ratios (IRR) per 1 SD increment in TCA metabolites concentrations; proportion mediated by eGFR with bootstrap 95% confidence intervals (1,000 iterations).

Metabolite	Effect	IRR	95% Lower CI	95% Upper CI	Proportion mediated
MACE					
Isocitrate	Natural direct effect	1.08	0.90	1.28	75%
	Natural indirect effect	1.27	1.14	1.46	
	Total effect	1.38	1.19	1.58	
All-cause mortality					
Aconitate	Natural direct effect	1.18	0.92	1.44	67%
	Natural indirect effect	1.42	1.24	1.72	
	Total effect	1.68	1.41	1.91	
Isocitrate	Natural direct effect	1.22	0.97	1.50	63%
	Natural indirect effect	1.43	1.23	1.73	
	Total effect	1.74	1.50	2.01	
d/l-2-Hydroxyglutarate	Natural direct effect	1.20	0.96	1.47	58%
	Natural indirect effect	1.32	1.20	1.46	
	Total effect	1.58	1.32	1.88	

MACE, major adverse cardiovascular events; TCA, tricarboxylic acid cycle; eGFR, estimated glomerular filtration rate; CI, confidence intervals.

(95% CI: 0.90–1.28) and natural indirect effect of IRR: 1.27 (95% CI: 1.14–1.46). Similarly, significant indirect effects on all-cause of mortality were found for aconitate, isocitrate and d/l-2-hydroxyglutarate (per 1-SD increase in their respective concentrations).

The magnitude of mediation was 67% for aconitate, 63% for isocitrate and 58% for d/l-2-hydroxyglutarate, with natural direct effects of IRR: 1.18 (95% CI: 0.92–1.44), IRR: 1.22 (95% CI: 0.97–1.50) and IRR: 1.20 (95% CI: 0.96–1.47), respectively, whereas the natural indirect effects of IRR were: 1.42 (95% CI: 1.24–1.72), 1.43 (95% CI: 1.23–1.73) and 1.32 (95% CI: 1.20–1.46), respectively.

4. Discussion

Of the 8 plasma TCA cycle metabolites measured at baseline, higher concentrations of isocitrate were consistently associated with MACE and all-cause mortality, while these associations became insignificant after adjustment for eGFR. Similar results were obtained for aconitate and d/l-2-hydroxyglutarate, that were found positively associated with all-cause mortality, while eGFR substantially attenuated these associations. Notably, eGFR fully mediated all above associations.

Recently, we analyzed trimethylamine-N-oxide (TMAO) and its precursors with risk of cardiovascular events in this population and demonstrated that both TMAO and dimethylglycine were positively associated with MACE (12). Furthermore, eGFR fully and partially mediated the associations of TMAO and dimethylglycine with MACE, respectively. Our results extend these findings which might be of interest in scaling back the clinical meaning of performing such expensive determinations in the attempt of finding robust predictors of adverse outcomes after ACS.

The mitochondrial TCA cycle function in heart and skeletal muscle is to oxidize the acetyl group of acetyl-CoA and to generate reducing equivalents (NADH2), which are used for the re-synthesis of ATP (20). Dysregulations of the TCA cycle have been associated to oxidative stress that could induce myocardial dysfunction and pro-inflammation (7, 21). Dysfunctional mitochondria can initiate the intrinsic mechanism of apoptosis of cardiomyocytes (22). In fact, this mechanism plays an important role on cardiac remodeling, when apoptotic and necrotic cardiomyocytes are replaced by fibroblasts in process of heart scarring induced worst prognosis (23). Furthermore, accumulation of TCA metabolites in different biological samples has been associated with hypertension (24), T2D (25), overweight and unfavourable lipidemic profile (26).

To our knowledge, our study is the first conducted in ACS patients from the Mediterranean region, with a long follow-up and demonstrated that patients with elevated plasma concentrations of isocitrate, had a higher risk of developing MACE after adjustment for several traditional cardiovascular risk factors and medications. Elevated plasma isocitrate levels may reflect mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP)+-isocitrate dehydrogenase inactivity. This enzyme catalyzes the oxidative decarboxylation of isocitrate producing a-ketoglutarate, regulates cardiomyocyte energy and redox status potentially contributing to cardiomyopathy (27). Shiomi et al. (28) conducted an experimental study in rabbits to find possible novel biomarkers that predict CVD and atherosclerosis. Coronary arteries from 363 rabbits were examined and classified concerning severity, using the ratio of the surface area of the atherotic lesions to the surface area of the entire lumen. The rabbits with severe atherosclerosis had significantly higher levels of isocitrate. Arterial stiffness, associated with atherosclerosis also, is strongly associated with an increase in the likelihood of a future new onset cardiovascular events, disease recurrence, or progression of CVD (29). Haam et al. (30) reported an association of elevated urine levels of isocitrate in 330 Korean patients with increased arterial stiffness. In a previous study conducted among 2,324 patients who underwent coronary angiography significant metabolic differences were found between patients with and

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez
Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

without coronary artery disease (31). The TCA cycle was detected to be down-regulated and significantly associated with CVD. A recent case-control study conducted by Watany et al. (32) included 120 ACS patients and 120 healthy controls. They analyzed mitochondrial isocitrate dehydrogenase (IDH2) genetic isoforms and their variations were found to be an independent risk factor for acute myocardial infarction. This indicated a potential mechanism where higher levels of isocitrate due to this enzymatic dysfunction can induce an accumulation of intracellular free radicals mediating inflammation, lipid peroxidation and vascular dysfunction.

The two stereoisomers of 2-hydroxyglutarate are normally converted to 2-oxoglutarate in the mitochondrial matrix, to be metabolized by the TCA cycle. Findings from few observational studies suggest that aconitate, hydroxyglutarate (7) and 2-oxoglutarate (33) accumulation may indicate a disease state and suggest their potential clinical utility as biomarkers of metabolic stress or metabolic remodeling in disease. In addition, increased urine isocitrate and hydroxymethylglutarate concentrations were independently associated with brachial-ankle pulse wave velocity (34). Our study is the first to demonstrate that higher plasma concentrations of aconitate and d/l-2-hydroxyglutarate were associated with all-cause mortality. These metabolites were recently associated with higher risk of atrial fibrillation and HF in an elderly Mediterranean population (7).

Notably, eGFR substantially mediated these associations offering new insight into understanding the relationship between TCA metabolites, renal function, and adverse outcomes in ACS. Of note, we found negative correlations between isocitrate, aconitate and hydroxyglutarate with eGFR. A previous study also found negative correlations between plasma isocitrate and eGFR in CKD patients (35), and in another study a reduced urinary excretion of aconitate was observed in CKD (10). The involvement of TCA cycle metabolites in kidney diseases is well known (9). The renal function of our study population was mainly in a clinically normal range. CKD, also known as chronic kidney failure, is defined for patients younger than 40 years by eGFR below 75 ml/min/1.73 m^2; between 40 and 65 years by 60 ml/min/1.73 m^2; for older than 65 years without albuminuria or proteinuria by eGFR below 45 ml/min/1.73 m^2 (36). Since the eGFR range in our sample was close to what is considered a normal renal function (age 64.9 ± 12.3, eGFR 62.1–96.7) it is reasonable to postulate that dysregulation of TCA cycle metabolism has preceded the development of kidney disease (9). Given that declined renal function is presented after ACS and is one of the main risk factors for cardiovascular outcomes and mortality (37), our results suggest that TCA cycle metabolites are associated with higher risk of clinical outcomes following ACS possibly due to renal decline. The causative mechanisms by which impaired kidney function contributes to cardiovascular diseases are not fully elucidated. CKD itself is considered a risk factor for ventricular and vascular remodeling and may serve to exacerbate the effects of other risk factors. Other possible mediators are: oxidative stress, inflammation, increased leptin, and/or activation of the renin-angiotensin system induced by renal impairment (38). eGFR emerges as practical and cost-effective marker that can be readily utilized for risk stratification in clinical practice. While adjusting for eGFR may reduce the direct prognostic significance of TCA metabolites, it is crucial to recognize the importance of profiling these metabolites for better understanding of underlying mechanisms with potential future implications in the management of ACS.

In addition to TCA cycle metabolites, other molecules such as soluble LOX-1, Cathepsin S, and LDL-electronegativity have also emerged as promising biomarkers for the prediction of adverse events in ACS (39–41), offering valuable insights into endothelial dysfunction, proteolytic activity, lipoprotein characteristics, and atherosclerosis-related processes. By integrating these biomarkers with the analysis of TCA cycle metabolites, a more comprehensive picture of the pathophysiology and risk assessment in ACS can be achieved.

4.1. Strengths and limitations

The main strengths of this study include its prospective design with a long-term follow-up, and without drop-outs and the analysis of several TCA cycle metabolites providing a broader understanding of the metabolic processes related to TCA and clinical outcomes. With regard to limitations, the findings of the present study cannot be generalized to younger adults and individuals with clinical features other than ACS. Furthermore, residual and unmeasured confounding may exist. Replication of the findings in an independent cohort study would strengthen the study conclusions.

5. Conclusions

In conclusion, we found that higher plasma TCA cycle metabolites including isocitrate, aconitate and d/l-2-hydroxyglutarate were associated with risk of MACE and all-cause mortality in ACS patients. Furthermore, mediation analyses demonstrated that eGFR is a strong mediator in these associations. While we acknowledge the potential confounding effect of eGFR, we undertook appropriate adjustments in our analyses, which enhanced the robustness of our findings. The identification of eGFR as mediator sheds light on the connection between TCA metabolites and adverse events in ACS. These findings underscore the significance of considering both TCA metabolites and renal function as conjunctive targets in the prevention of ACS complications.

Data availability statement

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez
Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

Ethics statement

The studies involving human participants were reviewed and approved by Institutional Ethical Committee. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

Author contributions

CP and AB designed the research and were the coordinators of the study; AB recruited patients and conducted the research; RS-G and CP conducted the statistical analyses; RS-G and CP drafted the paper; all the authors revised the manuscript for important intellectual content, and read and approved the final version. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

CP is recipient of the Instituto de Salud Carlos III Miguel Servet fellowship (grant CP 19/00189).

Acknowledgments

We thank Iris Samarra, Maria Guirro, Antoni del Pino, Salvador Fernández Arroyo and Nuria Canela from the Metabolomics facility of the Centre for Omic Sciences (COS) joint Unit of the Universitat Rovira i Virgili-Eurecat, for their contribution to mass spectrometry analysis.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcvm.2023.1157325/full#supplementary-material

References

1. Roth GA, Mensah GA, Johnson CO, Addolorato G, Ammirati E, Baddour LM, et al. Global burden of cardiovascular diseases and risk factors, 1990–2019. *J Am Coll Cardiol.* (2020) 76(25):2982–3021. doi: 10.1016/j.jacc.2020.11.010

2. Forman DE, de Lemos JA, Shaw LJ, Reuben DB, Lyubarova R, Peterson ED, et al. Cardiovascular biomarkers and imaging in older adults. *J Am Coll Cardiol.* (2020) 76 (13):1577–94. doi: 10.1016/j.jacc.2020.07.055

3. Surendran A, Atefi N, Zhang H, Aliani M, Ravandi A. Defining acute coronary syndrome through metabolomics. *Metabolites.* (2021) 11(10):685. doi: 10.3390/metabo11100685

4. Ali SE, Atefi N, Zhang H, Aliani M, Ravandi A. A comparative metabolomics approach reveals early biomarkers for metabolic response to acute myocardial infarction. *Sci Rep.* (2016) 6(1):36359. doi: 10.1038/srep36359

5. Martínez-Reyes I, Chandel NS. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nat Commun.* (2020) 11(1):102. doi: 10.1038/s41467-019-13668-3

6. Kang W, Suzuki M, Saito T, Miyado K. Emerging role of TCA cycle-related enzymes in human diseases. *Int J Mol Sci.* (2021) 22(23):13057. doi: 10.3390/ijms222313057

7. Bulló M, Papandreou C, García-Gavilán J, Ruiz-Canela M, Li J, Guasch-Ferré M, et al. Tricarboxylic acid cycle related-metabolites and risk of atrial fibrillation and heart failure. *Metab Clin Exp.* (2021) 125:154915. doi: 10.1016/j.metabol.2021.154915

8. Sharma K, Karl B, Mathew AV, Gangoiti JA, Wassel CL, Saito R, et al. Metabolomics reveals signature of mitochondrial dysfunction in diabetic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* (2013) 24(11):1901–12. doi: 10.1681/asn.2013020126

9. Jiménez-Uribe AP, Hernández-Cruz A, Ramírez-Magaña KJ, Pedraza-Chaverri J. Involvement of tricarboxylic acid cycle metabolites in kidney diseases. *Biomolecules.* (2021) 11(9):1259. doi: 10.3390/biom11091259

10. Hallan S, Afkarian M, Zelnick LR, Kestenbaum B, Sharma S, Saito R, et al. Metabolomics and gene expression analysis reveal down-regulation of the citric acid (TCA) cycle in non-diabetic CKD patients. *EBioMedicine.* (2017) 26:68–77. doi: 10.1016/j.ebiom.2017.10.027

11. Kang HM, Afkarian M, Zelnick LR, Kestenbaum B, Sharma S, Saito R, et al. Defective fatty acid oxidation in renal tubular epithelial cells has a key role in kidney fibrosis development. *Nat Med.* (2014) 21(1):37–46. doi: 10.1038/nm.3762

12. Sanchez-Gimenez R, Peiró ÓM, Bonet G, Carrasquer A, Fragkiadakis GA, Bulló M, et al. Plasma trimethylamine-N-oxide, its precursors and risk of cardiovascular events in patients with acute coronary syndrome: mediating effects of renal function. *Front Cardiovasc Med.* (2022) 9:1000815. doi: 10.3389/fcvm.2022.1000815

13. Sanchez R, Papandreou C, Peiró ÓM, Bonet G, Carrasquer A, Fragkiadakis GA, et al. TCA cycle metabolites associated with adverse outcomes after acute coronary syndrome: Mediating effects of renal function. Mendeley Data V1 2022 (2022). Deposited 19 December 2022. https://doi.org/10.17632/rm33z2xd2s.1

14. Schymanski EL, Jeon J, Gulde R, Fenner K, Ruff M, Singer HP, et al. Identifying small molecules via high resolution mass spectrometry: communicating confidence. *Environ Sci Technol.* (2014) 48(4):2097–8. doi: 10.1021/es5002105

15. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF 3rd, Feldman HI, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med.* (2009) 150 (9):604. doi: 10.7326/0003-4819-150-9-200905050-00006

16. Lange T, Hansen KW, Sørensen R, Galatius S. Applied mediation analyses: a review and tutorial. *Epidemiol Health.* (2017) 39:6. doi: 10.4178/epih.e2017035

17. Steen J, Loeys T, Moerkerke B, Vansteelandt J. Medflex: an *r* package for flexible mediation analysis using natural effect models. *J Stat Softw.* (2017) 76(11):184–93. doi: 10.18637/jss.v076.i11

18. Lambert PC, Loeys T, Moerkerke B, Vansteelandt S. Additive and multiplicative covariate regression models for relative survival incorporating fractional polynomials for time-dependent effects. *Stat Med.* (2005) 24(24):3871–85. doi: 10.1002/sim.2399

19. Crowther MJ, Riley RD, Staessen JA, Wang J, Gueyffer F, Lambert PC. Individual patient data meta-analysis of survival data using poisson regression models. *BMC Med Res Methodol.* (2012) 12(1):19. doi: 10.1186/1471-2288-12-34

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL
Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez
Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

20. Gibala MJ, Young ME, Taegtmeyer H. Anaplerosis of the citric acid cycle: role in energy metabolism of heart and skeletal muscle. *Acta Physiol Scand.* (2000) 168 (4):657–65. doi: 10.1046/j.1365-201x.2000.00717.x

21. Chistiakov DA, Shkurat TP, Melnichenko AA, Grechko AV, Orekhov AN. The role of mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease: a brief review. *Ann Med.* (2017) 50(2):121–7. doi: 10.1080/07853890.2017.1417631

22. Neglia D, De Caterina A, Marraccini P, Natali A, Ciardetti M, Vecoli C, et al. Impaired myocardial metabolic reserve and substrate selection flexibility during stress in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* (2007) 293(6):3225–771. doi: 10.1152/ajpheart.00887.2007

23. Khan MU, Khan MU, Cheema Y, Shahbaz AU, Ahokas RA, Sun Y, et al. Mitochondria play a central role in nonischemic cardiomyocyte necrosis: common to acute and chronic stressor states. *Pflugers Arch.* (2012) 464(1):123–31. doi: 10.1007/s00424-012-1079-x

24. Noh MR, Kong MJ, Han SJ, Kim JI, Park KM. Isocitrate dehydrogenase 2 deficiency aggravates prolonged high-fat diet intake-induced hypertension. *Redox Biol.* (2020) 34:101548. doi: 10.1016/j.redox.2020.101548

25. Guasch-Ferré M, Santos JL, Martínez-González MA, Clish CB, Razquin C, Wang D, et al. Glycolysis/gluconeogenesis- and tricarboxylic acid cycle–related metabolites, Mediterranean diet, and type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr.* (2020) 111(4):835–44. doi: 10.1093/ajcn/nqaa016

26. Wan Y, Liu XC, He Y, Gao X, Liu ZZ, Wang ZL, et al. Overweight and underweight status are linked to specific gut microbiota and intestinal tricarboxylic acid cycle intermediates. *Clin Nutr.* (2020) 39(10):3189–98. doi: 10.1016/j.clnu.2020.02.014

27. Benderdour M, Charron G, Comte B, Ayoub R, Beaudry D, Foisy S, et al. Decreased cardiac mitochondrial NADP+-isocitrate dehydrogenase activity and expression: a marker of oxidative stress in hypertrophy development. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* (2004) 287(5):2122–31. doi: 10.1152/ajpheart.00378.2004

28. Shiomi M, Takeda H, Irino Y, Kimura N, Yamada S, Kuniyoshi N, et al. Identification of novel serum markers for the progression of coronary atherosclerosis in WHHLMI rabbits, an animal model of familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis.* (2019) 284:18–23. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2019.02.020

29. Wilkinson IB, Mäki-Petäjä KM, Mitchell GF. Uses of arterial stiffness in clinical practice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (2020) 40(5):1063–7. doi: 10.1161/atvbaha.120.313130

30. Haam JH, Kim YS, Cho DY, Chun H, Choi SW, Lee YK, et al. Elevated levels of urine isocitrate, hydroxymethylglutarate, and formiminoglutamate are associated with arterial stiffness in Korean adults. *Sci Rep.* (2021) 11(1):1080. doi: 10.1038/s41598-021-89639-w

31. Fan Y, Kim YS, Cho DY, Chun H, Choi S-W, Lee YK, et al. Comprehensive metabolomic characterization of coronary artery diseases. *J Am Coll Cardiol.* (2016) 68(12):1281–93. doi: 10.1016/j.jacc.2016.06.044

32. Watany MM, Abd-Ellatif RB, Abdeldayem MHG, El-Horany HE. Association between genetic variations of mitochondrial isocitrate dehydrogenase (IDH2) and acute myocardial infarction. *Gene.* (2022) 829:146497. doi: 10.1016/j.gene.2022.146497

33. Peng Z, Zhan Q, Xie X, Li H, Tu Y, Bai Y, et al. Association between admission plasma 2-oxoglutarate levels and short-term outcomes in patients with acute heart failure: a prospective cohort study. *Mol Med.* (2019) 25(1):8. doi: 10.1186/s10020-019-0078-1

34. Cheng C-F, Ku H-C, Shen T-C. The potential of using itaconate as treatment for inflammation-related heart diseases. *Tzu Chi Med J.* (2022) 34(2):113. doi: 10.4103/tcmj.tcmj_83_21

35. Toyohara T, Akiyama Y, Suzuki T, Takeuchi Y, Mishima E, Tanemoto M, et al. Metabolomic profiling of uremic solutes in CKD patients. *Hypertens Res.* (2010) 33 (9):944–52. doi: 10.1038/hr.2010.113

36. Delanaye P, Akiyama Y, Suzuki T, Takeuchi Y, Mishima E, Tanemoto M, et al. An age-calibrated definition of chronic kidney disease: rationale and benefits. *Clin Biochem.* (2016) 37(1):17–26.

37. Pilmore HL, Liu H, Cheng L, Cui C, Chen X, Yang S, et al. Impact of chronic kidney disease on mortality and cardiovascular outcomes after acute coronary syndrome: a nationwide data linkage study (anzacs-qi 44). *Nephrology.* (2020) 25 (7):535–43. doi: 10.1111/nep.13703

38. Matsushita K, Selvin E, Bash LD, Franceschini N, Astor BC, Coresh J. Change in estimated GFR associates with coronary heart disease and mortality. *J Am Soc Nephrol.* (2009) 20(12):2617–24. doi: 10.1681/ASN.2009010025

39. Kraler S, Wenzl FA, Georgiopoulos G, Obeid S, Liberale L, von Eckardstein A, et al. Soluble lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 predicts premature death in acute coronary syndromes. *Eur Heart J.* (2022) 43(19):1849–60. doi: 10.1093/eurheartj/ehac143

40. Stamatelopoulos K, Mueller-Hennessen M, Georgiopoulos G, Lopez-Ayala P, Sachse M, Vlachogiannis NI, et al. Cathepsin S levels and survival among patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol.* (2022) 80(10):998–1010. doi: 10.1016/j.jacc.2022.05.055

41. Kraler S, Wenzl FA, Vykoukal J, Fahrmann JF, Shen MY, Chen DY, et al. Low-density lipoprotein electronegativity and risk of death after acute coronary syndromes: a case-cohort analysis. *Atherosclerosis.* (2023) 376(24):43–52. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2023.05.014

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

6. DISCUSIÓN

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

En las últimas décadas, a pesar de los importantes avances en el tratamiento de la enfermedad coronaria, los pacientes siguen presentando un riesgo significativamente elevado de muerte y nuevos eventos adversos cardiovasculares, sobre todo a largo plazo. Existe múltiples trabajos que evalúan diferentes y nuevas vías metabólicas para intentar esclarecer el elevado riesgo residual que presentan estos pacientes a pesar de un tratamiento óptimo. Por tanto, la identificación de aquellos sujetos con mayor riesgo podría ayudar a los clínicos a desarrollar estrategias preventivas para disminuir su morbimortalidad. En esta tesis doctoral analizamos la bibliografía actual en referencia a las alteraciones de los metabolitos derivados de la microbiota intestinal y el valor pronóstico a largo plazo de dos de las vías metabólicas más importantes en la literatura asociadas a la enfermedad cardiovascular.

Nuestra revisión sistemática resumió la evidencia entre los niveles circulantes de metabolitos relacionados con la microbiota gastrointestinal y el riesgo de ECV, demostrando, como ya es conocido previamente, que TMAO es un factor de riesgo independiente de ECV (129-130). Se incluyó un total de 11 estudios individuales que examinaron las asociaciones de TMAO con resultados CV. Entre ellos, cuatro end-points (MACE, evento cardiovascular mayor, mortalidad por ECV, mortalidad por todas las causas) se asociaron positivamente con los niveles de TMAO, a pesar que dicho resultado no se encontró en todos los estudios incluidos. En tres metaanálisis (133,134,135) los niveles circulantes elevados de TMAO se asociaron con un mayor riesgo de MACE y mortalidad por todas las causas con baja-moderada y moderada-alta heterogeneidad. Sin embargo, las discrepancias en los resultados de los estudios incluidos pueden deberse a diferencias en el estadio de la enfermedad, ubicaciones geográficas del estudio, número de casos, estado de ayuno en el momento de la extracción de sangre, ajustes por factores de confusión y duración del seguimiento.

Por otro lado, se obtuvieron resultados sobre las fuertes asociaciones prospectivas entre los BCAA y el riesgo de ECV (142). Dos estudios (143-144), observaron una asociación

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

positiva significativa entre los BCAA con el riesgo de ECV en el seguimiento, comparable en magnitud al colesterol LDL. En particular, esta relación fue mayor entre las mujeres que desarrollaron DT2 antes de la ECV. Estos hallazgos refuerzan el papel de estos metabolitos como biomarcadores potenciales de disfunción biológica relacionada con ECV. Sin embargo, se obtuvieron resultados inconsistentes para los ácidos biliares secundarios en relación a la ECV ya que por un lado los niveles elevados de sulfato de glicocolenato y glicocolato si se asociaron con el riesgo de FA (128), mortalidad por ECV y mortalidad por todas las causas (129), respectivamente, pero, por otro lado, no se confirmaron en otros tres estudios (140,127,141). Los posibles mecanismos subyacentes es que estos pueden incluir posibles efectos arritmogénicos, están involucrado en el metabolismo del colesterol y se considera que es un factor clave que aumenta la mortalidad en estos pacientes (142) y que pueden contribuir a la inflamación, la desregulación inmunitaria, a la calcificación vascular, y a su vez, acelerar la progresión de la enfermedad renal crónica.

Sin embargo, la relación entre el triptófano y la enfermedad cardiovascular es compleja y aún no está completamente definida. Si bien existen vínculos potenciales a través de la síntesis de serotonina, la influencia en el metabolismo lipídico y los efectos en la inflamación, se requiere más investigación para comprender completamente cómo el triptófano puede contribuir o mitigar el riesgo de enfermedad cardiovascular (143). Algo similar sucede con los ácidos grasos de cadena corta, producidos como subproductos de la fermentación bacteriana en el intestino, pueden tener efectos beneficiosos en la salud cardiovascular al influir en la microbiota intestinal, reducir la inflamación, mejorar la regulación de la glucosa y los lípidos, y potencialmente ayudar a controlar la presión arterial (159) pero la falta de evidencia en los estudios no permite obtener conclusiones firmes respecto al papel que juegan en la ECV.

En el segundo estudio analizamos los metabolitos derivados de la flora gastrointestinal en una cohorte prospectiva de 309 pacientes con SCA demostrando que las

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

concentraciones plasmáticas iniciales de TMAO y dimetilglicina se asociaban con un mayor riesgo de MACE después de un seguimiento medio de 6,7 años. A pesar de las evidencias que sugieren una asociación entre TMAO y la enfermedad cardiovascular, todavía existen algunas controversias en este campo. Algunos estudios (144-146) han mostrado resultados mixtos, y no está claro si la TMAO es un marcador causal o simplemente un marcador de riesgo. Además, se requiere una investigación más profunda para comprender mejor cómo los factores genéticos, la dieta y la microbiota intestinal interactúan en la formación de TMAO y su relación con la enfermedad cardiovascular.

Nuestros resultados sugirieron que los pacientes con concentraciones plasmáticas elevadas de TMAO tenían un alto riesgo de desarrollar MACE, después de un amplio ajuste para los factores de riesgo y medicamentos cardiovasculares tradicionales. Sin embargo, la asociación de TMAO con MACE se volvió no significativa después del ajuste por eGFR, lo que aumenta la posibilidad de que la función renal pueda mediar en esta asociación. Es de destacar que encontramos una correlación negativa entre TMAO y eGFR, de acuerdo con estudios previos entre pacientes con enfermedad renal crónica (ERC) (144) y la población general (146), lo que implica que TMAO puede acumularse en la circulación en pacientes con insuficiencia renal. Por lo tanto, TMAO podría ser un marcador de aclaramiento renal reducido o bien, podría tener un efecto directo sobre la insuficiencia renal, que a su vez es un determinante de MACE (147). Nuestro análisis de mediación proporciona evidencia adicional al documentar un fuerte papel mediador de eGFR en la relación entre TMAO y MACE, y amplía los resultados previos sobre el papel mediador de la función renal en la asociación entre TMAO y la mortalidad por todas las causas (148). Comprender cómo la función renal subyace a la relación entre TMAO y el riesgo de MACE es de gran importancia para la salud pública dada la coexistencia de función renal reducida en pacientes con SCA (149).

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

La dimetilglicina es un subproducto de la reacción betaína-homocisteína metiltransferasa (BHMT) que cataliza la transferencia de grupos metilo de la betaína a la homocisteína para formar dimetilglicina y metionina (150). Las concentraciones elevadas de dimetilglicina podrían deberse a una disminución de la actividad de la enzima dimetilglicina deshidrogenasa que convierte la dimetilglicina en sarcosina o a la inflamación y el estrés oxidativo en el SCA (152,153). Se ha sugerido que la dimetilglicina puede estar relacionada con resultados cardiovasculares adversos a través de su efecto sobre la regulación del metabolismo de los lípidos y la energía (150). En nuestro estudio, la asociación entre la dimetilglicina y el riesgo de MACE no fue lineal y fue más pronunciada entre los pacientes con concentraciones más altas de dimetilglicina. Agregar eGFR al modelo de regresión de Cox atenuó la asociación entre la dimetilglicina y el riesgo de MACE. También encontramos una asociación inversa entre las concentraciones plasmáticas de dimetilglicina y la función renal, de acuerdo con estudios entre pacientes con insuficiencia renal (154) y pacientes con angina de pecho estable (150). En particular, el FG presentó una mediación parcial en esta asociación. Dado que la disminución de la función renal es un factor de riesgo para MACE, podríamos especular que puede haber una relación sinérgica de concentraciones aumentadas de dimetilglicina y disminución de la función renal con el aumento del riesgo de desarrollar MACE.

Por último, en el tercer estudio se analizó en la misma cohorte de pacientes con SCA, los metabolitos derivados del ciclo del ácido tricarboxílico como marcador de disfunción mitocondrial. La función del ciclo mitocondrial del TCA en el corazón y el músculo esquelético es oxidar el grupo acetilo de la acetil-CoA y generar equivalentes reductores (NADH2), que se utilizan para la resíntesis de ATP (155). Las desregulaciones del ciclo TCA se ha asociado con estrés oxidativo y podría inducir disfunción miocárdica y proinflamación (156,157). Las mitocondrias disfuncionales pueden iniciar el mecanismo intrínseco de apoptosis de los cardiomiocitos (158) generando un papel importante en la remodelación cardíaca, cuando los cardiomiocitos apoptóticos y necróticos son

reemplazados por fibroblastos en el proceso de cicatrización, induciendo un peor pronóstico (159). Además, la acumulación de metabolitos de TCA en diferentes muestras biológicas se ha asociado con hipertensión (160), DT2 (161), sobrepeso y perfil lipídico desfavorable (162). Si bien es evidente que el ciclo mitocondrial del TCA está relacionado con la salud cardiovascular, la naturaleza exacta de esta relación y cómo se manifiesta en diferentes condiciones clínicas sigue siendo un tema de investigación activa. Además, las interacciones entre estos metabolitos y otros procesos metabólicos, como la regulación del equilibrio energético y la función endotelial, también están siendo exploradas en detalle.

Nuestro estudio es el primero realizado en pacientes con SCA de la región mediterránea, con un seguimiento prolongado y demostró que los pacientes con concentraciones plasmáticas elevadas de isocitrato tenían un mayor riesgo de desarrollar MACE después del ajuste por varios factores de riesgo cardiovascular tradicionales y medicamentos. Los niveles elevados de isocitrato en plasma pueden reflejar la inactividad mitocondrial de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP) y del isocitrato deshidrogenasa. Esta enzima cataliza la descarboxilación oxidativa del isocitrato que produce alfa-cetoglutarato, regula la energía de los cardiomiocitos y el estado redox que contribuye potencialmente a la miocardiopatía (163).

Los dos estereoisómeros de 2-hidroxiglutarato normalmente se convierten en 2-oxoglutarato en la matriz mitocondrial, para ser metabolizados por el ciclo TCA. Los hallazgos de algunos estudios observacionales sugieren que la acumulación de acónito, hidroxiglutarato (156) y 2-oxoglutarato (164) puede indicar un estado de enfermedad y sugiere su utilidad clínica potencial como biomarcadores de estrés metabólico o remodelación metabólica en la enfermedad. Además, el aumento de las concentraciones de isocitrato e hidroximetilglutarato en la orina se asoció de forma independiente con la velocidad de la onda del pulso del índice tobillo-brazo (165). Nuestro estudio es el primero en demostrar que las concentraciones plasmáticas más

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

altas de acónito y d/l-2-hidroxiglutarato se asociaron con mortalidad por todas las causas. En particular, la eGFR medió sustancialmente en estas asociaciones, lo que ofrece una nueva perspectiva para comprender la relación entre los metabolitos de TCA, la función renal y los resultados adversos en el SCA.

Finalmente, nuestros resultados sugieren que los metabolitos del ciclo de los ATC se asocian con un mayor riesgo de resultados clínicos después de un SCA, posiblemente debido a la disminución renal. Los mecanismos causales por los cuales la función renal alterada contribuye a las enfermedades cardiovasculares no están del todo claros. La ERC en sí misma se considera un factor de riesgo para la remodelación ventricular y vascular y puede servir para exacerbar los efectos de otros factores de riesgo. Otros posibles mediadores son: estrés oxidativo, inflamación, aumento de leptina y/o activación del sistema renina-angiotensina inducida por insuficiencia renal (166). En resumen, el ciclo de TCA es un componente fundamental del metabolismo celular y tiene una influencia significativa en la función cardíaca, la regulación de lípidos, la homeostasis de la glucosa y el estrés oxidativo, todos los cuales están relacionados con la enfermedad cardiovascular. Sin embargo, se necesita más investigación para comprender completamente esta relación y para desarrollar estrategias terapéuticas que puedan aprovechar el conocimiento de estos metabolitos para prevenir o tratar enfermedades cardiovasculares.

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

7.LIMITACIONES

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

Con respecto al primer estudio, en primer lugar, la falta de estudios sobre los ácidos grasos de cadena corta limitó las conclusiones de los principales productos producidos por las bacterias intestinales en las ECV siendo un área que necesita desarrollo. En segundo lugar, debido a la naturaleza observacional de los estudios incluidos en la revisión, no se pueden inferir los posibles mecanismos causales que subyacen a las asociaciones anteriores. En tercer lugar, el ajuste de los factores de confusión difirió entre los estudios, lo que puede haber dado lugar a diferentes asociaciones entre metabolitos como TMAO o ácidos biliares y resultados CV. En cuarto lugar, no pudimos realizar un metanálisis, principalmente debido a la heterogeneidad de los artículos incluidos.

Con respecto al segundo estudio, a pesar de que ajustamos por muchos factores de confusión potenciales, puede existir una confusión residual por factores desconocidos o no medidos. Por ejemplo, no se disponía de información sobre la composición de la microbiota intestinal y los hábitos dietéticos que podrían afectar las concentraciones de TMAO Otra limitación es el uso de una sola medida de metabolitos al inicio del estudio que puede haber limitado la precisión de su exposición a largo plazo debido a la variabilidad dentro del individuo a lo largo del tiempo. Finalmente, aunque las asociaciones entre dimetilglicina y riesgo de MACE fueron validadas internamente, la replicación externa daría mayor validez a los hallazgos.

Con respecto a las limitaciones del tercer estudio, los hallazgos del presente estudio no pueden generalizarse a adultos más jóvenes e individuos con características clínicas distintas al SCA. Además, pueden existir factores de confusión residuales no medidos. La replicación de los hallazgos en un estudio de cohorte independiente fortalecería las conclusiones del estudio

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

8.CONCLUSIONES

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

En la evaluación de metabolitos derivados de la microbiota intestinal y de la disfunción mitocondrial con finalidad pronóstica a largo plazo en pacientes atendidos por síndrome coronario agudo y, siguiendo los objetivos propuestos y los resultados obtenidos en esta tesis doctoral, podemos concluir que:

1. En relación a la enfermedad cardiovascular, existen resultados inconsistentes en la literatura actual para TMAO y los ácidos biliares, pero encontramos una fuerte evidencia para los aminoácidos de cadena ramificada.

2. Nuestros datos sugieren que las concentraciones altas de TMAO en plasma están relacionadas con el riesgo de desarrollar MACE y esta relación está mediada sustancialmente por la función renal. Nuestros resultados también amplían los hallazgos de investigaciones anteriores, que muestran que las concentraciones elevadas de dimetilglicina están asociadas con un mayor riesgo de MACE, y que la función renal media parcialmente esta relación.

3. Los metabolitos del ciclo de tricarboxílico elevados en plasma, incluidos el isocitrato, el acónito y el d/l-2-hidroxiglutarato, se asociaron con el riesgo de MACE y mortalidad por todas las causas en pacientes con SCA. Además, los análisis de mediación demostraron que la función renal es un fuerte mediador en estas asociaciones.

Por tanto, el estudio del metaboloma y de nuevas vías metabólicas implicadas en la enfermedad cardiovascular como los metabolitos derivados de la microbiota intestinal y los derivados de la disfunción mitocondrial son marcadores que aportan información pronóstica valiosa en pacientes ingresados por síndrome coronario agudo. La identificación de los pacientes con mayor riesgo podría optimizar el diseño de estrategias terapéuticas más intensivas y descubrir posibles nuevas rutas metabólicas a

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

las que dirigir nuevas armas terapéuticas en la alta tasa de eventos adversos cardiovasculares mayores que asocian estas enfermedades.

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

9.BIBLIOGRAFÍA

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

1. Sanchis-Gomar F, Perez-Quilis C, Leischik R, Lucia A. Epidemiology of coronary heart disease and acute coronary syndrome. Ann Transl Med. 2016 Jul;4(13):256. doi: 10.21037/atm.2016.06.33. PMID: 27500157; PMCID: PMC4958723.
2. Anderson JL, Morrow DA. Acute Myocardial Infarction. N Engl J Med. 2017 May 25;376(21):2053-2064. doi: 10.1056/NEJMra1606915. PMID: 28538121.
3. Rognoni A, Cavallino C, Veia A, Bacchini S, Rosso R, Facchini M, Secco GG, Lupi A, Nardi F, Rametta F, Bongo AS. Pathophysiology of Atherosclerotic Plaque Development. Cardiovasc Hematol Agents Med Chem. 2015;13(1):10-3. doi: 10.2174/1871525713666141218163425. PMID: 25544119.
4. Wentzel JJ, Chatzizisis YS, Gijsen FJ, Giannoglou GD, Feldman CL, Stone PH. Endothelial shear stress in the evolution of coronary atherosclerotic plaque and vascular remodelling: current understanding and remaining questions. Cardiovasc Res. 2012 Nov 1;96(2):234-43. doi: 10.1093/cvr/cvs217. Epub 2012 Jun 29. PMID: 22752349.
5. Badimón L, Vilahur G, Padró T. Lipoproteins, platelets and atherothrombosis. Rev Esp Cardiol. 2009 Oct;62(10):1161-78. English, Spanish. doi: 10.1016/s1885-5857(09)73331-6. PMID: 19793522.
6. Melnick JL, Adam E, DeBakey ME. Possible role of cytomegalovirus in atherogenesis. JAMA. 1990 Apr 25;263(16):2204-7. PMID: 2157078.
7. Smith PD, Saini SS, Raffeld M, Manischewitz JF, Wahl SM. Cytomegalovirus induction of tumor necrosis factor-alpha by human monocytes and mucosal macrophages. J Clin Invest. 1992 Nov;90(5):1642-8. doi: 10.1172/JCI116035. PMID: 1331170; PMCID: PMC443219.
8. Markin AM, Khotina VA, Zabudskaya XG, Bogatyreva AI, Starodubova AV, Ivanova E, Nikiforov NG, Orekhov AN. Disturbance of Mitochondrial Dynamics and Mitochondrial Therapies in Atherosclerosis. Life (Basel). 2021 Feb 20;11(2):165. doi: 10.3390/life11020165. PMID: 33672784; PMCID: PMC7924632

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

9. Surendran A, Atefi N, Zhang H, Aliani M, Ravandi A. Defining Acute Coronary Syndrome through Metabolomics. Metabolites. 2021 Oct 6;11(10):685. doi: 10.3390/metabo11100685. PMID: 34677400; PMCID: PMC8540033.
10. Griffin JL, Atherton H, Shockcor J, Atzori L. Metabolomics as a tool for cardiac research. Nat Rev Cardiol. 2011 Sep 20;8(11):630-43. doi: 10.1038/nrcardio.2011.138. PMID: 21931361.
11. Park TS, Yamashita H, Blaner WS, Goldberg IJ. Lipids in the heart: a source of fuel and a source of toxins. Curr Opin Lipidol. 2007 Jun;18(3):277-82. doi: 10.1097/MOL.0b013e32814a57db. PMID: 17495601.
12. Rosano GM, Fini M, Caminiti G, Barbaro G. Cardiac metabolism in myocardial ischemia. Curr Pharm Des. 2008;14(25):2551-62. doi: 10.2174/138161208786071317. PMID: 18991672.
13. Chouchani ET, Pell VR, Gaude E, Aksentijević D, Sundier SY, Robb EL, Logan A, Nadtochiy SM, Ord ENJ, Smith AC, Eyassu F, Shirley R, Hu CH, Dare AJ, James AM, Rogatti S, Hartley RC, Eaton S, Costa ASH, Brookes PS, Davidson SM, Duchen MR, Saeb-Parsy K, Shattock MJ, Robinson AJ, Work LM, Frezza C, Krieg T, Murphy MP. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. Nature. 2014 Nov 20;515(7527):431-435. doi: 10.1038/nature13909. Epub 2014 Nov 5. PMID: 25383517; PMCID: PMC4255242.
14. Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. J Clin Invest. 2013 Jan;123(1):92-100. doi: 10.1172/JCI62874. Epub 2013 Jan 2. PMID: 23281415; PMCID: PMC3533275.
15. Kohlhauer M, Dawkins S, Costa ASH, Lee R, Young T, Pell VR, Choudhury RP, Banning AP, Kharbanda RK; Oxford Acute Myocardial Infarction (OxAMI) Study; Saeb-Parsy K, Murphy MP, Frezza C, Krieg T, Channon KM. Metabolomic Profiling in Acute ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction Identifies Succinate as an Early Marker of Human Ischemia-Reperfusion Injury. J Am Heart Assoc. 2018 Apr

6;7(8):e007546. doi: 10.1161/JAHA.117.007546. PMID: 29626151; PMCID: PMC6015393.

16. Aa N, Lu Y, Yu M, Tang H, Lu Z, Sun R, Wang L, Li C, Yang Z, Aa J, Kong X, Wang G. Plasma Metabolites Alert Patients With Chest Pain to Occurrence of Myocardial Infarction. Front Cardiovasc Med. 2021 Apr 23;8:652746. doi: 10.3389/fcvm.2021.652746. PMID: 33969016; PMCID: PMC8103546.
17. Yoo JY, Kim SS. Probiotics and Prebiotics: Present Status and Future Perspectives on Metabolic Disorders. Nutrients. 2016 Mar 18;8(3):173. doi: 10.3390/nu8030173. PMID: 26999199; PMCID: PMC4808900.
18. Faith JJ, Guruge JL, Charbonneau M, Subramanian S, Seedorf H, Goodman AL, Clemente JC, Knight R, Heath AC, Leibel RL, Rosenbaum M, Gordon JI. The long-term stability of the human gut microbiota. Science. 2013 Jul 5;341(6141):1237439. doi: 10.1126/science.1237439. PMID: 23828941; PMCID: PMC3791589.
19. Byndloss MX, Olsan EE, Rivera-Chávez F, Tiffany CR, Cevallos SA, Lokken KL, Torres TP, Byndloss AJ, Faber F, Gao Y, Litvak Y, Lopez CA, Xu G, Napoli E, Giulivi C, Tsolis RM, Revzin A, Lebrilla CB, Bäumler AJ. Microbiota-activated PPAR-γ signaling inhibits dysbiotic Enterobacteriaceae expansion. Science. 2017 Aug 11;357(6351):570-575. doi: 10.1126/science.aam9949. PMID: 28798125; PMCID: PMC5642957.
20. Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, Koeth R, Levison BS, Dugar B, Feldstein AE, Britt EB, Fu X, Chung YM, Wu Y, Schauer P, Smith JD, Allayee H, Tang WH, DiDonato JA, Lusis AJ, Hazen SL. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. Nature. 2011 Apr 7;472(7341):57-63. doi: 10.1038/nature09922. PMID: 21475195; PMCID: PMC3086762.
21. Zhu W, Gregory JC, Org E, Buffa JA, Gupta N, Wang Z, Li L, Fu X, Wu Y, Mehrabian M, Sartor RB, McIntyre TM, Silverstein RL, Tang WHW, DiDonato JA, Brown JM, Lusis AJ, Hazen SL. Gut Microbial Metabolite TMAO Enhances Platelet Hyperreactivity and Thrombosis Risk. Cell. 2016 Mar 24;165(1):111-124. doi:

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

10.1016/j.cell.2016.02.011. Epub 2016 Mar 10. PMID: 26972052; PMCID: PMC4862743.

22. Byndloss MX, Olsan EE, Rivera-Chávez F, Tiffany CR, Cevallos SA, Lokken KL, Torres TP, Byndloss AJ, Faber F, Gao Y, Litvak Y, Lopez CA, Xu G, Napoli E, Giulivi C, Tsolis RM, Revzin A, Lebrilla CB, Bäumler AJ. Microbiota-activated PPAR-γ signaling inhibits dysbiotic Enterobacteriaceae expansion. Science. 2017 Aug 11;357(6351):570-575. doi: 10.1126/science.aam9949. PMID: 28798125; PMCID: PMC5642957.
23. Koren O, Spor A, Felin J, Fåk F, Stombaugh J, Tremaroli V, Behre CJ, Knight R, Fagerberg B, Ley RE, Bäckhed F. Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Mar 15;108 Suppl 1(Suppl 1):4592-8. doi: 10.1073/pnas.1011383107. Epub 2010 Oct 11. PMID: 20937873; PMCID: PMC3063583.
24. Gomez-Arango LF, Barrett HL, Wilkinson SA, Callaway LK, McIntyre HD, Morrison M, Dekker Nitert M. Low dietary fiber intake increases Collinsella abundance in the gut microbiota of overweight and obese pregnant women. Gut Microbes. 2018;9(3):189-201. doi: 10.1080/19490976.2017.1406584. Epub 2018 Mar 13. PMID: 29144833; PMCID: PMC6219589.
25. Liu Q, Li Y, Song X, Wang J, He Z, Zhu J, Chen H, Yuan J, Zhang X, Jiang H, Zhang S, Ruan B. Both gut microbiota and cytokines act to atherosclerosis in ApoE-/- mice. Microb Pathog. 2020 Jan;138:103827. doi: 10.1016/j.micpath.2019.103827. Epub 2019 Nov 1. PMID: 31682994.
26. Kappel BA, De Angelis L, Heiser M, Ballanti M, Stoehr R, Goettsch C, Mavilio M, Artati A, Paoluzi OA, Adamski J, Mingrone G, Staels B, Burcelin R, Monteleone G, Menghini R, Marx N, Federici M. Cross-omics analysis revealed gut microbiome-related metabolic pathways underlying atherosclerosis development after antibiotics treatment. Mol Metab. 2020 Jun;36:100976. doi: 10.1016/j.molmet.2020.100976. Epub 2020 Mar 13. PMID: 32251665; PMCID: PMC7183232.

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

27. Plata C, Cruz C, Cervantes LG, Ramírez V. The gut microbiota and its relationship with chronic kidney disease. Int Urol Nephrol. 2019 Dec;51(12):2209-2226. doi: 10.1007/s11255-019-02291-2. Epub 2019 Oct 1. PMID: 31576489.
28. Kikuchi M, Ueno M, Itoh Y, Suda W, Hattori M. Uremic Toxin-Producing Gut Microbiota in Rats with Chronic Kidney Disease. Nephron. 2017;135(1):51-60. doi: 10.1159/000450619. Epub 2016 Oct 5. PMID: 27701177.
29. Castillo-Rodriguez E, Fernandez-Prado R, Esteras R, Perez-Gomez MV, Gracia-Iguacel C, Fernandez-Fernandez B, Kanbay M, Tejedor A, Lazaro A, Ruiz-Ortega M, Gonzalez-Parra E, Sanz AB, Ortiz A, Sanchez-Niño MD. Impact of Altered Intestinal Microbiota on Chronic Kidney Disease Progression. Toxins (Basel). 2018 Jul 19;10(7):300. doi: 10.3390/toxins10070300. PMID: 30029499; PMCID: PMC6070989.
30. Hai X, Landeras V, Dobre MA, DeOreo P, Meyer TW, Hostetter TH. Mechanism of Prominent Trimethylamine Oxide (TMAO) Accumulation in Hemodialysis Patients. PLoS One. 2015 Dec 9;10(12):e0143731. doi: 10.1371/journal.pone.0143731. PMID: 26650937; PMCID: PMC4674074.
31. Heianza Y, Ma W, Manson JE, Rexrode KM, Qi L. Gut Microbiota Metabolites and Risk of Major Adverse Cardiovascular Disease Events and Death: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Studies. J Am Heart Assoc. 2017 Jun 29;6(7):e004947. doi: 10.1161/JAHA.116.004947. PMID: 28663251; PMCID: PMC5586261.
32. Farhangi MA, Vajdi M, Asghari-Jafarabadi M. Gut microbiota-associated metabolite trimethylamine N-Oxide and the risk of stroke: a systematic review and dose-response meta-analysis. Nutr J. 2020 Jul 30;19(1):76. doi: 10.1186/s12937-020-00592-2. PMID: 32731904; PMCID: PMC7393891.
33. Surendran A, Atefi N, Zhang H, Aliani M, Ravandi A. Defining Acute Coronary Syndrome through Metabolomics. Metabolites. 2021 Oct 6;11(10):685. doi: 10.3390/metabo11100685. PMID: 34677400; PMCID: PMC8540033.

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

34. Griffin JL, Atherton H, Shockcor J, Atzori L. Metabolomics as a tool for cardiac research. Nat Rev Cardiol. 2011 Sep 20;8(11):630-43. doi: 10.1038/nrcardio.2011.138. PMID: 21931361

35. Mouries J, Brescia P, Silvestri A, Spadoni I, Sorribas M, Wiest R, Mileti E, Galbiati M, Invernizzi P, Adorini L, Penna G, Rescigno M. Microbiota-driven gut vascular barrier disruption is a prerequisite for non-alcoholic steatohepatitis development. J Hepatol. 2019 Dec;71(6):1216-1228. doi: 10.1016/j.jhep.2019.08.005. Epub 2019 Aug 13. PMID: 31419514; PMCID: PMC6880766.

36. Craciun S, Balskus EP. Microbial conversion of choline to trimethylamine requires a glycyl radical enzyme. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Dec 26;109(52):21307-12. doi: 10.1073/pnas.1215689109. Epub 2012 Nov 14. PMID: 23151509; PMCID: PMC3535645.

37. Ranjbar Kohan N, Nazifi S, Tabandeh MR, Ansari Lari M. Effect of L-Carnitine Supplementation on Apelin and Apelin Receptor (Apj) Expression in Cardiac Muscle of Obese Diabetic Rats. Cell J. 2018 Oct;20(3):427-434. doi: 10.22074/cellj.2018.5408. Epub 2018 May 15. PMID: 29845798; PMCID: PMC6005003.

38. Zeisel SH, Wishnok JS, Blusztajn JK. Formation of methylamines from ingested choline and lecithin. J Pharmacol Exp Ther. 1983 May;225(2):320-4. PMID: 6842395.

39. Guasch-Ferré M, Hu FB, Ruiz-Canela M, Bulló M, Toledo E, Wang DD, Corella D, Gómez-Gracia E, Fiol M, Estruch R, Lapetra J, Fitó M, Arós F, Serra-Majem L, Ros E, Dennis C, Liang L, Clish CB, Martínez-González MA, Salas-Salvadó J. Plasma Metabolites From Choline Pathway and Risk of Cardiovascular Disease in the PREDIMED (Prevention With Mediterranean Diet) Study. J Am Heart Assoc. 2017 Oct 28;6(11):e006524. doi: 10.1161/JAHA.117.006524. PMID: 29080862; PMCID: PMC5721752.

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

40. Zeisel SH, Warrier M. Trimethylamine N-Oxide, the Microbiome, and Heart and Kidney Disease. Annu Rev Nutr. 2017 Aug 21;37:157-181. doi: 10.1146/annurev-nutr-071816-064732. Epub 2017 Jul 17. PMID: 28715991.
41. Svingen GF, Ueland PM, Pedersen EK, Schartum-Hansen H, Seifert R, Ebbing M, Løland KH, Tell GS, Nygård O. Plasma dimethylglycine and risk of incident acute myocardial infarction in patients with stable angina pectoris. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2013 Aug;33(8):2041-8. doi: 10.1161/ATVBAHA.113.301714. Epub 2013 May 30. PMID: 23723367.
42. Lever M, George PM, Elmslie JL, Atkinson W, Slow S, Molyneux SL, Troughton RW, Richards AM, Frampton CM, Chambers ST. Betaine and secondary events in an acute coronary syndrome cohort. PLoS One. 2012;7(5):e37883. doi: 10.1371/journal.pone.0037883. Epub 2012 May 23. PMID: 22649561; PMCID: PMC3359285.
43. Ganguly P, Alam SF. Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease. Nutr J. 2015 Jan 10;14:6. doi: 10.1186/1475-2891-14-6. PMID: 25577237; PMCID: PMC4326479
44. Cho CE, Taesuwan S, Malysheva OV, Bender E, Tulchinsky NF, Yan J, Sutter JL, Caudill MA. Trimethylamine-N-oxide (TMAO) response to animal source foods varies among healthy young men and is influenced by their gut microbiota composition: A randomized controlled trial. Mol Nutr Food Res. 2017 Jan;61(1). doi: 10.1002/mnfr.201600324. Epub 2016 Aug 3. PMID: 27377678.
45. Yamagishi K, Iso H, Date C, Fukui M, Wakai K, Kikuchi S, Inaba Y, Tanabe N, Tamakoshi A; Japan Collaborative Cohort Study for Evaluation of Cancer Risk Study Group. Fish, omega-3 polyunsaturated fatty acids, and mortality from cardiovascular diseases in a nationwide community-based cohort of Japanese men and women the JACC (Japan Collaborative Cohort Study for Evaluation of Cancer Risk) Study. J Am Coll Cardiol. 2008 Sep 16;52(12):988-96. doi: 10.1016/j.jacc.2008.06.018. PMID: 18786479.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez
Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

46. Gao X, Xu J, Jiang C, Zhang Y, Xue Y, Li Z, Wang J, Xue C, Wang Y. Fish oil ameliorates trimethylamine N-oxide-exacerbated glucose intolerance in high-fat diet-fed mice. Food Funct. 2015 Apr;6(4):1117-25. doi: 10.1039/c5fo00007f. PMID: 25686243.
47. Hernández-Alonso P, Cañueto D, Giardina S, Salas-Salvadó J, Cañellas N, Correig X, Bulló M. Effect of pistachio consumption on the modulation of urinary gut microbiota-related metabolites in prediabetic subjects. J Nutr Biochem. 2017 Jul;45:48-53. doi: 10.1016/j.jnutbio.2017.04.002. Epub 2017 Apr 12. PMID: 28432876.
48. Du S, Sun S, Liu L, Zhang Q, Guo F, Li C, Feng R, Sun C. Effects of Histidine Supplementation on Global Serum and Urine 1H NMR-based Metabolomics and Serum Amino Acid Profiles in Obese Women from a Randomized Controlled Study. J Proteome Res. 2017 Jun 2;16(6):2221-2230. doi: 10.1021/acs.jproteome.7b00030. Epub 2017 May 5. PMID: 28447460.
49. Bartolomaeus H, Balogh A, Yakoub M, Homann S, Markó L, Höges S, Tsvetkov D, Krannich A, Wundersitz S, Avery EG, Haase N, Kräker K, Hering L, Maase M, Kusche-Vihrog K, Grandoch M, Fielitz J, Kempa S, Gollasch M, Zhumadilov Z, Kozhakhmetov S, Kushugulova A, Eckardt KU, Dechend R, Rump LC, Forslund SK, Müller DN, Stegbauer J, Wilck N. Short-Chain Fatty Acid Propionate Protects From Hypertensive Cardiovascular Damage. Circulation. 2019 Mar 12;139(11):1407-1421. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.036652. PMID: 30586752; PMCID: PMC6416008.
50. Li D, Ke Y, Zhan R, Liu C, Zhao M, Zeng A, Shi X, Ji L, Cheng S, Pan B, Zheng L, Hong H. Trimethylamine-N-oxide promotes brain aging and cognitive impairment in mice. Aging Cell. 2018 Aug;17(4):e12768. doi: 10.1111/acel.12768. Epub 2018 May 10. PMID: 29749694; PMCID: PMC6052480.
51. Razavi, A.C., Potts, K.S., Kelly, T.N. Sex, gut microbiome, and cardiovascular disease risk. Biol Sex Differ. 2019 Oct; 29. https://doi.org/10.1186/s13293-019-0240-z

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

52. Veeravalli S, Karu K, Scott F, Fennema D, Phillips IR, Shephard EA. Effect of Flavin-Containing Monooxygenase Genotype, Mouse Strain, and Gender on Trimethylamine N-oxide Production, Plasma Cholesterol Concentration, and an Index of Atherosclerosis. Drug Metab Dispos. 2018 Jan;46(1):20-25. doi: 10.1124/dmd.117.077636. Epub 2017 Oct 25. PMID: 29070510; PMCID: PMC5733448.
53. Fennema D, Phillips IR, Shephard EA. Trimethylamine and Trimethylamine N-Oxide, a Flavin-Containing Monooxygenase 3 (FMO3)-Mediated Host-Microbiome Metabolic Axis Implicated in Health and Disease. Drug Metab Dispos. 2016 Nov;44(11):1839-1850. doi: 10.1124/dmd.116.070615. Epub 2016 May 17. Erratum in: Drug Metab Dispos. 2016 Dec;44(12):1949. PMID: 27190056; PMCID: PMC5074467.
54. Chhibber-Goel J, Gaur A, Singhal V, Parakh N, Bhargava B, Sharma A. The complex metabolism of trimethylamine in humans: endogenous and exogenous sources. Expert Rev Mol Med. 2016 Apr 29;18:e8. doi: 10.1017/erm.2016.6. Erratum in: Expert Rev Mol Med. 2016 Nov 23;18:e19. PMID: 27126549.
55. Al-Obaide MAI, Singh R, Datta P, Rewers-Felkins KA, Salguero MV, Al-Obaidi I, Kottapalli KR, Vasylyeva TL. Gut Microbiota-Dependent Trimethylamine-N-oxide and Serum Biomarkers in Patients with T2DM and Advanced CKD. J Clin Med. 2017 Sep 19;6(9):86. doi: 10.3390/jcm6090086. PMID: 28925931; PMCID: PMC5615279.
56. Griffin JL, Atherton H, Shockcor J, Atzori L. Metabolomics as a tool for cardiac research. Nat Rev Cardiol. 2011 Sep 20;8(11):630-43. doi: 10.1038/nrcardio.2011.138. PMID: 21931361.
57. Dunn WB, Goodacre R, Neyses L, Mamas M. Integration of metabolomics in heart disease and diabetes research: current achievements and future outlook. Bioanalysis. 2011 Oct;3(19):2205-22. doi: 10.4155/bio.11.223. PMID: 21985415.

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

58. Asghari G, Farhadnejad H, Teymoori F, Mirmiran P, Tohidi M, Azizi F. High dietary intake of branched-chain amino acids is associated with an increased risk of insulin resistance in adults. J Diabetes. 2018;10(5): 357–364.
59. Du X, Li Y, Wang Y, You H, Hui P, Zheng Y, Du J. Increased branched-chain amino acid levels are associated with long-term adverse cardiovascular events in patients with STEMI and acute heart failure. Life Sci. 2018 Sep 15;209:167-172. doi: 10.1016/j.lfs.2018.08.011. Epub 2018 Aug 6. PMID: 30092297.
60. Tobias DK, Lawler PR, Harada PH, Demler OV, Ridker PM, Manson JE, Cheng S, Mora S. Circulating Branched-Chain Amino Acids and Incident Cardiovascular Disease in a Prospective Cohort of US Women. Circ Genom Precis Med. 2018 Apr;11(4):e002157. doi: 10.1161/CIRCGEN.118.002157. PMID: 29572205; PMCID: PMC5880282.
61. Aa N, Lu Y, Yu M, Tang H, Lu Z, Sun R, Wang L, Li C, Yang Z, Aa J, Kong X, Wang G. Plasma Metabolites Alert Patients With Chest Pain to Occurrence of Myocardial Infarction. Front Cardiovasc Med. 2021 Apr 23;8:652746. doi: 10.3389/fcvm.2021.652746. PMID: 33969016; PMCID: PMC8103546.
62. Kohlhauer M, Dawkins S, Costa ASH, Lee R, Young T, Pell VR, Choudhury RP, Banning AP, Kharbanda RK; Oxford Acute Myocardial Infarction (OxAMI) Study; Saeb-Parsy K, Murphy MP, Frezza C, Krieg T, Channon KM. Metabolomic Profiling in Acute ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction Identifies Succinate as an Early Marker of Human Ischemia-Reperfusion Injury. J Am Heart Assoc. 2018 Apr 6;7(8):e007546. doi: 10.1161/JAHA.117.007546. PMID: 29626151; PMCID: PMC6015393.
63. Sanchis-Gomar F, Perez-Quilis C, Leischik R, Lucia A. Epidemiology of coronary heart disease and acute coronary syndrome. Ann Transl Med. 2016 Jul;4(13):256. doi: 10.21037/atm.2016.06.33. PMID: 27500157; PMCID: PMC4958723.
64. Anderson JL, Morrow DA. Acute Myocardial Infarction. N Engl J Med. 2017 May 25;376(21):2053-2064. doi: 10.1056/NEJMra1606915. PMID: 28538121.

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

65. Rognoni A, Cavallino C, Veia A, Bacchini S, Rosso R, Facchini M, Secco GG, Lupi A, Nardi F, Rametta F, Bongo AS. Pathophysiology of Atherosclerotic Plaque Development. Cardiovasc Hematol Agents Med Chem. 2015;13(1):10-3. doi: 10.2174/1871525713666141218163425. PMID: 25544119.
66. Wentzel JJ, Chatzizisis YS, Gijsen FJ, Giannoglou GD, Feldman CL, Stone PH. Endothelial shear stress in the evolution of coronary atherosclerotic plaque and vascular remodelling: current understanding and remaining questions. Cardiovasc Res. 2012 Nov 1;96(2):234-43. doi: 10.1093/cvr/cvs217. Epub 2012 Jun 29. PMID: 22752349.
67. Badimón L, Vilahur G, Padró T. Lipoproteins, platelets and atherothrombosis. Rev Esp Cardiol. 2009 Oct;62(10):1161-78. English, Spanish. doi: 10.1016/s1885-5857(09)73331-6. PMID: 19793522.
68. Yu B, Heiss G, Alexander D, Grams ME, Boerwinkle E. Associations Between the Serum Metabolome and All-Cause Mortality Among African Americans in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. Am J Epidemiol. 2016 Apr 1;183(7):650-6. doi: 10.1093/aje/kwv213. Epub 2016 Mar 7. PMID: 26956554; PMCID: PMC4801134.
69. Alonso A, Yu B, Sun YV, Chen LY, Loehr LR, O'Neal WT, Soliman EZ, Boerwinkle E. Serum Metabolomics and Incidence of Atrial Fibrillation (from the Atherosclerosis Risk in Communities Study). Am J Cardiol. 2019 Jun 15;123(12):1955-1961. doi: 10.1016/j.amjcard.2019.03.017. Epub 2019 Mar 18. PMID: 30979411; PMCID: PMC6529276.
70. Korotaeva KN, Tsirkin VI, Vyaznikov VA. Positive inotropic effect of tyrosine, histidine, and tryptophan in experiments on isolated human myocardium. Bull Exp Biol Med. 2012 May;153(1):51-3. doi: 10.1007/s10517-012-1640-9. PMID: 22808492.
71. Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, Semenkovich CF, Gordon JI. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. Proc

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

Natl Acad Sci U S A. 2004 Nov 2;101(44):15718-23. doi: 10.1073/pnas.0407076101. Epub 2004 Oct 25. PMID: 15505215; PMCID: PMC524219.

72. Koeth RA, Levison BS, Culley MK, Buffa JA, Wang Z, Gregory JC, Org E, Wu Y, Li L, Smith JD, Tang WHW, DiDonato JA, Lusis AJ, Hazen SL. γ-Butyrobetaine is a proatherogenic intermediate in gut microbial metabolism of L-carnitine to TMAO. Cell Metab. 2014 Nov 4;20(5):799-812. doi: 10.1016/j.cmet.2014.10.006. Epub 2014 Nov 4. PMID: 25440057; PMCID: PMC4255476.
73. Wang LJ, Yu YH, Zhang LG, Wang Y, Niu N, Li Q, Guo LM: Taurine rescues vascular endothelial dysfunction in streptozocin-induced diabetic rats: correlated with downregulation of LOX-1 and ICAM-1 expression on aortas. Eur J Pharmacol 2008, 597:75-80.
74. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature. 1981 Apr 9;290(5806):457-65. doi: 10.1038/290457a0. PMID: 7219534
75. Riva A, Tandler B, Loffredo F, Vazquez E, Hoppel C. Structural differences in two biochemically defined populations of cardiac mitochondria. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2005 Aug;289(2):H868-72. doi: 10.1152/ajpheart.00866.2004. Epub 2005 Apr 8. PMID: 15821034.
76. Kraus B, Cain H. Giant mitochondria in the human myocardium--morphogenesis and fate. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol. 1980;33(1):77-89. doi: 10.1007/BF02899172. PMID: 6110267.
77. Luo J, Shen S, Xia J, Wang J, Gu Z. Mitochondria as the Essence of Yang Qi in the Human Body. Phenomics. 2022 Jun 16;2(5):336-348. doi: 10.1007/s43657-022-00060-3. PMID: 36939762; PMCID: PMC9590506.
78. Luo J, Shen S, Xia J, Wang J, Gu Z. Mitochondria as the Essence of Yang Qi in the Human Body. Phenomics. 2022 Jun 16;2(5):336-348. doi: 10.1007/s43657-022-00060-3. PMID: 36939762; PMCID: PMC9590506.

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

79. Liu Y, Huang Y, Xu C, An P, Luo Y, Jiao L, Luo J, Li Y. Mitochondrial Dysfunction and Therapeutic Perspectives in Cardiovascular Diseases. Int J Mol Sci. 2022 Dec 16;23(24):16053. doi: 10.3390/ijms232416053. PMID: 36555691; PMCID: PMC9788331.
80. Poznyak AV, Nikiforov NG, Wu WK, Kirichenko TV, Orekhov AN. Autophagy and Mitophagy as Essential Components of Atherosclerosis. Cells. 2021 Feb 19;10(2):443. doi: 10.3390/cells10020443. PMID: 33669743; PMCID: PMC7922388.
81. Nahapetyan H, Moulis M, Grousset E, Faccini J, Grazide MH, Mucher E, Elbaz M, Martinet W, Vindis C. Altered mitochondrial quality control in Atg7-deficient VSMCs promotes enhanced apoptosis and is linked to unstable atherosclerotic plaque phenotype. Cell Death Dis. 2019 Feb 11;10(2):119. doi: 10.1038/s41419-019-1400-0. PMID: 30741928; PMCID: PMC6370858.
82. Peoples JN, Saraf A, Ghazal N, Pham TT, Kwong JQ. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in heart disease. Exp Mol Med. 2019 Dec 19;51(12):1-13. doi: 10.1038/s12276-019-0355-7. PMID: 31857574; PMCID: PMC6923355.
83. Madamanchi NR, Runge MS. Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis. Circ Res. 2007 Mar 2;100(4):460-73. doi: 10.1161/01.RES.0000258450.44413.96. PMID: 17332437.
84. Jacinto TA, Meireles GS, Dias AT, Aires R, Porto ML, Gava AL, Vasquez EC, Pereira TMC, Campagnaro BP, Meyrelles SS. Increased ROS production and DNA damage in monocytes are biomarkers of aging and atherosclerosis. Biol Res. 2018 Sep 5;51(1):33. doi: 10.1186/s40659-018-0182-7. PMID: 30185234; PMCID: PMC6123971.
85. Kaludercic N, Di Lisa F. Mitochondrial ROS Formation in the Pathogenesis of Diabetic Cardiomyopathy. Front Cardiovasc Med. 2020 Feb 18;7:12. doi: 10.3389/fcvm.2020.00012. PMID: 32133373; PMCID: PMC7040199.
86. Eirin A, Lerman A, Lerman LO. Mitochondrial injury and dysfunction in hypertension-induced cardiac damage. Eur Heart J. 2014 Dec 7;35(46):3258-66.

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

doi: 10.1093/eurheartj/ehu436. Epub 2014 Nov 10. PMID: 25385092; PMCID: PMC4258226.

87. Takada S, Maekawa S, Furihata T, Kakutani N, Setoyama D, Ueda K, Nambu H, Hagiwara H, Handa H, Fumoto Y, Hata S, Masunaga T, Fukushima A, Yokota T, Kang D, Kinugawa S, Sabe H. Succinyl-CoA-based energy metabolism dysfunction in chronic heart failure. Proc Natl Acad Sci U S A. 2022 Oct 11;119(41):e2203628119. doi: 10.1073/pnas.2203628119. Epub 2022 Oct 6. PMID: 36201541; PMCID: PMC9564216.
88. Park H, He A, Tan M, Johnson JM, Dean JM, Pietka TA, Chen Y, Zhang X, Hsu FF, Razani B, Funai K, Lodhi IJ. Peroxisome-derived lipids regulate adipose thermogenesis by mediating cold-induced mitochondrial fission. J Clin Invest. 2019 Feb 1;129(2):694-711. doi: 10.1172/JCI120606. Epub 2019 Jan 14. PMID: 30511960; PMCID: PMC6355224.
89. Bulló M, Papandreou C, García-Gavilán J, Ruiz-Canela M, Li J, Guasch-Ferré M, Toledo E, Clish C, Corella D, Estruch R, Ros E, Fitó M, Lee CH, Pierce K, Razquin C, Arós F, Serra-Majem L, Liang L, Martínez-González MA, Hu FB, Salas-Salvadó J. Tricarboxylic acid cycle related-metabolites and risk of atrial fibrillation and heart failure. Metabolism. 2021 Dec;125:154915. doi: 10.1016/j.metabol.2021.154915. Epub 2021 Oct 20. PMID: 34678258; PMCID: PMC9206868.
90. Becker PH, Le Guillou E, Duque M, Blondel A, Gons C, Ben Souna H, Imbard A, Fournier N, Gaignard P, Thérond P. Cholesterol accumulation induced by acetylated LDL exposure modifies the enzymatic activities of the TCA cycle without impairing the respiratory chain functionality in macrophages. Biochimie. 2022 Sep;200:87-98. doi: 10.1016/j.biochi.2022.05.011. Epub 2022 May 23. PMID: 35618159.
91. Vuckovic D. Current trends and challenges in sample preparation for global metabolomics using liquid chromatography-mass spectrometry. Anal Bioanal

Chem. 2012 Jun;403(6):1523-48. doi: 10.1007/s00216-012-6039-y. Epub 2012 May 12. PMID: 22576654.

92. Yu Z, Kastenmüller G, He Y, Belcredi P, Möller G, Prehn C, Mendes J, Wahl S, Roemisch-Margl W, Ceglarek U, Polonikov A, Dahmen N, Prokisch H, Xie L, Li Y, Wichmann HE, Peters A, Kronenberg F, Suhre K, Adamski J, Illig T, Wang-Sattler R. Differences between human plasma and serum metabolite profiles. PLoS One. 2011;6(7):e21230. doi: 10.1371/journal.pone.0021230. Epub 2011 Jul 8. PMID: 21760889; PMCID: PMC3132215.
93. Griffin JL, Atherton H, Shockcor J, Atzori L. Metabolomics as a tool for cardiac research. Nat Rev Cardiol. 2011 Sep 20;8(11):630-43. doi: 10.1038/nrcardio.2011.138. PMID: 21931361.
94. Senn T, Hazen SL, Tang WH. Translating metabolomics to cardiovascular biomarkers. Prog Cardiovasc Dis. 2012 Jul-Aug;55(1):70-6. doi: 10.1016/j.pcad.2012.06.004. PMID: 22824112; PMCID: PMC3414418.
95. Chekmeneva E, Dos Santos Correia G, Chan Q, Wijeyesekera A, Tin A, Young JH, Elliott P, Nicholson JK, Holmes E. Optimization and Application of Direct Infusion Nanoelectrospray HRMS Method for Large-Scale Urinary Metabolic Phenotyping in Molecular Epidemiology. J Proteome Res. 2017 Apr 7;16(4):1646-1658. doi: 10.1021/acs.jproteome.6b01003. Epub 2017 Mar 14. PMID: 28245357; PMCID: PMC5387673.
96. Nordström A, Want E, Northen T, Lehtiö J, Siuzdak G. Multiple ionization mass spectrometry strategy used to reveal the complexity of metabolomics. Anal Chem. 2008 Jan 15;80(2):421-9. doi: 10.1021/ac701982e. Epub 2007 Dec 18. PMID: 18085752.
97. Xu Z, Knight R. Dietary effects on human gut microbiome diversity. Br J Nutr. 2015 Jan;113 Suppl(Suppl 0):S1-5. doi: 10.1017/S0007114514004127. Epub 2014 Dec 11. PMID: 25498959; PMCID: PMC4405705.
98. Foye OT, Huang IF, Chiou CC, Walker WA, Shi HN. Early administration of probiotic Lactobacillus acidophilus and/or prebiotic inulin attenuates pathogen-

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

mediated intestinal inflammation and Smad 7 cell signaling. FEMS Immunol Med Microbiol. 2012 Aug;65(3):467-80. doi: 10.1111/j.1574-695X.2012.00978.x. Epub 2012 May 25. PMID: 22524476; PMCID: PMC4015462.

99. Colman RJ, Rubin DT. Fecal microbiota transplantation as therapy for inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. J Crohns Colitis. 2014 Dec;8(12):1569-81. doi: 10.1016/j.crohns.2014.08.006. Epub 2014 Sep 13. Erratum in: J Crohns Colitis. 2022 Aug 16;: PMID: 25223604; PMCID: PMC4296742.
100. Vrieze A, Van Nood E, Holleman F, Salojärvi J, Kootte RS, Bartelsman JF, Dallinga-Thie GM, Ackermans MT, Serlie MJ, Oozeer R, Derrien M, Druesne A, Van Hylckama Vlieg JE, Bloks VW, Groen AK, Heilig HG, Zoetendal EG, Stroes ES, de Vos WM, Hoekstra JB, Nieuwdorp M. Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. Gastroenterology. 2012 Oct;143(4):913-6.e7. doi: 10.1053/j.gastro.2012.06.031. Epub 2012 Jun 20. Erratum in: Gastroenterology. 2013 Jan;144(1):250. PMID: 22728514.
101. Gregory JC, Buffa JA, Org E, Wang Z, Levison BS, Zhu W, Wagner MA, Bennett BJ, Li L, DiDonato JA, Lusis AJ, Hazen SL. Transmission of atherosclerosis susceptibility with gut microbial transplantation. J Biol Chem. 2015 Feb 27;290(9):5647-60. doi: 10.1074/jbc.M114.618249. Epub 2014 Dec 30. PMID: 25550161; PMCID: PMC4342477.
102. De Leon LM, Watson JB, Kelly CR. Transient flare of ulcerative colitis after fecal microbiota transplantation for recurrent Clostridium difficile infection. Clin Gastroenterol Hepatol. 2013 Aug;11(8):1036-8. doi: 10.1016/j.cgh.2013.04.045. Epub 2013 May 10. PMID: 23669309.
103. Li WZ, Stirling K, Yang JJ, Zhang L. Gut microbiota and diabetes: From correlation to causality and mechanism. World J Diabetes. 2020 Jul 15;11(7):293-308. doi: 10.4239/wjd.v11.i7.293. PMID: 32843932; PMCID: PMC7415231.

104. Chen Z, Guo L, Zhang Y, Walzem RL, Pendergast JS, Printz RL, Morris LC, Matafonova E, Stien X, Kang L, Coulon D, McGuinness OP, Niswender KD, Davies SS. Incorporation of therapeutically modified bacteria into gut microbiota inhibits obesity. J Clin Invest. 2014 Aug;124(8):3391-406. doi: 10.1172/JCI72517. Epub 2014 Jun 24. PMID: 24960158; PMCID: PMC4109548.

105. Trasande L, Blustein J, Liu M, Corwin E, Cox LM, Blaser MJ. Infant antibiotic exposures and early-life body mass. Int J Obes (Lond). 2013 Jan;37(1):16-23. doi: 10.1038/ijo.2012.132. Epub 2012 Aug 21. PMID: 22907693; PMCID: PMC3798029.

106. Stepankova R, Tonar Z, Bartova J, Nedorost L, Rossman P, Poledne R, Schwarzer M, Tlaskalova-Hogenova H. Absence of microbiota (germ-free conditions) accelerates the atherosclerosis in ApoE-deficient mice fed standard low cholesterol diet. J Atheroscler Thromb. 2010 Aug 31;17(8):796-804. doi: 10.5551/jat.3285. Epub 2010 Apr 2. PMID: 20379054.

107. Wang Z, Roberts AB, Buffa JA, Levison BS, Zhu W, Org E, Gu X, Huang Y, Zamanian-Daryoush M, Culley MK, DiDonato AJ, Fu X, Hazen JE, Krajcik D, DiDonato JA, Lusis AJ, Hazen SL. Non-lethal Inhibition of Gut Microbial Trimethylamine Production for the Treatment of Atherosclerosis. Cell. 2015 Dec 17;163(7):1585-95. doi: 10.1016/j.cell.2015.11.055. PMID: 26687352; PMCID: PMC4871610.

108. Cook NR, Albert CM, Gaziano JM, Zaharris E, MacFadyen J, Danielson E, Buring JE, Manson JE. A randomized factorial trial of vitamins C and E and beta carotene in the secondary prevention of cardiovascular events in women: results from the Women's Antioxidant Cardiovascular Study. Arch Intern Med. 2007 Aug 13-27;167(15):1610-8. doi: 10.1001/archinte.167.15.1610. PMID: 17698683; PMCID: PMC2034519.

109. Pasupathy S, Tavella R, Grover S, Raman B, Procter NEK, Du YT, Mahadavan G, Stafford I, Heresztyn T, Holmes A, Zeitz C, Arstall M, Selvanayagam J, Horowitz JD, Beltrame JF. Early Use of N-acetylcysteine With Nitrate Therapy in Patients Undergoing Primary Percutaneous Coronary Intervention for ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction Reduces Myocardial Infarct Size (the NACIAM Trial

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

[N-acetylcysteine in Acute Myocardial Infarction]). Circulation. 2017 Sep 5;136(10):894-903. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.027575. Epub 2017 Jun 20. PMID: 28634219.

110. Dey S, DeMazumder D, Sidor A, Foster DB, O'Rourke B. Mitochondrial ROS Drive Sudden Cardiac Death and Chronic Proteome Remodeling in Heart Failure. Circ Res. 2018 Jul 20;123(3):356-371. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.312708. Epub 2018 Jun 13. PMID: 29898892; PMCID: PMC6057154.

111. Adlam VJ, Harrison JC, Porteous CM, James AM, Smith RA, Murphy MP, Sammut IA. Targeting an antioxidant to mitochondria decreases cardiac ischemia-reperfusion injury. FASEB J. 2005 Jul;19(9):1088-95. doi: 10.1096/fj.05-3718com. PMID: 15985532.

112. Zhao K, Luo G, Giannelli S, Szeto HH. Mitochondria-targeted peptide prevents mitochondrial depolarization and apoptosis induced by tert-butyl hydroperoxide in neuronal cell lines. Biochem Pharmacol. 2005 Dec 5;70(12):1796-806. doi: 10.1016/j.bcp.2005.08.022. Epub 2005 Oct 10. PMID: 16216225.

113. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD; Writing Group on the Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Universal Definition of Myocardial Infarction; Thygesen K, Alpert JS, White HD, Jaffe AS, Katus HA, Apple FS, Lindahl B, Morrow DA, Chaitman BA, Clemmensen PM, Johanson P, Hod H, Underwood R, Bax JJ, Bonow RO, Pinto F, Gibbons RJ, Fox KA, Atar D, Newby LK, Galvani M, Hamm CW, Uretsky BF, Steg PG, Wijns W, Bassand JP, Menasché P, Ravkilde J, Ohman EM, Antman EM, Wallentin LC, Armstrong PW, Simoons ML, Januzzi JL, Nieminen MS, Gheorghiade M, Filippatos G, Luepker RV, Fortmann SP, Rosamond WD, Levy D, Wood D, Smith SC, Hu D, Lopez-Sendon JL, Robertson RM, Weaver D, Tendera M, Bove AA, Parkhomenko AN, Vasilieva EJ, Mendis S; ESC Committee for Practice Guidelines (CPG). Third universal definition of myocardial infarction. Eur Heart J. 2012 Oct;33(20):2551-67. doi: 10.1093/eurheartj/ehs184. Epub 2012 Aug 24. PMID: 22922414.

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

114. Roffi M, Patrono C, Collet JP, Mueller C, Valgimigli M, Andreotti F, Bax JJ, Borger MA, Brotons C, Chew DP, Gencer B, Hasenfuss G, Kjeldsen K, Lancellotti P, Landmesser U, Mehilli J, Mukherjee D, Storey RF, Windecker S; ESC Scientific Document Group. 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: Task Force for the Management of Acute Coronary Syndromes in Patients Presenting without Persistent ST-Segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC). Eur Heart J. 2016 Jan 14;37(3):267-315. doi: 10.1093/eurheartj/ehv320. Epub 2015 Aug 29. PMID: 26320110.

115. Wells, G.; Shea, B.; O'Connell, D.; Peterson, J.; Welch, V.; Losos, M.; Tugwell, P. Ottawa Hospital Research Institute. Available online: http://www.ohri.ca/programs/clinical_epidemiology/oxford.asp (accessed on 11 May 2022).

116. Ringel C, Dittrich J, Gaudl A, Schellong P, Beuchel CF, Baber R, Beutner F, Teren A, Engel C, Wirkner K, Thiele H, Büttner P, Löffler M, Scholz M, Thiery J, Ceglarek U. Association of plasma trimethylamine N-oxide levels with atherosclerotic cardiovascular disease and factors of the metabolic syndrome. Atherosclerosis. 2021 Oct;335:62-67. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2021.09.026. Epub 2021 Sep 23. PMID: 34583200.

117. Israr MZ, Bernieh D, Salzano A, Cassambai S, Yazaki Y, Heaney LM, Jones DJL, Ng LL, Suzuki T. Association of gut-related metabolites with outcome in acute heart failure. Am Heart J. 2021 Apr;234:71-80. doi: 10.1016/j.ahj.2021.01.006. Epub 2021 Jan 14. PMID: 33454370.

118. Croyal M, Saulnier PJ, Aguesse A, Gand E, Ragot S, Roussel R, Halimi JM, Ducrocq G, Cariou B, Montaigne D, Wargny M, Krempf M, Hadjadj S. Plasma Trimethylamine N-Oxide and Risk of Cardiovascular Events in Patients With Type 2 Diabetes. J Clin Endocrinol Metab. 2020 Jul 1;105(7):dgaa188. doi: 10.1210/clinem/dgaa188. PMID: 32301490.

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

119. Winther SA, Øllgaard JC, Hansen TW, von Scholten BJ, Reinhard H, Ahluwalia TS, Wang Z, Gæde P, Parving HH, Hazen S, Pedersen O, Rossing P. Plasma trimethylamine N-oxide and its metabolic precursors and risk of mortality, cardiovascular and renal disease in individuals with type 2-diabetes and albuminuria. PLoS One. 2021 Mar 3;16(3):e0244402. doi: 10.1371/journal.pone.0244402. PMID: 33657115; PMCID: PMC7928450.

120. Papandreou C, Bulló M, Hernández-Alonso P, Ruiz-Canela M, Li J, Guasch-Ferré M, Toledo E, Clish C, Corella D, Estruch R, Ros E, Fitó M, Alonso-Gómez A, Fiol M, Santos-Lozano JM, Serra-Majem L, Liang L, Martínez-González MA, Hu FB, Salas-Salvadó J. Choline Metabolism and Risk of Atrial Fibrillation and Heart Failure in the PREDIMED Study. Clin Chem. 2021 Jan 8;67(1):288-297. doi: 10.1093/clinchem/hvaa224. PMID: 33257943; PMCID: PMC7793226.

121. Roncal C, Martínez-Aguilar E, Orbe J, Ravassa S, Fernandez-Montero A, Saenz-Pipaon G, Ugarte A, Estella-Hermoso de Mendoza A, Rodriguez JA, Fernández-Alonso S, Fernández-Alonso L, Oyarzabal J, Paramo JA. Trimethylamine-N-Oxide (TMAO) Predicts Cardiovascular Mortality in Peripheral Artery Disease. Sci Rep. 2019 Oct 30;9(1):15580. doi: 10.1038/s41598-019-52082-z. PMID: 31666590; PMCID: PMC6821861.

122. Huang J, Weinstein SJ, Moore SC, Derkach A, Hua X, Liao LM, Gu F, Mondul AM, Sampson JN, Albanes D. Serum Metabolomic Profiling of All-Cause Mortality: A Prospective Analysis in the Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention (ATBC) Study Cohort. Am J Epidemiol. 2018 Aug 1;187(8):1721-1732. doi: 10.1093/aje/kwy017. PMID: 29390044; PMCID: PMC6070082.

123. Fan PC, Chang JC, Lin CN, Lee CC, Chen YT, Chu PH, Kou G, Lu YA, Yang CW, Chen YC. Serum indoxyl sulfate predicts adverse cardiovascular events in patients with chronic kidney disease. J Formos Med Assoc. 2019 Jul;118(7):1099-1106. doi: 10.1016/j.jfma.2019.03.005. Epub 2019 Mar 28. PMID: 30928187.

124. Cheng S, Larson MG, McCabe EL, Murabito JM, Rhee EP, Ho JE, Jacques PF, Ghorbani A, Magnusson M, Souza AL, Deik AA, Pierce KA, Bullock K, O'Donnell CJ,

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

Melander O, Clish CB, Vasan RS, Gerszten RE, Wang TJ. Distinct metabolomic signatures are associated with longevity in humans. Nat Commun. 2015 Apr 13;6:6791. doi: 10.1038/ncomms7791. Erratum in: Nat Commun. 2015;6:7317. PMID: 25864806; PMCID: PMC4396657.

125. Yu B, Heiss G, Alexander D, Grams ME, Boerwinkle E. Associations Between the Serum Metabolome and All-Cause Mortality Among African Americans in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. Am J Epidemiol. 2016 Apr 1;183(7):650-6. doi: 10.1093/aje/kwv213. Epub 2016 Mar 7. PMID: 26956554; PMCID: PMC4801134.

126. Tobias DK, Lawler PR, Harada PH, Demler OV, Ridker PM, Manson JE, Cheng S, Mora S. Circulating Branched-Chain Amino Acids and Incident Cardiovascular Disease in a Prospective Cohort of US Women. Circ Genom Precis Med. 2018 Apr;11(4):e002157. doi: 10.1161/CIRCGEN.118.002157. PMID: 29572205; PMCID: PMC5880282.

127. Du X, Li Y, Wang Y, You H, Hui P, Zheng Y, Du J. Increased branched-chain amino acid levels are associated with long-term adverse cardiovascular events in patients with STEMI and acute heart failure. Life Sci. 2018 Sep 15;209:167-172. doi: 10.1016/j.lfs.2018.08.011. Epub 2018 Aug 6. PMID: 30092297.

128. Balasubramanian R, Paynter NP, Giulianini F, Manson JE, Zhao Y, Chen JC, Vitolins MZ, Albert CA, Clish C, Rexrode KM. Metabolomic profiles associated with all-cause mortality in the Women's Health Initiative. Int J Epidemiol. 2020 Feb 1;49(1):289-300. doi: 10.1093/ije/dyz211. PMID: 31651959; PMCID: PMC7124492.

129. Ruiz-Canela M, Hruby A, Clish CB, Liang L, Martínez-González MA, Hu FB. Comprehensive Metabolomic Profiling and Incident Cardiovascular Disease: A Systematic Review. J Am Heart Assoc. 2017 Sep 28;6(10):e005705. doi: 10.1161/JAHA.117.005705. PMID: 28963102; PMCID: PMC5721826.

130. Yao ME, Liao PD, Zhao XJ, Wang L. Trimethylamine-N-oxide has prognostic value in coronary heart disease: a meta-analysis and dose-response analysis. BMC

Cardiovasc Disord. 2020 Jan 9;20(1):7. doi: 10.1186/s12872-019-01310-5. PMID: 31918665; PMCID: PMC6953212.

131. Heianza Y, Ma W, Manson JE, Rexrode KM, Qi L. Gut Microbiota Metabolites and Risk of Major Adverse Cardiovascular Disease Events and Death: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Studies. J Am Heart Assoc. 2017 Jun 29;6(7):e004947. doi: 10.1161/JAHA.116.004947. PMID: 28663251; PMCID: PMC5586261.

132. Schiattarella GG, Sannino A, Toscano E, Giugliano G, Gargiulo G, Franzone A, Trimarco B, Esposito G, Perrino C. Gut microbe-generated metabolite trimethylamine-N-oxide as cardiovascular risk biomarker: a systematic review and dose-response meta-analysis. Eur Heart J. 2017 Oct 14;38(39):2948-2956. doi: 10.1093/eurheartj/ehx342. PMID: 29020409.

133. Qi J, You T, Li J, Pan T, Xiang L, Han Y, Zhu L. Circulating trimethylamine N-oxide and the risk of cardiovascular diseases: a systematic review and meta-analysis of 11 prospective cohort studies. J Cell Mol Med. 2018 Jan;22(1):185-194. doi: 10.1111/jcmm.13307. Epub 2017 Aug 7. PMID: 28782886; PMCID: PMC5742728.

134. Ruiz-Canela M, Hruby A, Clish CB, Liang L, Martínez-González MA, Hu FB. Comprehensive Metabolomic Profiling and Incident Cardiovascular Disease: A Systematic Review. J Am Heart Assoc. 2017 Sep 28;6(10):e005705. doi: 10.1161/JAHA.117.005705. PMID: 28963102; PMCID: PMC5721826.

135. Tobias DK, Lawler PR, Harada PH, Demler OV, Ridker PM, Manson JE, Cheng S, Mora S. Circulating Branched-Chain Amino Acids and Incident Cardiovascular Disease in a Prospective Cohort of US Women. Circ Genom Precis Med. 2018 Apr;11(4):e002157. doi: 10.1161/CIRCGEN.118.002157. PMID: 29572205; PMCID: PMC5880282.

136. Du X, Li Y, Wang Y, You H, Hui P, Zheng Y, Du J. Increased branched-chain amino acid levels are associated with long-term adverse cardiovascular events in patients with STEMI and acute heart failure. Life Sci. 2018 Sep 15;209:167-172. doi: 10.1016/j.lfs.2018.08.011. Epub 2018 Aug 6. PMID: 30092297.

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

137. Huang J, Weinstein SJ, Moore SC, Derkach A, Hua X, Liao LM, Gu F, Mondul AM, Sampson JN, Albanes D. Serum Metabolomic Profiling of All-Cause Mortality: A Prospective Analysis in the Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention (ATBC) Study Cohort. Am J Epidemiol. 2018 Aug 1;187(8):1721-1732. doi: 10.1093/aje/kwy017. PMID: 29390044; PMCID: PMC6070082.

138. Fan PC, Chang JC, Lin CN, Lee CC, Chen YT, Chu PH, Kou G, Lu YA, Yang CW, Chen YC. Serum indoxyl sulfate predicts adverse cardiovascular events in patients with chronic kidney disease. J Formos Med Assoc. 2019 Jul;118(7):1099-1106. doi: 10.1016/j.jfma.2019.03.005. Epub 2019 Mar 28. PMID: 30928187.

139. Schiattarella GG, Sannino A, Toscano E, Giugliano G, Gargiulo G, Franzone A, Trimarco B, Esposito G, Perrino C. Gut microbe-generated metabolite trimethylamine-N-oxide as cardiovascular risk biomarker: a systematic review and dose-response meta-analysis. Eur Heart J. 2017 Oct 14;38(39):2948-2956. doi: 10.1093/eurheartj/ehx342. PMID: 29020409.

140. Xu Y, Liu X, Liu X, Chen D, Wang M, Jiang X, Xiong Z. The Roles of the Gut Microbiota and Chronic Low-Grade Inflammation in Older Adults With Frailty. Front Cell Infect Microbiol. 2021 Jul 1;11:675414. doi: 10.3389/fcimb.2021.675414. PMID: 34277468; PMCID: PMC8282182.

141. Frazier R, Cai X, Lee J, Bundy JD, Jovanovich A, Chen J, Deo R, Lash JP, Anderson AH, Go AS, Feldman HI, Shafi T, Rhee EP, Miyazaki M, Chonchol M, Isakova T; Chronic Renal Insufficiency Cohort (CRIC) Study Investigators. Deoxycholic Acid and Risks of Cardiovascular Events, ESKD, and Mortality in CKD: The CRIC Study. Kidney Med. 2021 Nov 11;4(1):100387. doi: 10.1016/j.xkme.2021.09.004. PMID: 35072049; PMCID: PMC8767130.

142. Stamler J, Daviglus ML, Garside DB, Dyer AR, Greenland P, Neaton JD. Relationship of baseline serum cholesterol levels in 3 large cohorts of younger men to long-term coronary, cardiovascular, and all-cause mortality and to longevity. JAMA. 2000 Jul 19;284(3):311-8. doi: 10.1001/jama.284.3.311. PMID: 10891962.

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

143. Balasubramanian R, Paynter NP, Giulianini F, Manson JE, Zhao Y, Chen JC, Vitolins MZ, Albert CA, Clish C, Rexrode KM. Metabolomic profiles associated with all-cause mortality in the Women's Health Initiative. Int J Epidemiol. 2020 Feb 1;49(1):289-300. doi: 10.1093/ije/dyz211. PMID: 31651959; PMCID: PMC7124492.

144. Yao ME, Liao PD, Zhao XJ, Wang L. Trimethylamine-N-oxide has prognostic value in coronary heart disease: a meta-analysis and dose-response analysis. BMC Cardiovasc Disord. 2020 Jan 9;20(1):7. doi: 10.1186/s12872-019-01310-5. PMID: 31918665; PMCID: PMC6953212.

145. Missailidis C, Hällqvist J, Qureshi AR, Barany P, Heimbürger O, Lindholm B, Stenvinkel P, Bergman P. Serum Trimethylamine-N-Oxide Is Strongly Related to Renal Function and Predicts Outcome in Chronic Kidney Disease. PLoS One. 2016 Jan 11;11(1):e0141738. doi: 10.1371/journal.pone.0141738. PMID: 26751065; PMCID: PMC4709190.

146. Mueller DM, Allenspach M, Othman A, Saely CH, Muendlein A, Vonbank A, Drexel H, von Eckardstein A. Plasma levels of trimethylamine-N-oxide are confounded by impaired kidney function and poor metabolic control. Atherosclerosis. 2015 Dec;243(2):638-44. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.10.091. Epub 2015 Oct 24. PMID: 26554714.

147. Currie CJ, Berni ER, Berni TR, Jenkins-Jones S, Sinsakul M, Jermutus L, Ambery P, Jain M. Major adverse cardiovascular events in people with chronic kidney disease in relation to disease severity and diabetes status. PLoS One. 2019 Aug 28;14(8):e0221044. doi: 10.1371/journal.pone.0221044. PMID: 31461449; PMCID: PMC6713399.

148. Gruppen EG, Garcia E, Connelly MA, Jeyarajah EJ, Otvos JD, Bakker SJL, Dullaart RPF. TMAO is Associated with Mortality: Impact of Modestly Impaired Renal Function. Sci Rep. 2017 Oct 23;7(1):13781. doi: 10.1038/s41598-017-13739-9. PMID: 29061990; PMCID: PMC5653802.

149. Marenzi G, Cabiati A, Assanelli E. Chronic kidney disease in acute coronary syndromes. World J Nephrol. 2012 Oct 6;1(5):134-45. doi: 10.5527/wjn.v1.i5.134. PMID: 24175251; PMCID: PMC3782212.

150. Svingen GF, Ueland PM, Pedersen EK, Schartum-Hansen H, Seifert R, Ebbing M, Løland KH, Tell GS, Nygård O. Plasma dimethylglycine and risk of incident acute myocardial infarction in patients with stable angina pectoris. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2013 Aug;33(8):2041-8. doi: 10.1161/ATVBAHA.113.301714. Epub 2013 May 30. PMID: 23723367.

151. Millian NS, Garrow TA. Human betaine-homocysteine methyltransferase is a zinc metalloenzyme. Arch Biochem Biophys. 1998 Aug 1;356(1):93-8. doi: 10.1006/abbi.1998.0757. PMID: 9681996.

152. Wang H, Liu Z, Shao J, Lin L, Jiang M, Wang L, Lu X, Zhang H, Chen Y, Zhang R. Immune and Inflammation in Acute Coronary Syndrome: Molecular Mechanisms and Therapeutic Implications. J Immunol Res. 2020 Aug 18;2020:4904217. doi: 10.1155/2020/4904217. PMID: 32908939; PMCID: PMC7450309.

153. Lubrano V, Pingitore A, Traghella I, Storti S, Parri S, Berti S, Ndreu R, Andrenelli A, Palmieri C, Iervasi G, Mastorci F, Vassalle C. Emerging Biomarkers of Oxidative Stress in Acute and Stable Coronary Artery Disease: Levels and Determinants. Antioxidants (Basel). 2019 May 1;8(5):115. doi: 10.3390/antiox8050115. PMID: 31052417; PMCID: PMC6562723.

154. McGregor DO, Dellow WJ, Lever M, George PM, Robson RA, Chambers ST. Dimethylglycine accumulates in uremia and predicts elevated plasma homocysteine concentrations. Kidney Int. 2001 Jun;59(6):2267-72. doi: 10.1046/j.1523-1755.2001.00743.x. PMID: 11380830.

155. Gibala MJ, Young ME, Taegtmeyer H. Anaplerosis of the citric acid cycle: role in energy metabolism of heart and skeletal muscle. Acta Physiol Scand. 2000 Apr;168(4):657-65. doi: 10.1046/j.1365-201x.2000.00717.x. PMID: 10759602.

156. Bulló M, Papandreou C, García-Gavilán J, Ruiz-Canela M, Li J, Guasch-Ferré M, Toledo E, Clish C, Corella D, Estruch R, Ros E, Fitó M, Lee CH, Pierce K, Razquin C,

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

Arós F, Serra-Majem L, Liang L, Martínez-González MA, Hu FB, Salas-Salvadó J. Tricarboxylic acid cycle related-metabolites and risk of atrial fibrillation and heart failure. Metabolism. 2021 Dec;125:154915. doi: 10.1016/j.metabol.2021.154915. Epub 2021 Oct 20. PMID: 34678258; PMCID: PMC9206868.

157. Chistiakov DA, Shkurat TP, Melnichenko AA, Grechko AV, Orekhov AN. The role of mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease: a brief review. Ann Med. 2018 Mar;50(2):121-127. doi: 10.1080/07853890.2017.1417631. Epub 2017 Dec 18. PMID: 29237304.

158. Neglia D, De Caterina A, Marraccini P, Natali A, Ciardetti M, Vecoli C, Gastaldelli A, Ciociaro D, Pellegrini P, Testa R, Menichetti L, L'Abbate A, Stanley WC, Recchia FA. Impaired myocardial metabolic reserve and substrate selection flexibility during stress in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2007 Dec;293(6):H3270-8. doi: 10.1152/ajpheart.00887.2007. Epub 2007 Oct 5. PMID: 17921325.

159. Khan MU, Cheema Y, Shahbaz AU, Ahokas RA, Sun Y, Gerling IC, Bhattacharya SK, Weber KT. Mitochondria play a central role in nonischemic cardiomyocyte necrosis: common to acute and chronic stressor states. Pflugers Arch. 2012 Jul;464(1):123-31. doi: 10.1007/s00424-012-1079-x. Epub 2012 Feb 11. PMID: 22328074; PMCID: PMC3386379.

160. Noh MR, Kong MJ, Han SJ, Kim JI, Park KM. Isocitrate dehydrogenase 2 deficiency aggravates prolonged high-fat diet intake-induced hypertension. Redox Biol. 2020 Jul;34:101548. doi: 10.1016/j.redox.2020.101548. Epub 2020 Apr 25. PMID: 32388270; PMCID: PMC7210593.

161. Guasch-Ferré M, Santos JL, Martínez-González MA, Clish CB, Razquin C, Wang D, Liang L, Li J, Dennis C, Corella D, Muñoz-Bravo C, Romaguera D, Estruch R, Santos-Lozano JM, Castañer O, Alonso-Gómez A, Serra-Majem L, Ros E, Canudas S, Asensio EM, Fitó M, Pierce K, Martínez JA, Salas-Salvadó J, Toledo E, Hu FB, Ruiz-Canela M. Glycolysis/gluconeogenesis- and tricarboxylic acid cycle-related metabolites, Mediterranean diet, and type 2 diabetes. Am J Clin Nutr. 2020 Apr

Universitat Rovira i Virgili
IMPACTO DE LOS METABOLITOS ASOCIADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

1;111(4):835-844. doi: 10.1093/ajcn/nqaa016. PMID: 32060497; PMCID: PMC7138680.

162. Wan Y, Yuan J, Li J, Li H, Yin K, Wang F, Li D. Overweight and underweight status are linked to specific gut microbiota and intestinal tricarboxylic acid cycle intermediates. Clin Nutr. 2020 Oct;39(10):3189-3198. doi: 10.1016/j.clnu.2020.02.014. Epub 2020 Feb 15. PMID: 32164980.

163. Benderdour M, Charron G, Comte B, Ayoub R, Beaudry D, Foisy S, Deblois D, Des Rosiers C. Decreased cardiac mitochondrial NADP+-isocitrate dehydrogenase activity and expression: a marker of oxidative stress in hypertrophy development. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2004 Nov;287(5):H2122-31. doi: 10.1152/ajpheart.00378.2004. Epub 2004 Jul 22. PMID: 15271667.

164. Peng Z, Zhan Q, Xie X, Li H, Tu Y, Bai Y, Huang X, Lai W, Zhao B, Zeng Q, Xu D. Association between admission plasma 2-oxoglutarate levels and short-term outcomes in patients with acute heart failure: a prospective cohort study. Mol Med. 2019 Mar 28;25(1):8. doi: 10.1186/s10020-019-0078-1. PMID: 30922225; PMCID: PMC6437898.

165. Ku HC, Shen TC, Cheng CF. The potential of using itaconate as treatment for inflammation-related heart diseases. Tzu Chi Med J. 2021 Aug 14;34(2):113-118. doi: 10.4103/tcmj.tcmj_83_21. PMID: 35465278; PMCID: PMC9020236.

166. Matsushita K, Selvin E, Bash LD, Franceschini N, Astor BC, Coresh J. Change in estimated GFR associates with coronary heart disease and mortality. J Am Soc Nephrol. 2009 Dec;20(12):2617-24. doi: 10.1681/ASN.2009010025. Epub 2009 Nov 5. PMID: 19892932; PMCID: PMC2794225.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IMPACTO DE LOS METABOLITOS RELACIONADOS CON EL MICROBIOMA INTESTINAL
Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL SOBRE LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES TRAS UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO
Raúl Sánchez Giménez

UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI