

# N-ÓXIDO DE TRIMETILAMINA Y SU RELACIÓN CON LA ENFERMEDAD CORONARIA

## N-OXIDE OF TRIMETHYLAMINE AND ITS RELATIONSHIP WITH CORONARY DISEASE

LORENA E. MACIEZRYNSKI<sup>1</sup>

### RESUMEN

Además de los factores de riesgo tradicionales de enfermedad cardiovascular, ha sido reconocida en los últimos años la influencia ejercida por el metabolismo de los microbios intestinales en la patogenia de esta enfermedad. El metabolismo bacteriano intestinal de la fosfatidilcolina, la principal fuente dietética de colina, ha demostrado producir un metabolito proaterogénico, el N-óxido de trimetilamina (TMAO), a través de la formación inicial de trimetilamina (TMA). La dieta rica en carne roja ha demostrado presentar alta concentración de L-carnitina, una fuente alternativa para la formación de TMAO dependiente de la flora intestinal, con el consecuente mayor desarrollo de aterosclerosis y sus consecuencias clínicas. Las observaciones recientes indican que el metabolismo intestinal puede representar un objetivo terapéutico prometedor con respecto a la gestión de las enfermedades cardiovasculares.

**Palabras clave:** enfermedad cardiovascular; enfermedad de la arteria coronaria; aterosclerosis; microbioma gastrointestinal; colina; nutrición.

### ABSTRACT

In addition to the traditional risk factors of cardiovascular disease, the influence exerted by the metabolism of intestinal microbes in the pathogenesis of this disease has been recognized in recent years. The intestinal bacterial metabolism of phosphatidylcholine, the main dietary source of choline, has been shown to produce a proatherogenic metabolite, trimethylamine N-oxide (TMAO), through the initial formation of trimethylamine (TMA). The diet rich in red meat has been shown to have a high concentration of L-carnitine, an alternative source for the formation of TMAO dependent on the intestinal flora, with the consequent greater development of atherosclerosis and its clinical consequences. Recent observations indicate that intestinal metabolism may represent a promising therapeutic objective with respect to the management of cardiovascular diseases.

**Keywords:** cardiovascular disease; coronary artery disease; atherosclerosis; gastrointestinal microbiome; choline; nutrition.

REVISTA CONAREC 2018;34(143):28-36 | VERSIÓN WEB WWW.REVISTACONAREC.COM.AR

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años las enfermedades cardiovasculares han sido uno de los problemas sanitarios más graves tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo, causando muerte e invalidez con cifras de alto impacto epidemiológico.

A pesar de los avances en el tratamiento médico, las técnicas de revascularización coronaria contemporáneas y la modificación de los factores de riesgo, la enfermedad coronaria sigue siendo la primera causa de morbimortalidad en los países desarrollados, proyectándose como primera causa de mortalidad para el año 2030 (alrededor de 23,3 millones de personas por enfermedad cardiovascular) en los países desarrollados y la tercera en los países en vías de desarrollo<sup>1</sup>.

En la República Argentina, el 32% de muertes son por causa cardiovascular y se registra el 13% de años de vida potencialmente perdidos (AVPP), a lo que se debe sumar los años vividos con discapacidad y el alto impacto socioeconómico en el sistema de salud. Una estrategia poblacional de promoción y prevención primaria, actuando sobre

los factores de riesgo, es considerada la estrategia más costo-efectiva, sostenible y financiable para afrontar esta verdadera epidemia<sup>2</sup>.

Hay una necesidad urgente de identificar factores de riesgo residual para mejorar nuestra comprensión de los procesos que contribuyen a la patogénesis de la enfermedad arterial coronaria (EAC) y la placa vulnerable e identificar nuevas dianas terapéuticas. Por ello, el objetivo de esta monografía es determinar si en los trabajos científicos realizados hasta la actualidad se ha podido comprobar la existencia de la relación entre la producción de N-óxido de trimetilamina (TMAO) dependiente de la microbiota intestinal y el desarrollo de aterosclerosis y enfermedad coronaria.

Los últimos años han sido testigos de un creciente conocimiento de que la microbiota intestinal actúa como participante activo en la expresión de fenotipos metabólicos complejos, tales como la resistencia a la insulina y la obesidad. La investigación en modelos animales y estudios clínicos en humanos demostraron que el metabolismo microbiano intestinal de ciertos nutrientes de la dieta también puede influir en el desarrollo de la aterosclerosis. Específicamente, el metabolismo bacteriano intestinal de la fosfatidilcolina, la principal fuente dietética de colina, ha demostrado producir un metabolito proaterogénico, el TMAO, a través de la formación inicial de trimetilamina (TMA) en primer lugar, y posteriormente la conversión a TMAO mediada por la enzima hepática flavina monooxigenasa<sup>3-5</sup>.

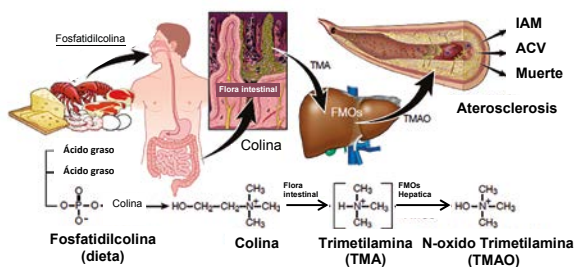
Estudios posteriores identificaron un nutriente alternativo que contiene TMA predominantemente en carne roja, la L-carnitina, como otra fuente dietética para formación de TMAO dependiente de la flora intestinal y la mayor producción de aterosclerosis<sup>3</sup>.

1. Residente de Cardiología.  
Hospital Militar Central. CABA.

✉ **Correspondencia:** Dra. Lorena E. Maciezrynski. Av. Luis María Campos 726. CP 1426. CABA. Rep. Argentina. lorena.elisa@live.com

Los autores declaran no poseer conflictos de intereses.

Recibido: 20/11/2017 | Aceptado: 02/02/2018



**Figura 1.** Metabolismo de la fosfatidilcolina dependiente de la flora intestinal y la aterosclerosis. Resumen esquemático que ilustra la vía de generación del metabolito proaterosclerótico dependiente de la flora intestinal a partir de la fosfatidilcolina de la dieta. Modificado de: Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, Koeth R, Levison BS, DuGar B, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature*.2011;472(7341):57-63. FMOs: enzimas flavina monooxigenasas. IAM: infarto agudo de miocardio. ACV: accidente cerebrovascular

En los últimos estudios clínicos en humanos, los niveles plasmáticos de L-carnitina en más de 2500 sujetos se asociaron de forma independiente con un futuro mayor riesgo de infarto agudo de miocardio (IAM), accidente cerebrovascular (ACV) o muerte, pero solo entre los sujetos con niveles concomitantemente elevados de TMAO. Por lo que dicho metabolito dependiente de la microbiota intestinal ha demostrado ser culpable de promover el fenotipo proaterosclerótico<sup>3</sup>.

Se ha observado que los niveles de TMAO en sangre son mucho menores en los vegetarianos que en aquellos con dietas omnívoras. Al parecer, la microbiota capaz de metabolizar la carnitina y la colina aumenta cuando la dieta es rica en estos compuestos, de tal forma que un vegano o vegetariano cuya flora no contiene este perfil, no es capaz de producir la misma cantidad de TMAO que una persona omnívora; ello sugiere que el metabolismo microbiano intestinal de L-carnitina en TMAO puede en parte ayudar a explicar la asociación observada comúnmente entre el consumo de carne roja y el riesgo cardiovascular<sup>3,6</sup>.

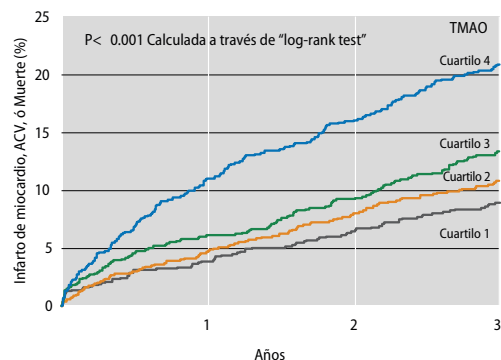
Múltiples mecanismos han contribuido a incrementar la aterosclerosis dependiente de TMAO, incluyendo la inhibición de la vía de transporte inverso del colesterol, alteraciones en el colesterol hepático e intestinal y el metabolismo de los ácidos biliares, y cambios en el fenotipo de los macrófagos en la pared arterial<sup>3-5</sup>.

Es importante destacar que, además de la relación anteriormente mencionada entre los niveles de carnitina y los riesgos cardíacos, los estudios clínicos en humanos también demuestran que tanto el nivel plasmático de colina como también el de TMAO actúan como predictores independientes de riesgo de enfermedades cardiovasculares (ECV) y desarrollo prospectivo de eventos cardiovasculares mayores, incluyendo IAM, ACV y muerte<sup>3-7</sup>.

Por lo tanto, un creciente conjunto de evidencia sugiere una relación mecánica entre la TMA proveniente de la dieta, tales como colina, fosfatidilcolina o L-carnitina, y el desarrollo de la aterosclerosis a través de la producción de TMAO dependiente de la microbiota intestinal.

## METODOLOGÍA

La realización de la presente monografía fue precedida por una extensa búsqueda de material informativo a través de las bases PubMed y Medline.



### Pacientes en riesgo

Cuartilo 1	1001	933	869	827
Cuartilo 2	998	940	884	843
Cuartilo 3	1003	938	888	835
Cuartilo 4	1005	913	849	791

**Figura 2.** Kaplan-Meier. Las estimaciones de eventos cardiovasculares adversos, conforme los cuartiles según los niveles de TMAO. Se muestran los datos de 4007 participantes según los resultados clínicos del estudio. El valor P es para todas las comparaciones. Modificado de: Wilson Tang WH, Wang Z, Levison BS, Koeth RS, Britt EB, Fu X, et al. Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. *N Engl J Med*. 2013;368(17):1575-84. ACV: accidente cerebrovascular. TMAO: N-óxido de trimetilamina.

Los trabajos científicos analizados fueron de acceso gratuito y los que requirieron desembolso monetario para su adquisición se solicitaron por vía *e-mail* a la biblioteca de la Sociedad Argentina de Cardiología. La búsqueda se completó con material de autores nacionales por medio de la revisión de publicaciones en medios oficiales.

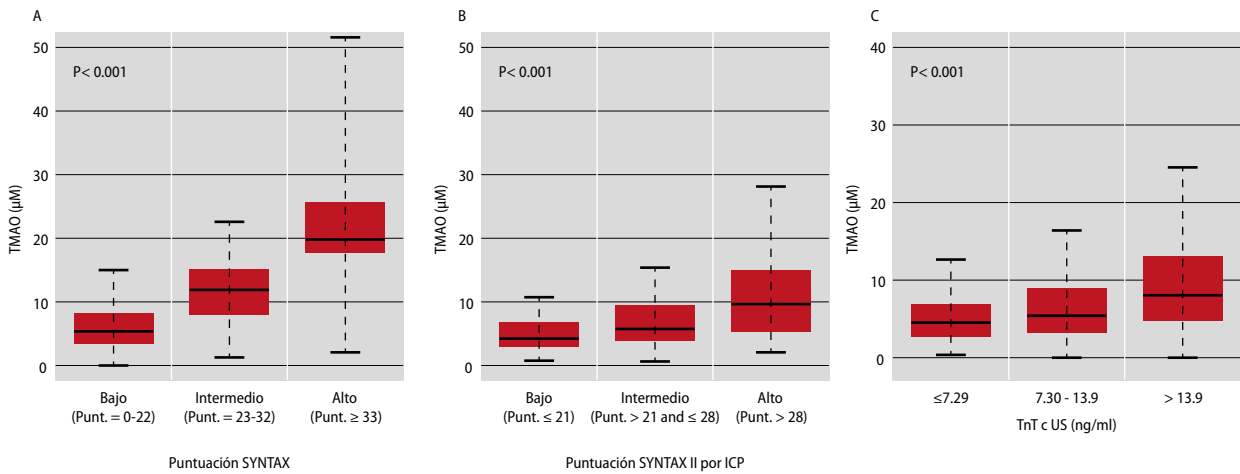
El análisis inicial de la literatura encontrada y de las citas bibliográficas referidas en dichos trabajos dio lugar a que surgieran nuevas búsquedas relacionadas con los diferentes capítulos de la monografía.

## DESARROLLO

### LA MICROBIOTA INTESTINAL. GENERALIDADES

Nuestra mayor exposición ambiental es lo que comemos. Técnicamente hablando, la comida es un objeto extraño que tenemos en nuestros cuerpos en cantidades de aproximadamente un kilogramo cada día. Sin embargo, la composición de la dieta es a menudo difícil de evaluar e incluso la cuantificación precisa de la ingesta dietética podría no necesariamente revelar varios factores conocidos y desconocidos que pueden influir en los aportes específicos de nutrientes de la dieta con susceptibilidad a enfermedades. También ha habido una abrumadora falta de apreciación respecto a los complejos y complicados procesos que transforman los alimentos ingeridos en innumerables metabolitos que entran en la circulación y cumplen o afectan negativamente varias funciones y procesos metabólicos en el organismo<sup>8</sup>.

Durante la última década hemos comenzado a apreciar cada vez más la diversidad ecológica de los microbios que viven simbióticamente dentro de nosotros, representando una gran proporción aquellos que residen dentro de nuestros intestinos. Ahora sabemos que el intestino humano alberga más de 100 billones de células microbianas, superando lejos en número a las células huésped humanas del cuerpo<sup>9</sup>.



**Figura 3.** Relación entre TMAO y medidas de puntuación de enfermedad coronaria y mionecrosis subclínica. Modificado de Senthong V, Li XS, Hudec T, Coughlin J, Wu Y, Levison B, et al. Plasma trimethylamine N-oxide, a gut microbe-generated phosphatidylcholine metabolite, is associated with atherosclerotic burden. *J Am Coll Cardiol.* 2016;67(22):2620-8. **TnTc US:** troponina T cardíaca ultrasensible. **ICP:** intervención coronaria percutánea. **TMAO:** N-óxido de trimetilamina.

Nuestros huéspedes simbiotes microbianos han coevolucionado con nosotros y afectan a una amplia gama de procesos fisiológicos y metabólicos del cuerpo. Los principales taxones presentes en la microbiota intestinal consisten principalmente en dos importantes filos de bacterias, *Firmicutes* y *Bacteroides*, cuyas proporciones parecen seguir siendo muy estable en el tiempo<sup>10,11</sup>. Sin embargo, la composición de la microbiota intestinal restante es extraordinariamente diversa y dinámica, con exposiciones alimentarias tanto aguda como crónica que afectan significativamente la comunidad microbiana total<sup>9,12</sup>. Por lo tanto, el metabolismo y la absorción de alimentos tienen lugar a través del filtro estable y dinámico de miles de millones de bacterias que pueblan nuestro sistema digestivo, por lo que la microbiota intestinal es el filtro de nuestra mayor exposición ambiental.

La composición de nuestra comunidad microbiana intestinal se ve afectada no solo por las exposiciones alimentarias, sino también por las variantes genéticas dentro del huésped. Por lo tanto, existe una interacción compleja y un tanto dinámica entre las exposiciones alimentarias agudas y crónicas, una fluida comunidad microbiana intestinal, el genotipo del huésped y otras exposiciones ambientales externas que influyen colectivamente en el metabolismo, fisiología global y susceptibilidad a enfermedades<sup>13</sup>.

Existe una gran contribución de la disbiosis (cambios anormales en la composición de la microbiota intestinal) a la patogénesis de algunas enfermedades que alteran la salud intestinal. Específicamente, derivados intestinales de endotoxinas tales como lipopolisacáridos<sup>14</sup>, sulfato de indoxilo<sup>15</sup> y sulfato de p-cresilo<sup>16</sup> se han implicado en desempeñar importantes funciones metabólicas en condiciones que van desde la aterosclerosis a la disfunción cardiorenal<sup>17,18</sup>.

Sin embargo, recientes avances también han revelado de manera más sutil que diferencias en la composición de la microbiota intestinal se asocian con el desarrollo de trastornos metabólicos complejos, tales como la obesidad y la resistencia a la insulina<sup>19,20</sup>.

El ecosistema microbiano intestinal es posiblemente el mayor órgano endocrino en el cuerpo, capaz de producir una amplia gama de compuestos biológicamente activos que, como las hormonas, pueden ser trans-

portadas en la circulación y distribuidos a sitios distantes dentro del huésped, lo que influye en diferentes procesos biológicos esenciales.

## NUTRIENTES DE LA DIETA Y LA PRODUCCIÓN DE TRIMETILAMINA (TMA)

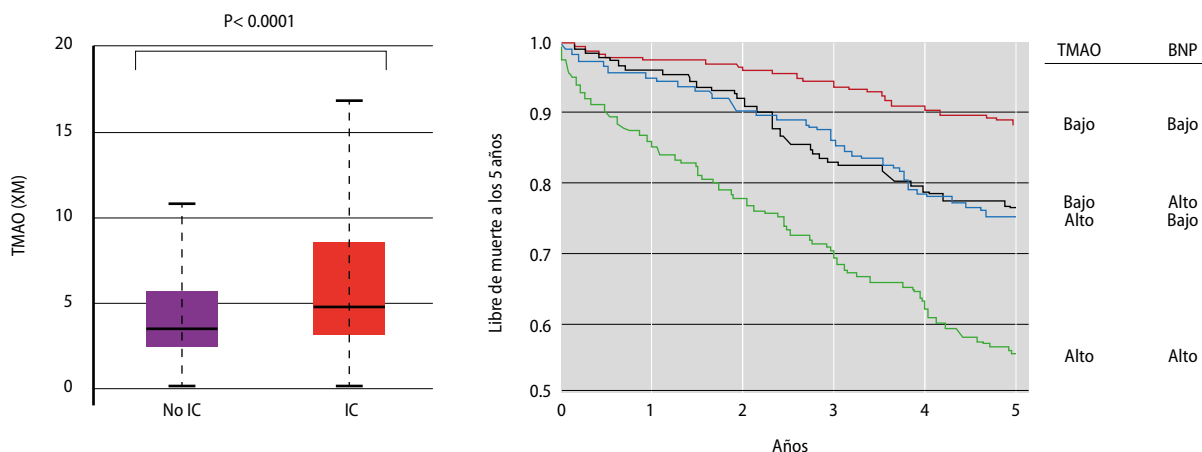
Las diferentes fuentes exógenas que pueden resultar en la producción de TMAO a través de la microbiota intestinal, y los medios de la dieta por la que pueden ser consumidos por los seres humanos son los siguientes:

### LA FOSFATIDILCOLINA / COLINA

La fosfatidilcolina (FC), también comúnmente referida por su denominación genérica, lecitina, representa una clase de fosfolípidos que contienen colina como principal componente. Es una sustancia natural que se encuentra en muchos alimentos, algunos de los cuales son las carnes rojas (especialmente hígado), huevos, soja, cacahuetes. Es un componente esencial para la estabilidad de las membranas biológicas y es el principal componente fosfolípido de las lipoproteínas de muy baja densidad y de baja densidad (VLDL / LDL) de la circulación<sup>21</sup>.

Se puede oxidar a betaína. Tanto colina como betaína se han relacionado con bajos niveles de homocisteína en plasma y la reducción de la inflamación<sup>20,22</sup>. Como la dislipidemia, la inflamación, la hiperhomocisteinemia y la agregación plaquetaria se han relacionado con eventos cardiovasculares, se recomienda la suplementación tanto con colina como con lecitina para la protección cardiovascular<sup>22,23</sup>. De hecho, se ha demostrado que la ingesta dietética de colina y betaína hace menos susceptibles a los individuos de desarrollar enfermedades cardiovasculares y por tanto puede prevenir las mediante la atenuación de la inflamación<sup>20,24,25</sup>.

La FC es un significativo componente de la bilis y se ha demostrado que constituye hasta el 40% del material orgánico de esta<sup>26</sup>. En base a esto, se podría anticipar que los niveles circulantes de TMAO serían consecuentemente elevados y aumentarían el riesgo de padecer aterosclerosis, lo que claramente no ocurre<sup>27</sup>. Por lo tanto, es probable que la mayoría de la FC presente en la bilis se reabsorba en el íleo y no alcance el colon para actuar como un precursor de TMAO.



**Figura 4.** Comparación de los niveles de TMAO en ayunas entre los pacientes con insuficiencia cardíaca estable y controles aparentemente sanos. (Izquierda) La concentración de N-óxido trimetilamina fue mayor en los pacientes con insuficiencia cardíaca estable que los controles sanos (derecha) y mostraron baja supervivencia con niveles superiores independientemente de los niveles de péptido natriurético tipo B. Las curvas de Kaplan-Meier muestran la mortalidad por todas las causas a los 5 años con TMAO y con TMAO/péptido natriurético tipo B (PNB) estratificados en los niveles medios. Modificado de Wilson Tang WH, Wang Z, Fan Y, Levison B, Hazen JE, Donahue LM, et al. Prognostic value of elevated levels of intestinal microbe-generated metabolite trimethylamine-N oxide in patients with heart failure: refining the gut hypothesis. *J Am Coll Cardiol.* 2014; 64(18):1908-14. IC: insuficiencia cardíaca. TMAO: N-óxido de trimetilamina. BNP: péptido natriurético tipo B.

## L-CARNITINA

La L-carnitina es un compuesto de amina cuaternaria biosintetizada a partir de los aminoácidos esenciales metionina y lisina. Desempeña un papel esencial en el metabolismo energético, en particular en el catabolismo de ácidos grasos, como acil CoA reductasa que debe ser esterificado en acilcarnitina con el fin de ser transportado en la mitocondria para la posterior oxidación de ácidos grasos y la producción de ATP<sup>28,9</sup>. Además juega un papel importante en el metabolismo energético, como transporte de acetilcarnitina fuera de la matriz mitocondrial en el citosol a través de la actividad enzimática de carnitina acetiltransferasa promoviendo la oxidación de la glucosa<sup>30,31</sup>.

Este compuesto se encuentra generalmente en las carnes rojas, productos lácteos como la leche y el queso y otras fuentes como la mantequilla de maní y espárragos.

Di Nicolantonio et al., en un metaanálisis que incluyó 13 ensayos controlados (n=3629) para evaluar los efectos de la L-carnitina en comparación con el placebo o control sobre la morbilidad y la mortalidad en el contexto de un infarto agudo de miocardio, demostraron que la L-carnitina reduce la incidencia de la angina de pecho en un 40% y la mortalidad por cualquier causa asociada con infarto agudo de miocardio (IAM) en un 27%<sup>32</sup>.

Singh et al., en un ensayo aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo, compararon los efectos de la administración oral de L-carnitina (2 g/día) durante 28 días en pacientes con sospecha de infarto agudo de miocardio. Al final del período de tratamiento quedó demostrado que la L-carnitina redujo el tamaño del infarto, los niveles de enzimas cardíacas, los síntomas de angina y la muerte cardíaca<sup>33</sup>.

En otro estudio realizado por Fukami et al., 31 pacientes que recibieron hemodiálisis con deficiencia de carnitina fueron tratados con L-carnitina oral (900 mg/día) durante 6 meses. Determinaron que aunque los suplementos de carnitina por vía oral aumentan la TMA y los niveles plasmáticos de TMAO, los marcadores de lesión vascular se redujeron después de 6 meses<sup>34</sup>.

## INGESTA DE PESCADOS

El TMAO es un importante compuesto osmorregulador que se encuentra en los pescados de agua dulce en una concentración de 5-20

mg, mientras que en los de agua salada, el valor está entre 1-100 mg por cada gramo de músculo. Sin embargo, se ha sugerido que a pesar de las cantidades significativas de TMAO observados en peces de agua salada, la mayoría de este TMAO puede derivarse de su suministro de alimentos naturales, ya que en la mayoría de los peces se detectó muy baja actividad de la enzima flavinmonooxigenasa (FMO)<sup>35</sup>. De hecho, el zooplancton *Calanus finmarchicus*, que es una fuente primaria de alimento para peces y ballenas en el Atlántico Norte, tiene una actividad monooxigenasa soluble significativa con una elevada especificidad por la TMA, y puede representar una fuente abundante de TMAO en la dieta<sup>36</sup>.

A pesar de la controversia en cuanto a si el TMAO es producido de forma endógena en los peces marinos u obtenida a través de medios dietéticos, esto no cambia el hecho de que los peces marinos representan una fuente importante de TMAO dietético para los seres humanos. En un estudio con 44 hombres, los niveles urinarios de TMAO se correlacionaron positivamente con la ingesta de pescado por semana<sup>37</sup>.

## TMAO COMO FACTOR DE RIESGO INDEPENDIENTE PARA ENFERMEDAD CORONARIA

La TMA producida a través de la microbiota intestinal se oxida con peróxido de hidrógeno a través de la actividad enzimática de la flavina monooxigenasa hepática, lo que resulta en la producción del compuesto orgánico, TMAO (Figura 1). Como tal, el consumo de compuestos que pueden producir TMA (lecitina, colina, betaína y L-carnitina) tiene el potencial de dar lugar a niveles circulantes elevados de TMAO<sup>22,38</sup>.

L-carnitina también puede ser transformado en gamma-butirotabaína por las bacterias intestinales antes de ser convertido a TMA y TMAO<sup>34</sup>. Varios estudios sugieren que es un compuesto proaterogénico que se asocia positivamente con un mayor riesgo cardiovascular en roedores y en los seres humanos<sup>22,38</sup>.

La acción proaterogénica de TMAO fue observada por primera vez por Wang et al., que demostraron que el consumo de una dieta suplemen-

tada con 1% de colina durante 16 semanas aumentó la formación de células espumosas en los macrófagos y el área de lesión aterosclerótica en la raíz aórtica en ratones machos y hembras. Estos efectos dependientes de la microbiota intestinal fueron eliminados cuando se agregaron antibióticos durante la dieta enriquecida en colina<sup>27</sup>.

Del mismo modo, Koeth et al. demostraron que el consumo de una dieta enriquecida en L-carnitina durante 15 semanas exacerbó el área de lesión aterosclerótica en ratones hembra. Una vez más, se suprimieron estos efectos complementando con antibióticos el agua de bebida durante la dieta enriquecida con L-carnitina<sup>38</sup>.

Aludiendo a la relevancia clínica de estos hallazgos, se realizó en humanos un *test* de sobrecarga de fosfatidilcolina en 40 voluntarios sanos, que consistía en la ingesta de 2 huevos duros y de fosfatidilcolina marcada con deuterio, para cuantificar los niveles plasmáticos y urinarios de TMAO y plasmáticos de fosfatidilcolina mediante espectrometría de masas y cromatografía líquida. En 6 de estos voluntarios, se administró un ciclo de 1 semana de antibioterapia con metronidazol y ciprofloxacino, para repetir el *test* posteriormente. En este *test*, se obtuvieron aumentos tiempo-dependientes de las concentraciones de TMAO y su análogo marcado por deuterio. Los niveles de TMAO se vieron marcadamente suprimidos tras el tratamiento antibiótico. En la segunda parte del estudio, se realizaron determinaciones de la concentración plasmática de TMAO en 4007 pacientes sometidos a cateterismo electivo. Estos pacientes fueron seguidos de forma clínica durante 3 años para determinar la incidencia de eventos cardiovasculares mayores (**Figura 2**)<sup>27</sup>.

En dichos estudios retrospectivos y prospectivos, los investigadores han observado que los niveles plasmáticos de TMAO, colina, lecitina, betaína, y L-carnitina están asociados con enfermedad coronaria, eventos cerebrovasculares y enfermedad arterial periférica<sup>22,38,39</sup>. Los niveles plasmáticos elevados de TMAO en ayunas se asociaron con mayores eventos cardiovasculares adversos, una relación que se mantuvo fuerte incluso después de ajustar a los factores de riesgo tradicionales<sup>27</sup>.

Senhthong et al. realizaron un estudio de cohorte prospectivo, entre los años 2012 y 2014, en la *Cleveland Clinic*, donde estudiaron 353 pacientes consecutivos con evidencia de enfermedad coronaria aterosclerótica estables, detectada por angiografía coronaria electiva. Utilizaron la puntuación SYNTAX para cuantificar la carga de aterosclerosis. Los niveles plasmáticos de TMAO, medidos en ayunas por espectrometría de masas, se correlacionaron directamente con la puntuación SYNTAX (**Figura 3**). Tras el análisis de regresión ordinal y ajustado por factores de riesgo tradicionales, los niveles elevados de TMAO se mantuvieron asociados independientemente con mayor puntuación SYNTAX. Los investigadores demostraron que los niveles plasmáticos de TMAO en ayunas actúan como un predictor independiente de alta carga aterosclerótica en pacientes con enfermedad coronaria<sup>40</sup>.

En otro estudio realizado por estos investigadores se demostró el valor pronóstico clínico de TMAO en pacientes con enfermedad coronaria estable que cumplieron con los criterios utilizados para una cohorte de pacientes similares a los del ensayo clínico COURAGE. Se examinaron la relación entre niveles plasmáticos de TMAO en ayunas y la mortalidad por todas las causas durante los 5 años de seguimiento (n=2235) en pacientes que fueron sometidos a angiografía corona-

ria electiva. Los niveles plasmáticos más altos de TMAO se asociaron con un aumento de 4 veces el riesgo de mortalidad, incluso después de ajustar a los factores de riesgo tradicionales, proteínas C-reactiva de alta sensibilidad y estimación de la tasa de filtración glomerular. En este estudio, los niveles plasmáticos elevados de TMAO demostraron un mayor riesgo de mortalidad a largo plazo en los pacientes con enfermedad coronaria estable en los que se administró tratamiento médico óptimo<sup>41</sup>.

Sin embargo, en otro estudio, realizado por Kaysen et al., las concentraciones séricas de TMAO fueron marcadamente elevadas y se correlacionaron directamente con marcadores bioquímicos del estado nutricional e inversamente con marcadores de inflamación en pacientes que recibieron hemodiálisis. No se encontró asociación significativa entre las concentraciones séricas de TMAO y la mortalidad por todas las causas, muerte cardiovascular u hospitalizaciones<sup>42</sup>.

## MECANISMOS DE ACCIÓN DE TMAO EN LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

El principal fundamento patológico asociado con la aterosclerosis es la formación de macrófagos ricos en lípidos, también conocidos como "células espumosas", dentro de la pared arterial. El origen de la aterosclerosis implica la captación de lipoproteína de baja densidad oxidada por los macrófagos en la pared arterial, un proceso mediado por macrófagos receptores *scavenger*. Las partículas de lipoproteínas de alta densidad son capaces de transportar lípidos fuera de la pared arterial, eliminando de este modo las placas ateroscleróticas, un proceso denominado transporte reverso de colesterol (TRC). Teóricamente, el TMAO puede causar acumulación lipídica, facilitando la afluencia de lípidos, aumentando la síntesis *in situ* y suprimiendo su eliminación.

El TMAO facilita la formación de células espumosas. Cuando suministraron colina, betaína o TMAO a ratones ApoE<sup>-/-</sup>, los niveles de dos receptores de macrófagos *scavenger* relacionados con la aterosclerosis, CD36 y SR-A1, se incrementaron. En consecuencia se formaron los macrófagos ricos en lípidos (células espumosas). Sin embargo, los antibióticos orales inhibieron la formación de células espumosas dependiente de TMAO<sup>22</sup>.

El TMAO también inhibe el flujo de colesterol mediante la supresión del TRC y mediante el bloqueo de la secreción de ácidos biliares. El TRC fue suprimido en ratones que recibieron colina o suplementos de carnitina. Sin embargo, después de la administración de antibióticos, la supresión del TRC revirtió. Los ratones que produjeron TMAO también mostraron una disminución del TRC. Por lo tanto, el TMAO es producido por los microbios intestinales e inhibe el TRC. Sin embargo, los niveles de colesterol transportados en los macrófagos no cambiaron significativamente los de TMAO después del tratamiento<sup>38</sup>. Por otra parte, los niveles de enzimas sintetizadoras de ácidos biliares y los transportadores de ácidos biliares en el hígado se redujeron cuando se proporcionó TMAO a los ratones<sup>38</sup>. Como la vía del ácido biliar juega un importante papel en la eliminación del colesterol, el bloqueo de esta vía puede haber acelerado la aterosclerosis.

Sin embargo, el TMAO no afecta a la síntesis de colesterol. Los investigadores observaron que los macrófagos cargados de colesterol inde-

pendientemente de si se añadió TMAO, no modificaron el ARN mensajero (ARNm), los niveles de receptores de lipoproteínas de baja densidad, los genes de síntesis de colesterol ni los genes inflamatorios<sup>38</sup>. En conjunto, estos hallazgos indican que TMAO acelera la aterosclerosis facilitando la afluencia de colesterol e inhibiendo el eflujo. Sin embargo, no altera la síntesis de colesterol.

### FLAVINA MONOOXIGENASA 3 Y SU CORRELACIÓN CON TMAO

La familia de flavina monooxigenasas (FMOs) se compone de cinco isoformas principales (FMO1-5) capaces de catalizar la oxigenación de numerosos compuestos nitrogenados xenobióticos, incluyendo TMA y sustratos endógenos en el hígado. FMO1 y FMO3 son las dos principales isoformas hepáticas que catalizan de manera eficiente la formación de TMA derivado de microbios intestinales a TMAO. Sin embargo, un estudio reciente demuestra que, de las dos isoformas, FMO3 exhibe específicamente una actividad 10 veces superior hacia la TMA<sup>43</sup>.

La incapacidad para oxidar TMA a TMAO se presenta en seres humanos como trimetilaminuria o "síndrome de olor a pescado", una enfermedad metabólica rara en la que la TMA se acumula en forma excesiva y se libera en la orina, el sudor y la respiración, produciendo un fuerte olor a pescado en el cuerpo. Los primeros estudios demostraron que la trimetilaminuria primaria se produce por mutaciones en el gen que codifica la FMO3 y se hereda siguiendo un patrón autosómico recesivo. El análisis genético de los pacientes con trimetilaminuria heredado demuestra que la falta de actividad enzimática FMO3 surge de mutaciones que afectan a la unión de necesarios cofactores FAD (flavin adenina dinucleótido) o NADP (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato)<sup>44</sup>.

La expresión de genes FMO3 está regulada por una compleja red de factores genéticos y dietéticos. Los patrones de expresión FMO3 hepáticas muestran fuerte dimorfismo sexual en ratones y seres humanos, siendo la expresión FMO3 y los niveles circulantes de TMAO significativamente mayor en las mujeres<sup>43</sup>. Además, un estudio de 22 cepas de ratones susceptibles a la aterosclerosis demostraron que los ratones hembra desarrollaron lesiones ateroscleróticas más grandes que sus homólogos masculinos, proporcionando un enlace entre la expresión del gen FMO3 y la producción proaterogénica de TMAO<sup>43</sup>.

La comparación de ratones macho con testículos intactos con ratones machos que han sido gonadectomizados demuestra que tanto la expresión FMO3 hepática y la generación de TMAO son suprimidos por la testosterona, mientras que los estudios paralelos en ratones hembra demuestran una correlación positiva entre el estrógeno y la expresión de genes FMO3. Además, se ha identificado un receptor de estrógeno a un sitio de unión en la región promotora de FMO3 tanto en ratones y muestras humanas<sup>45</sup>. Es de destacar que la incidencia de trimetilaminuria reportados es mayor entre las mujeres, con pacientes que informaron un empeoramiento de los síntomas durante la menstruación<sup>46</sup>. La expresión de genes FMO3 también se ha demostrado regulada por el receptor de señalización farnesoid X (FRX). El tratamiento de los ratones con un agonista FXR conduce a aumentos en la expresión de genes FMO3 y elevaciones concomitantes de las concentraciones plasmáticas de TMAO. No obstante, la producción de TMAO

por FMO3 también depende en gran medida de la producción de TMA por la microbiota intestinal, que a su vez está influida tanto por el consumo de nutrientes y la diversidad bacteriana intestinal<sup>43</sup>.

### RELACIÓN MICROBIOTA INTESTINAL Y HáBITOS DIETÉTICOS

Koeth et al. demostraron al inicio de su estudio que, en comparación con los vegetarianos y veganos, los omnívoros exhibieron niveles TMAO mayores tanto en el plasma como en la orina. Incluso después de un desafío con L-carnitina, los veganos no mostraron elevaciones significativas con respecto a los niveles de TMAO<sup>38</sup>. Las diferencias observadas pueden atribuirse a taxones de la flora intestinal. Mediante la secuenciación bacteriana de ARNr 16S en muestras fecales, varios taxones bacterianos se han relacionado con los dos hábitos alimentarios (vegetarianos vs. omnívoros) y los niveles de TMAO. Entre ellos, Clostridiaceae y Peptostreptococcaceae son más abundantes en los omnívoros, mientras que *Lachnospira* y *Sporobacter* son menos abundantes. Además, los individuos con los dos enterotipos mostraron una mayor concentración de TMAO. Se llegó a la conclusión de que algunos componentes presentes en la carne modulados por taxones de la flora intestinal pueden influir en la capacidad de los microorganismos para generar TMAO<sup>38</sup>.

Con el fin de comprobar la hipótesis de la probable producción de TMAO a partir de nutrientes que contienen TMA, los ratones fueron alimentados con alta carga de L-carnitina y varios taxones bacterianos, incluyendo *Anaeroplasmia* y *Porphyromonadaceae*, comprobando de esta forma que los cambios en las concentraciones de TMAO estaban vinculados con la ingesta de L-carnitina<sup>38</sup>. Sin embargo, otro grupo observó que la colina no fue afectada por la cantidad de bacterias trasplantadas productoras de TMA en ratones libres de gérmenes, lo que pudo explicarse por el hecho de que el modelo trasplantado era demasiado simple para simular la flora intestinal humana<sup>47</sup>.

### ENZIMAS PRODUCTORAS DE TRIMETILAMINA

Se han identificado varias enzimas bacterianas responsables de la producción TMA. Una enzima formada por dos componentes, una oxigenasa (CntA) y una reductasa (CntB), se asocia con la formación de TMA a partir de carnitina. Un puente de glutamato dentro de CntA facilita la transferencia de electrones y es esencial para la generación de TMA. Otro grupo de enzimas específicas que producen TMA a partir de colina, utilizando colina C (CutC) y colina D (CutD), también ha sido identificado. Solo la coexpresión de CutC y CutD se asocia con la producción de TMA, a diferencia de la expresión de cualquiera de las enzima por sí solas. Los genes que codifican estas enzimas pueden ser transferidos a bacterias no productoras de TMA<sup>48</sup>.

### ESTRATEGIAS DE INTERVENCIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE TMAO

Sobre la base de la evidencia disponible, la supresión de la producción de TMAO podría utilizarse como una manera de disminuir el riesgo de aterosclerosis. La producción de TMAO puede ser

alterada mediante el uso de probióticos, antibióticos o mediante el bloqueo a nivel metabólico de la vía patológica identificada a nivel de la microbiota intestinal, entretanto la reducción de la ingesta dietética de colina y fosfatidilcolina también puede ser de gran valor<sup>22,27</sup>. En general, la dieta es un factor muy importante con gran impacto en la composición bacteriana del intestino. Se ha propuesto que una dieta saludable, en particular, la mediterránea, en combinación con la actividad física regular, es importante a fin de mantener la homeostasis de la microbiota y promover la salud cardiovascular<sup>49</sup>.

En 2013, Brugere et al. propusieron que los arqueobióticos, es decir, la aplicación intestinal de cepas específicas de *Arqueas*, podrían ser utilizados para tratar la enfermedad cardiovascular mediante la intervención en el proceso de producción de TMAO. Estas cepas bacterianas son capaces de convertir TMA en metano en el interior del intestino, reduciendo así la producción de TMAO a partir de TMA en el hígado. La administración terapéutica de las enzimas producidas por estas cepas de *Arqueas* también podría ser una opción<sup>50</sup>.

Otra manera potencial de bloquear o reducir la producción de TMAO en el hígado sería alterar de algún modo la función de FMO3, la enzima que cataliza la conversión de TMA en TMAO. Indoles dietéticos, que están contenidos en repollos de Bruselas, se han propuesto como posibles inhibidores de FMO3. Además, fosfonatos de nucleósidos acíclicos (por ejemplo, adefovir y tenofovir), una categoría de agentes antivirales, también han demostrado inhibir la actividad de FMO3. La FMO3 ha reportado varios polimorfismos genéticos que conducen a diferentes niveles de funcionalidad. Los estudios sobre trimetilaminuria, un desorden genético de insuficiencia de FMO3, han sido la fuerza impulsora para el descubrimiento de muchos de estos polimorfismos. Los niveles de expresión de FMO3 en los seres humanos se asocian con niveles plasmáticos de TMAO, mientras que en los ratones los niveles de expresión de genes de la familia FMO se correlaciona con la extensión de la aterosclerosis aórtica<sup>22</sup>. Sin embargo, en un estudio reciente realizado por Hartiala et al., los factores genéticos resultaron ser relativamente insignificante en la determinación de los niveles plasmáticos de TMAO en los seres humanos. Los autores concluyeron que los factores dietéticos o la composición de la microbiota intestinal pueden desempeñar un papel más importante que los factores genéticos en la medición de los niveles de TMAO en el plasma<sup>51</sup>.

Por último, en un estudio reciente realizado por Kuka et al. se examinaron los efectos del meldonium, un análogo bioprecursor de carnitina, que se considera que tiene efecto antiaterosclerótico en la producción de TMAO dependiente de la microflora intestinal. El estudio mostró una reducción significativa de la producción de TMA y TMAO a partir de L-carnitina, pero no a partir de colina<sup>52</sup>.

## INSUFICIENCIA CARDIACA, INSUFICIENCIA RENAL E INTOLERANCIA A LA GLUCOSA

Estudios recientes revelan que la potencial contribución patogénica de la generación de TMAO dependiente de la microbiota intestinal puede extenderse más allá del desarrollo y progresión de la aterosclerosis y sus complicaciones adversas (IAM, ACV o muerte). Por ejemplo, se ha observado recientemente que los niveles circulantes de TMAO son más altos en los pacientes con insuficiencia cardíaca en comparación con los sujetos ajustados por edad y sexo sin insuficiencia cardíaca. Por otra parte, se observó un extraordinario valor pronóstico adverso asociado a niveles plasmáticos elevados de TMAO entre una cohorte de pacientes con insuficiencia cardíaca estable (n=720) que fueron ajustados a los factores de riesgo tradicionales, índices cardiorrenales (péptido natriurético tipo B y tasa de filtración glomerular) y marcadores de inflamación sistémicos (proteína C reactiva)<sup>53</sup> (**Figura 4**).

Por otra parte, se ha demostrado que TMAO puede acumularse en el plasma de pacientes con insuficiencia renal, tanto en la enfermedad renal crónica (ERC) como en la enfermedad renal en etapa terminal. Nuevos datos metabólicos aportados por el *Framingham Heart Study* indicaron que TMAO fue uno de los pocos metabolitos en el plasma de sujetos sanos cuyos niveles incidentes predicen el desarrollo de la enfermedad renal crónica. Además, los resultados de estudios recientes en ratones alimentados con una dieta alta en grasas también sugieren que la dieta TMAO puede exacerbar la intolerancia a la glucosa, obstruir señalización de la insulina hepática y promover la inflamación del tejido adiposo<sup>54</sup>.

El ámbito de aplicación de los procesos biológicos afectados tanto por TMAO como el proceso de producción de TMAO está comenzando a ser cada vez más apreciado, con múltiples enlaces recientemente reconocidos a trastornos cardiovasculares y metabólicos crónicos.

El ámbito de aplicación de los procesos biológicos afectados tanto por TMAO como el proceso de producción de TMAO está comenzando a ser cada vez más apreciado, con múltiples enlaces recientemente reconocidos a trastornos cardiovasculares y metabólicos crónicos.

## DISCUSIÓN

La relación que se establece entre los niveles de TMAO y aterosclerosis condujo a proponer un enlace entre los niveles de TMAO y el riesgo de ECV. Varios estudios han sugerido una posible relación entre los niveles plasmáticos de colina y las enfermedades cardiovasculares, mientras que otros estudios no han encontrado evidencia para considerarlo un factor pronóstico para ECV. Teniendo en cuenta los estudios contradictorios, ha sido de gran interés investigar el papel de los precursores de TMA frente a TMAO como predictor de riesgo para ECV.

Koeth et al. investigaron la relación entre los niveles plasmáticos de L-carnitina en ayunas con ECV y encontraron que la relación solo existía en los individuos con niveles plasmáticos de TMAO simultáneamente elevados. Del mismo modo, se ha encontrado que el aumento de los niveles de colina en plasma se asoció con un mayor riesgo a desarrollar un evento coronario adverso. Sin embargo, esta correlación existía solo ante la presencia de niveles elevados de TMAO. Estos resultados confirman el papel esencial de TMAO en la predicción de riesgo de ECV.

Los resultados de los estudios también refuerzan la conversión de aminos cuaternarias TMA-TMAO como un paso crítico en la patogénesis de esta enfermedad. Las aminos cuaternarias relevantes para esta vía dependiente de la microbiota intestinal incluyen colina, fosfatidilcolina y carnitina. Los alimentos tales como huevos, leche, hígado, carnes rojas, aves, mariscos y pescado son fuentes importantes de colina en la dieta, mientras que L-carnitina es abundante en las carnes rojas. Las dietas ricas en carnes rojas se han relacionado con enfermedades cardiovasculares debido a sus altas cantidades de coles-

terol y grasas saturadas. Sin embargo, la investigación ha explorado el vínculo entre la producción de TMAO y la ECV poniendo en gran relevancia el papel de la microbiota intestinal en la patogénesis. Siendo TMAO el principal metabolito responsable de la patogénesis de las ECV; por lo que no se espera que la simple eliminación de la colina y la L-carnitina de la dieta pueda reducir los riesgos. La colina y la carnitina son nutrientes esenciales, necesarios para muchos procesos fisiológicos, y por lo tanto, evitar tales precursores de la dieta no ha sido recomendado. Para mensurar su nivel de incidencia como riesgo cardiovascular se apuntó a determinar si la administración de suplementos de compuestos que contengan TMA se comportaban como cardioprotectores o proaterogénicos. Sin embargo, es muy conocido el efecto protector de la dieta mediterránea sobre el riesgo de trastornos cardiovasculares por lo que en diciembre de 2013, la UNESCO reconoció, durante su reunión en Bakú este patrón de dieta como un patrimonio cultural intangible de Italia, Portugal, España, Marruecos, Grecia, Chipre y Croacia. Esto apoyaría la importancia de una dieta de este estilo incluyendo legumbres, frutas, verduras y proteínas simples (pescado, carne blanca) para conservar la salud cardiovascular, reduciendo además las fuentes directas e indirectas de TMAO.

Además de la ingesta, los niveles de TMAO se pueden modular mediante la manipulación de la microbiótica intestinal. Para ello es necesario determinar qué tipos de bacterias están asociadas con la elevación de los niveles de TMAO y qué tipos específicos de bacterias se considerarían aterogénicas. La administración de medicamentos que disminuyen los niveles de TMAO es prometedora. Una vez determinada, podemos utilizar antibióticos de espectro estrecho como prevención de las enfermedades cardiovasculares. Podríamos concluir en consecuencia que tendríamos antibióticos con potencial antiaterosclerótico, ya que reducirían los niveles de TMAO y en consecuencia el tamaño de placa. Sin embargo, muchos ensayos clínicos con antibióticos para la prevención secundaria de las enfermedades cardiovasculares terminaron en fracasos, por el hecho de que el uso de antibióticos a largo plazo si bien disminuyen eficazmente los niveles de TMAO, la administración prolongada genera otros problemas, como la tolerancia a las drogas y daño de distintos órganos. Además del tratamiento con antibióticos, varios otros métodos prometedores han sido diseñados. Más recientemente, una cepa de Archaea conocida como *Methanomassiliicoccus luminyensis* se encontró que podría ser capaz de catabolizar TMA. En otro sentido los prebióticos, que son

sustancias químicas que facilitan el crecimiento de ciertas bacterias y son beneficiosos para la salud, han sido usados para aumentar los niveles de TMA y TMAO en ratones; pero los efectos de las arqueas, probióticos y prebióticos sobre el sistema cardiovascular no han sido aún dilucidados. La modulación directa de los microbios del intestino a través del uso de antibióticos, probióticos, prebióticos y otras intervenciones representa un nuevo método de tratamiento con respecto a la gestión de las enfermedades cardiovasculares, debido a que los microbios del intestino son esenciales para la formación de TMAO. Se ha demostrado que el meldonium disminuye los niveles plasmáticos de TMAO aumentando su excreción urinaria y la inhibición de la conversión de TMA a TMAO por las bacterias. Sin embargo, el meldonium no afecta la admisión ni la conversión de la carnitina a TMAO. Aunque aún no queda claro si el tratamiento con el meldonium al reducir los niveles de TMAO, reduce el riesgo de ECV. Además de este, otros agentes que reducen los niveles de TMAO esperan ser descubiertos.

## CONCLUSIÓN

La incidencia de la enfermedad aterosclerótica de la arteria coronaria ha ido aumentando y sigue siendo una de las principales causas de muerte en todo el mundo a pesar de la considerable atención a los factores de riesgo tradicionales y el uso de tratamientos farmacológicos modernos, incluyendo la terapia con estatinas de alta potencia. Aunque se han hecho significativos progresos con respecto a los mecanismos subyacentes y al tratamiento de las enfermedades cardiovasculares, estamos lejos de encontrar la total solución. Además de los factores de riesgo tradicionales de enfermedad cardiovascular, la influencia ejercida por el metabolismo de los microbios intestinales en la patogénesis ha sido reconocida en los últimos años. Las observaciones recientes indican que el metabolismo intestinal puede representar un objetivo terapéutico prometedor con respecto a la gestión de las enfermedades cardiovasculares. La medición de los niveles de TMAO en poblaciones asintomáticas para identificar individuos con un riesgo cardiovascular elevado, así como vigilar los cambios en los niveles de TMAO para determinar la severidad de la enfermedad coronaria y la manipulación de la flora intestinal con el propósito de mejorar el riesgo cardiovascular de los pacientes, se prevé en el futuro.

## BIBLIOGRAFÍA

- Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med.* 2006;3(11):e442.
- Estrategia Nacional para la Prevención y Control de las Enfermedades Crónicas no Transmisibles 2009. Ministerio de Salud de la República Argentina. Disponible online (23/04/18): [http://www.infoleg.gov.ar/basehome/actos\\_gobierno/actosde-gobierno9-11-2009-1.htm](http://www.infoleg.gov.ar/basehome/actos_gobierno/actosde-gobierno9-11-2009-1.htm)
- Koeth RA, Levison BS, Culley MK, Buffa JA, Wang Z, Gregory JC et al.  $\gamma$ -Butyrobetaine is a proatherogenic intermediate in gut microbial metabolism of L-carnitine to TMAO. *Cell metabolism.* 2014;20(5):799-912.
- Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, Koeth R, Levison BS, DuGar B et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature.* 2011;472(7341),57-63.
- Bennett BJ, de Aguiar Vallim TQ, Wang Z, Shih DM, Meng Y, Gregory J et al. Trimethylamine-N-oxide, a metabolite associated with atherosclerosis, exhibits complex genetic and dietary regulation. *Cell metabolism.* 2013;17(1),49-60.
- Bernstein AM, Sun Q, Hu FB, Stampfer MJ, Manson JE, Willett WC et al. Major dietary protein sources and risk of coronary heart disease in women. *Circulation.* 2010;122(9),876-883.



7. Wang Z, Tang WW, 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. *European Heart Journal*.2014;35(14):904-10.
8. Freedman LS, Schatzkin A, Midthune D, Kipnis V. Dealing with dietary measurement error in nutritional cohort studies. *J Natl Cancer Inst*.2011;103(14):1086-92.
9. Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*.2012;489(7415):220-30.
10. Huttenhower C, Gevers D, Knight R, Abubucker S, Badger JH, Giglio MG et al. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*.2012;486(7402):207-14.
11. Faith JJ, Guruge JL, Charbonneau M, Subramanian S, Seedorf H, Goodman AL, et al. The long-term stability of the human gut microbiota. *Science*. 2013; 341(6141):1237439.
12. Ding T, Schloss PD. Dynamics and associations of microbial community types across the human body. *Nature*. 2014;509(7500):357-60.
13. Tremaroli V, Backhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*. 2012;489(7415):242-9.
14. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*.2007;56(7):1761-72.
15. Taki K, Tsuruta Y, Niwa T. Indoxyl sulfate and atherosclerotic risk factors in hemodialysis patients. *Am J Nephrol*. 2007;27(1):30-5.
16. Meijers BK, Van Kerckhoven S, Verbeke K, Dehaen W, Vanrenterghem Y, Hoylaerts MF, et al. The uremic retention solute p-cresyl sulfate and markers of endothelial damage. *Am J Kidney Dis*. 2009;54(5):891-901.
17. Buffie CG, Pamer EG. Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(11):790-801.
18. Collins SM. A role for the gut microbiota in IBS. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014;11(8):497-505.
19. Dumas ME, Barton RH, Toye A, Cloarec O, Blancher C, Rothwell A, et al. Metabolic profiling reveals a contribution of gut microbiota to fatty liver phenotype in insulin-resistant mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(33):12511-6.
20. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*. 2006;444(7122):1027-31.
21. Vance DE, Vance JE. Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes. En: Vance DE, Vance JE. *Phospholipidbiosynthesis in eukaryotes* (2008, Cuarta edición, 214-444). San Diego: Editorial Elsevier.
22. Wang Z, Kljifell E, Bennett BJ, Koeth R, Levison BS, DuGar B, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature*. 2011;472(7341):57-63.
23. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RS, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*. 2009;457(7228):480-4.
24. Ueland PM, Holm PI, Hustad S. Betaine: a key modulator of one-carbon metabolism and homocysteine status. *Clin Chem Lab Med*. 2005;43(10):1069-75.
25. Lever M, Slow S. The clinical significance of betaine, an osmolyte with a key role in methyl group metabolism. *Clin Biochem*. 2010;43(9):732-44.
26. Schmitz MG, Renooij W. Phospholipids from rat, human, and canine gastric mucosa. Composition and metabolism of molecular classes of phosphatidylcholine. *Gastroenterology*. 1990;99(5):1292-6.
27. Wilson Tang WH, Wang Z, Levison BS, Koeth RS, Britt EB, Fu X, et al. Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. *N Engl J Med*. 2013;368(17):1575-84.
28. Ussher JR, Lopaschuk GD. The malonyl CoA axis as a potential target for treating ischaemic heart disease. *Cardiovasc Res* 2008;79(2):259-68.
29. Ussher JR, Lopaschuk GD. Targeting malonyl CoA inhibition of mitochondrial fatty acid uptake as an approach to treat cardiac ischemia/reperfusion. *Basic Res Cardiol* 2009;104(2):203-10.
30. Muoio DM, Noland RC, Kovalik JP, et al. Muscle-specific deletion of carnitine acetyltransferase compromises glucose tolerance and metabolic flexibility. *Cell Metab* 2012;15(5):764-77.
31. Noland RC, Koves TR, Seiler SE, Lum H, Lust RM, Ilkayeva O, et al. Carnitine insufficiency caused by aging and overnutrition compromises mitochondrial performance and metabolic control. *J Biol Chem*. 2009;284(34):22840-52.
32. DiNicolantonio JJ, Lavie CJ, Fares H, Menezes AR, O'Keefe JH. L-carnitine in the secondary prevention of cardiovascular disease: Systematic review and meta-analysis. *Mayo Clin Proc*. 2013;88(6):544-51.
33. Singh RB, Niaz MA, Agarwal P, Beegum R, Rastogi SS, Sachan DS. A randomised, double-blind, placebo-controlled trial of L-carnitine in suspected acute myocardial infarction. *Postgrad Med J*. 1996;72(843):45-50.
34. Fukami K, Yamagishi S, Sakai K, Kaida Y, Yokoro M, Ueda S, et al. Oral L-carnitine supplementation increases trimethylamine-N-oxidebut reduces markers of vascular injury in hemodialysis patients. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2015;65(3):289-95.
35. Baker JR, Struempfer A, Chaykin S. A comparative study of trimethylamine-N oxide biosynthesis. *Biochim Biophys Acta*. 1963;71:58-64.
36. Agustsson I, Strom AR. Biosynthesis and turnover of trimethylamine oxide in the teleost cod, *Gadusmorhua*. *J Biol Chem*. 1981;256(15):8045-9.
37. Svensson BG, Akesson B, Nilsson A, Paulsson K. Urinary excretion of methylamines in men with varying intake of fish from the Baltic sea. *J Toxicol Environ Health*. 1994;41(4):411-20.
38. Koeth RA, Wang Z, Levison BS, Buffa JA, Org E, Sheehy BT, et al. Intestinal microbiota metabolism of L carnitine, a nutrient in redmeat, promotes atherosclerosis. *Nat Med*.2013;19(5):576-85.
39. Koeth RA, Levison BS, Culley MK, Buffa JA, Wang Z, Gregory JC, et al.  $\gamma$ -Butyrobetaine is a proatherogenic intermediate in gut microbial metabolism of L-carnitine to TMAO. *Cell Metab*. 2014;20(5):799-812.
40. Senthong V, Li XS, Hudc T, Coughlin J, Wu Y, Levison B, et al. Plasma trimethylamine N-oxide, a gut microbe-generated phosphatidylcholine metabolite, is associated with atherosclerotic burden. *J Am Coll Cardiol*. 2016;67(22):2620-8.
41. Senthong V, Wang Z, Li XS, Fan Y, Wu Y, Wilson Tang WH, et al. Intestinal microbiota-generated metabolite trimethylamine-N-oxide and 5-year mortality risk in stable coronary artery disease: the contributory role of intestinal microbiota in a COURAGE-like patient cohort. *J Am Heart Assoc*. 2016;5(6):e002816.
42. Kaysen GA, Johansen KL, Chertow GM, Dalrymple LS, Kornak J, Grimes B, et al. Associations of trimethylamine N-Oxide with nutritional and inflammatory biomarkers and cardiovascular outcomes in patients new to dialysis. *J Ren Nutr*. 2015;25(4):351-6.
43. Bennett BJ, de Aguiar Vallim TQ, Wang Z, Shih DM, Meng Y, Gregory J, et al. Trimethylamine-N-oxide, a metabolite associated with atherosclerosis, exhibits complex genetic and dietary regulation. *Cell Metab*. 2013;17(1):49-60.
44. Fujieda M, Yamazaki H, Togashi M, Saito T, Kamataki T. Two novel single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the FMO3 gene in Japanese. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2003;18(5):333-5.
45. Esposito T, Variiale B, D'Angelo R, Amato A, Sidoti A. Regulation of flavin-containing monooxygenase (FMO3) gene expression by steroids in mice and humans. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2014;20(3):99-109.
46. Krueger SK, Williams DE. Mammalian flavin-containing monooxygenases: structure/function, genetic polymorphisms and role in drug metabolism. *Pharmacol Ther*. 2005;106(3):357-87.
47. Romano KA, Vivas EI, Amador Noguez D, Rey FE. Intestinal microbiota composition modulates choline bioavailability from diet and accumulation of the proatherogenic metabolite trimethylamine-N-oxide. *mBio*. 2015;6(2):e02481.
48. Zhu Y, Jameson E, Crosatti M, Schäfer H, Rajakumar K, Bugg TD, et al. Carnitine metabolism to trimethylamine by an unusual Rieske-type oxygenase from human microbiota. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111:4268-73.
49. Stock J. Gut microbiota: an environmental risk factor for cardiovascular disease. *Atherosclerosis*.2013;229(2):440-2.
50. Brugere JF, Borrel G, Gaci N, Tottley W, O'Toole PW, Malpuech-Brugere C. Archaeobiotics: proposed therapeutic use of archaea to prevent trimethylaminuria and cardiovascular disease. *Gut Microbes*. 2014;5(1):5-10.
51. Hartiala J, Bennett BJ, Tang WH, Wang Z, Stewart AF, Roberts R, et al. Comparative genome-wide association studies in mice and humans for trimethylamine N-oxide, a proatherogenic metabolite of choline and L-carnitine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34(6):1307-13.
52. Kuka J, Liepinsh E, Makrecka-Kuka M, Liepins J, Cirule H, Gustina D, et al. Suppression of intestinal microbiota-dependent production of pro-atherogenic trimethylamine N-oxide by shifting L-carnitine microbial degradation. *Life Sci*.2014;117(2):84-92.
53. Wilson Tang WH, Wang Z, Fan Y, Levison B, Hazen JE, Donahue LM, et al. Prognostic value of elevated levels of intestinal microbe-generated metabolite trimethylamine-N oxide in patients with heart failure: refining the gut hypothesis. *J Am Coll Cardiol*. 2014;64(18):1908-14.
54. Bell JD, Lee JA, Lee HA, Sadler PJ, Wilkie DR, Woodham RH. Nuclear magnetic resonance studies of blood plasma and urine from subjects with chronic renal failure: identification of trimethylamine-N-oxide. *Biochim Biophys Acta*. 1991;1096(2):101-7.