

EDIÇÃO COM FOCO ESPECIAL: PROMOÇÃO DA SAÚDE CARDIOVASCULAR

O PRESENTE E O FUTURO: REVISÃO DO ESTADO DA ARTE DO JACC

Microbiota intestinal na saúde e doença cardiovascular



Revisão do Estado da Arte do JACC

W.H. Wilson Tang, MD,^{a,b,c} Fredrik Bäckhed, PHD,^{d,e} Ulf Landmesser, MD,^f Stanley L. Hazen, MD^{a,b}

RESUMO

Apesar de grandes avanços na redução do ônus da doença cardiovascular (DCV) com a modificação dos fatores clássicos de risco de DCV, riscos residuais significativos persistem. Descobertas recentes que ligavam microbiota intestinal e DCV têm ampliado a nossa compreensão de como os nutrientes alimentares podem afetar a saúde e a doença cardiovascular. Embora a última geração de técnicas de sequenciamento possa identificar os participantes da comunidade microbiana intestinal e dispor de ideias sobre as mudanças da composição microbiana em retorno a respostas fisiológicas e exposições alimentares, disposições sobre prebióticos ou probióticos ainda precisam demonstrar benefício terapêutico para a DCV. A nossa compreensão cada vez maior sobre moduladores fisiológicos derivados da microbiota intestinal (por exemplo, ácidos graxos de cadeia curta) e mediadores patogênicos (por exemplo, N-óxido de trimetilamina) de suscetibilidade à doença do hospedeiro tem criado oportunidades terapêuticas possíveis para melhorar a saúde cardiovascular. Esta revisão discute as funções da microbiota intestinal humana na fisiologia normal, suas associações com susceptibilidades da DCV, e o potencial de modular a composição da microbiota intestinal e o metabolismo como um novo alvo terapêutico para DCV. (J Am Coll Cardiol 2019;73:2089-105) © 2019 pela American College of Cardiology Foundation.

A nutrição é um dos principais fatores de risco modificáveis para a saúde cardiovascular. No entanto, a prevalência de níveis ideais de dieta permanece baixa, atingindo 0,6% em crianças e 1,5% em adultos (1). Em contraste, 50% dos adultos jovens (de 20 a 49 anos de idade) e 30,9% dos adultos mais velhos (50 anos ou mais) apresentaram baixos níveis de dieta (1). Estudos recentes têm destacado a ingestão de nutrientes alimentares, como fator contribuinte fundamental para a saúde global e suscetibilidade à doença (2). O que nós comemos também fornece nutrientes para o metabo-

lismo microbiano intestinal. Assim, uma visão mais holística do metabolismo está evoluindo; a combinação de microbiota intestinal e transformações metabólicas no hospedeiro contribuem ao nosso metabolismo global e a variações interindividuais nos nossos perfis metabólicos. A microbiota intestinal serve como filtro de nossas maiores exposições ambientais: o que comemos. Como vários metabólitos gerados pela microbiota intestinal são biologicamente ativos e afetam os fenótipos do hospedeiro, o microbioma intestinal também funciona como um importante órgão endócrino que é responsivo



Ouça o áudio com o resumo deste artigo, apresentado pelo editor-chefe, Dr. Valentin Fuster em JACC.org.

^aCenter for Microbiome and Human Health, Lerner Research Institute, Cleveland Clinic, Cleveland, Ohio, EUA; ^bDepartment of Cardiovascular Medicine, Heart and Vascular Institute, Cleveland Clinic, Cleveland, Ohio, EUA; ^cCenter for Clinical Genomics, Cleveland Clinic, Cleveland, Ohio, EUA; ^dUniversity of Gothenburg, Gothenburg, Suécia; ^eNovo Nordisk Foundation Center for Basic Metabolic Research and Section for Metabolic Receptology and Endocrinology, Faculty of Health Sciences, University of Copenhagen, Copenhagen, Dinamarca; e ^fCharité Universitätsmedizin Berlin, Berlin Institute of Health (BIH), Berlin, Alemanha e German Center for Cardiovascular Research (DZHK), Berlin, Alemanha. Este trabalho recebeu subsídios do National Institutes of Health (NIH), do Office of Dietary Supplements (R01HL103866, P20HL113452, R01DK106000, R01HL126827) e da Fondation Leducq (17CVD01). Dr. Tang atuou como consultor para The Advisory Board Company. Dr. Bäckhed é fundador e acionista da Metabogen AB. Dr. Hazen é coinventor de patentes pendentes e emitidas da Cleveland Clinic, relacionadas ao diagnóstico e tratamento cardiovascular; foi consultor pago da Proctor and Gamble (P&G); recebeu subsídios de pesquisa da P&G e Roche Diagnostics; e tem qualificação para receber pagamentos de direitos autorais por invenções ou descobertas relacionadas ao diagnóstico e tratamento cardiovascular da Cleveland HeartLab e P&G. Dr. Landmesser informou não ter relações relevantes para o conteúdo deste artigo a serem declaradas.

Manuscrito recebido em 8 de maio de 2018; manuscrito revisado recebido em 9 de março de 2019, aprovado em 12 de março de 2019.

**ABREVIATURAS
E ACRÔNIMOS****AGCC** = ácidos graxos de cadeia curta**DAC** = doença arterial coronariana**DCV** = doença cardiovascular**DRC** = doença renal crônica**FMO** = flavina monooxigenase**FXR** = receptor farnesóide X**gBB** = g-butirotetina**IC** = insuficiência cardíaca**TMA** = trimetilamina**TMAO** = N-óxido de trimetilamina**TML** = trimetil-lisina

à ingestão alimentar. Ele se comunica com os órgãos distais no hospedeiro por meio de caminhos complexos através dos metabólitos gerados pela microbiota intestinal e foi demonstrado que afeta fenótipos relevantes para a doença cardiovascular (DCV), variando de inflamação, obesidade e resistência à insulina a processos mais diretos, como suscetibilidade à aterosclerose e trombose (3). Esta revisão discute as funções da microbiota intestinal humana na fisiologia normal, suas associações com susceptibilidades à doença, e o potencial de modulação da microbiota intestinal, como novos alvos terapêuticos para DCV.

MICROBIOMA INTESTINAL NORMAL

O intestino humano abriga trilhões de células microbianas como uma parte essencial do nosso ecossistema fisiológico saudável. Essas comunidades de bactérias, fungos, *Archaea* e vírus são frequentemente referidas coletivamente como “microbiota”, e seu genoma como “microbioma”. A maioria da comunidade microbiana intestinal conhecida é composta de bactérias do filo *Bacteroidetes* e *Firmicutes* (especialmente espécies de *Clostridia*), *Actinobacteria*, *Proteobacteria* e *Verrucomicrobia* (Figura 1) (4). Entender ou definir o que constitui um microbioma normal é desafiador e pode abranger as considerações do núcleo funcional, a ecologia da comunidade saudável e a resistência, resiliência, estabilidade e perspectivas da ecologia microbiana e os metabólitos (5). No entanto, táxons nestes filos são relativamente estáveis ao longo do tempo dentro de um indivíduo, e relativamente consistente entre os membros da família, embora variando amplamente entre indivíduos não relacionados que vivem em domicílios diferentes (6). No entanto, as comunidades microbianas em um domicílio podem ser substancialmente alteradas, especialmente quando há contato físico (7). A medida de quanto a microbiota é alterada ao longo do tempo dentro de um indivíduo ainda precisa ser determinada. Começando no parto, existem influências ambientais importantes sobre a composição, função e metabolismo microbiano intestinal de um indivíduo, que podem, direta ou indiretamente, afetar o metabolismo de hospedeiro (8). Sob condições fisiológicas, a microbiota intestinal continua a estimular o sistema imune, especialmente por meio de tecidos linfóides associados ao intestino. Além disso, a microbiota intestinal está envolvida na ativação e diferenciação de uma vasta gama de linfócitos T e B, bem como a modulação da produção de mucosa de imunoglobulinas (principalmente imunoglobulina A) (4).

DESTAQUES

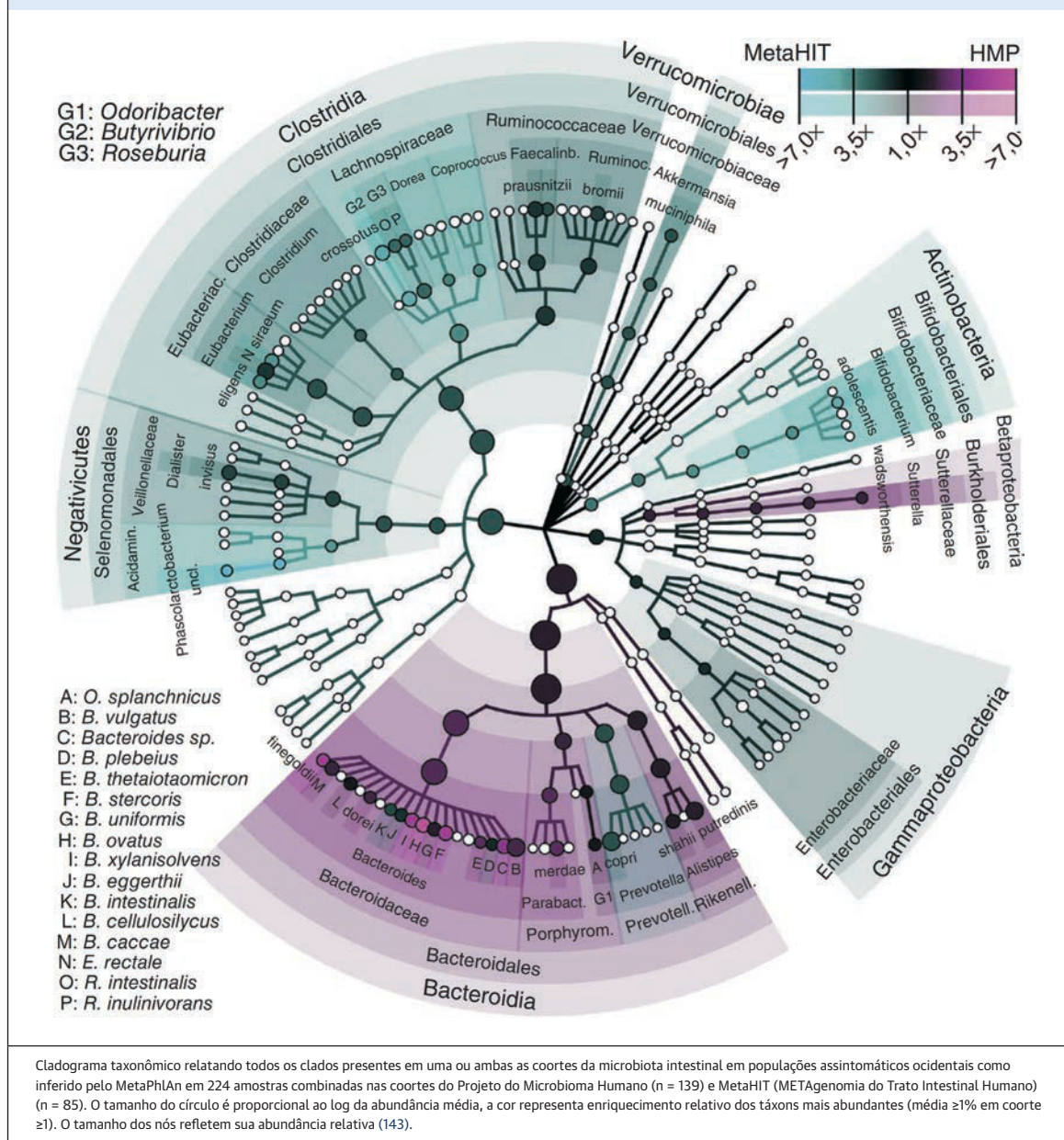
- A microbiota intestinal é mecanicamente ligada a processos fisiológicos que afetam a saúde cardiovascular.
- Nutrientes alimentares servem como principais influências ambientais na microbiota intestinal e no metabolismo do hospedeiro humano.
- Modular a composição da microbiota intestinal e o metabolismo pode servir como alvo para prevenção das doenças cardiovasculares.

MÉTODOS DE SEQUENCIAMENTO DE ÚLTIMA GERAÇÃO PARA AVALIAR A DIVERSIDADE MICROBIANA.

Historicamente, a composição microbiana foi investigada por métodos baseados em culturas tradicionais, o que pode ser maçante e permitir apenas a amostragem de uma pequena parte da população microbiana intestinal. As abordagens baseadas em cultura oferecem uma oportunidade valiosa para obter informações sobre requisitos de metabolismo e crescimento bacteriano, bem como a possível utilização futura de tais cepas cultivadas para investigações experimentais. Por conseguinte, há um grande esforço em isolar cepas de culturas do intestino humano (9, 10). Recentemente, o sequenciamento de última geração independente da cultura focou em atribuições taxonômicas através de sequências de DNA, que permitiram bactérias não cultiváveis anteriormente a serem identificadas com a “culturomia” alvo para ganhar novas ideias mecanicistas (11). O termo “metagenomia” refere-se a um genoma coletivo de microrganismos de uma amostra ambiental que informa o ecossistema microbiano. Sequências de nucleicas microbianas são utilizadas como proxy para estimativa da identidade do organismo e a abundância relativa de comunidades microbianas complexas. Como mostrado na Figura 2, duas estratégias comuns (12) foram utilizadas para obter essa sequência de informações:

1. A sequência alvo: um método de sequência comum detecta as diferenças sequenciais da região de hipervariabilidade do RNA ribossômico 16S (rRNA) bacteriano para a identificação taxonômica das bactérias presentes. Embora sejam fáceis e informativas, as regiões de variabilidade com análises 16S são geralmente insuficientes para fornecer uma resolução em nível de espécie. Além disso, resultados diferentes podem ser gerados com base nas diferentes regiões analisadas.
2. Sequenciamento *shotgun* genômico completo: utilizar sequenciamento genômico em larga escala combi-

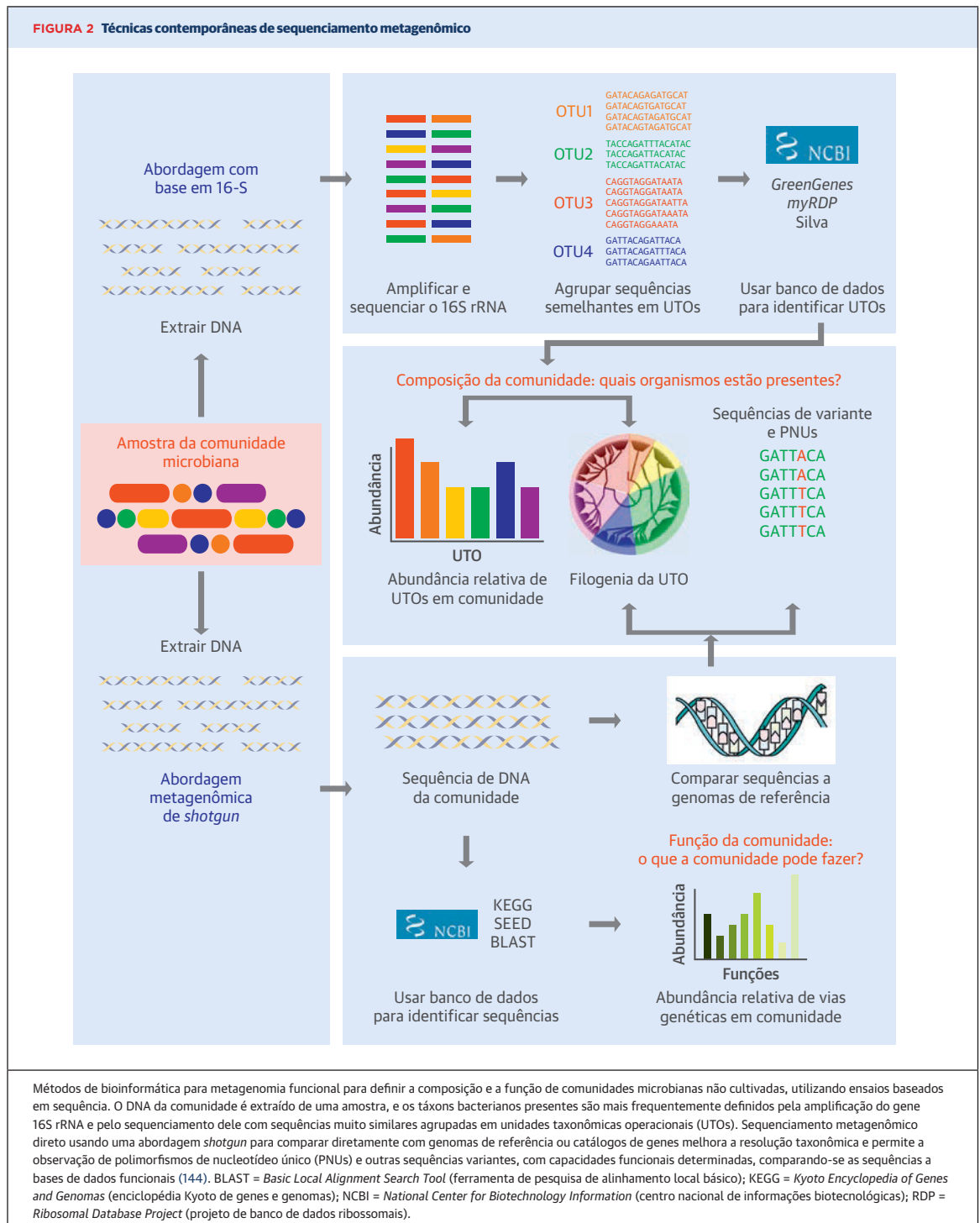
FIGURA 1 Árvore de fitogenética representando a microbiota intestinal humana



nado com a bioinformática computacional avançada, identificação de perfis funcionais taxonômicos e potenciais de comunidades microbianas conhecidas e desconhecidas pode ser feito sem a necessidade de cultura no laboratório (muitos ainda precisam ser explorados) (13). Apesar de teoricamente abrangente e perspicaz, muitos estudos ainda são mal aproveitados.

Apesar dos avanços no sequenciamento microbiano de última geração, há algumas limitações em suas aplicações clínicas e de pesquisa (14). A qualidade e a

quantidade de ácidos nucleicos recuperados podem variar dependendo da hora da coleta da amostra (tipos de amostra, local de origem, bem como métodos de coleta e/ou transformação), armazenamento e técnicas de processamento (de extração do genoma microbiano à preparação da biblioteca, sequenciamento, filtro de qualidade ou passos de identificação da sequência). Tecnicamente, o viés de amplificação, controles de sequenciamento interno inadequados (positivo e negativo) ou contaminação pode resultar em alterações na composição microbiana que não refletem as verda-



deiras mudanças. Entretanto, as amostras de tecido são dominadas pelo DNA do hospedeiro, e profundidade de sequenciamento alta ou abordagens são necessárias para enriquecer o DNA microbiano. Além disso, os resultados dessas análises são geralmente apresentados como uma proporção, em vez de um nível absoluto, e a

presença de micróbios específicos em um espécime não pode igualar a patogenicidade.

ESPECTRO DE DIVERSIDADE MICROBIANA NAS ESPÉCIES. Além das variabilidades interindividuais, os seres humanos têm microbiota intestinal distinta das

TABELA 1 Composição alterada da microbiota intestinal associada a doenças cardiovasculares

Primeiro autor (nº ref.), ano	População	Técnica	Aumento de DCV	Diminuição de DCV
Karlsson et al. (145), 2012	12 pacientes suecos com IM/AVC versus 13 indivíduos pareados por idade/sexo como controle	Metagenoma intestinal	<i>Collinsella</i>	<i>Eubacterium</i> <i>Roseburia</i>
Dinakaran et al. (146), 2014	80 pacientes indianos com DCV (valvar, isquêmica, congênita) versus 40 indivíduos saudáveis como controle	16S rRNA e metagenoma sanguíneo	<i>Proteobacteria</i> <i>Actinobacteria</i> Fagos de <i>Propionibacterium</i> Fagos de <i>Pseudomonas</i> Fagos de <i>Rhizobium</i> <i>Lymphocystis virus</i> <i>Torque teno virus</i>	
Yin et al. (147), 2015	141 pacientes chineses AVC/AIT versus 94 indivíduos assintomáticos como controle	Região V4 do 16S rRNA.	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Proteobacteria</i> <i>Escherichia/Shigella</i>	<i>Bacteroidetes</i> <i>Bacteroidales</i> <i>Bacteroidaceae</i> <i>Bacteriodes</i>
Emoto et al. (32), 2016	39 pacientes japoneses DAC versus 30 indivíduos pareados por idade/sexo com fatores de risco como controle versus 50 indivíduos saudáveis como controle	RFLP terminal	Relação de firmicutes/bateriodes com <i>Lactobacillales</i>	<i>Bacteroides</i> + <i>Prevotella</i>
Feng et al. (148), 2016	59 pacientes chineses com DAC versus 43 indivíduos saudáveis como controle	Metagenoma intestinal	<i>Streptococcus</i> sp. M334 e M143 <i>Clostridium</i> sp. HGF2	
Jie et al. (33), 2017	218 pacientes chineses com DCVA (angina estável/instável, IAM) versus 187 indivíduos saudáveis como controle	Metagenoma intestinal	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella</i> spp <i>Enterobacter aerogenes</i> Microbioma da cavidade oral <i>Streptococcus</i> sp <i>Lactobacillus salivarius</i> <i>Solobacterium moorei</i> <i>Atropobium parvulum</i> Outros membros do microbioma <i>Ruminococcus gnavus</i> <i>Eggerthella lenta</i>	Bactérias produtoras de butirato <i>Roseburia intestinalis</i> <i>Faecalibacterium</i> cf. <i>prausnitzii</i> Membros comuns do microbioma <i>Bacteriodes</i> spp <i>Prevotella copri</i> <i>Alistipes shahii</i>

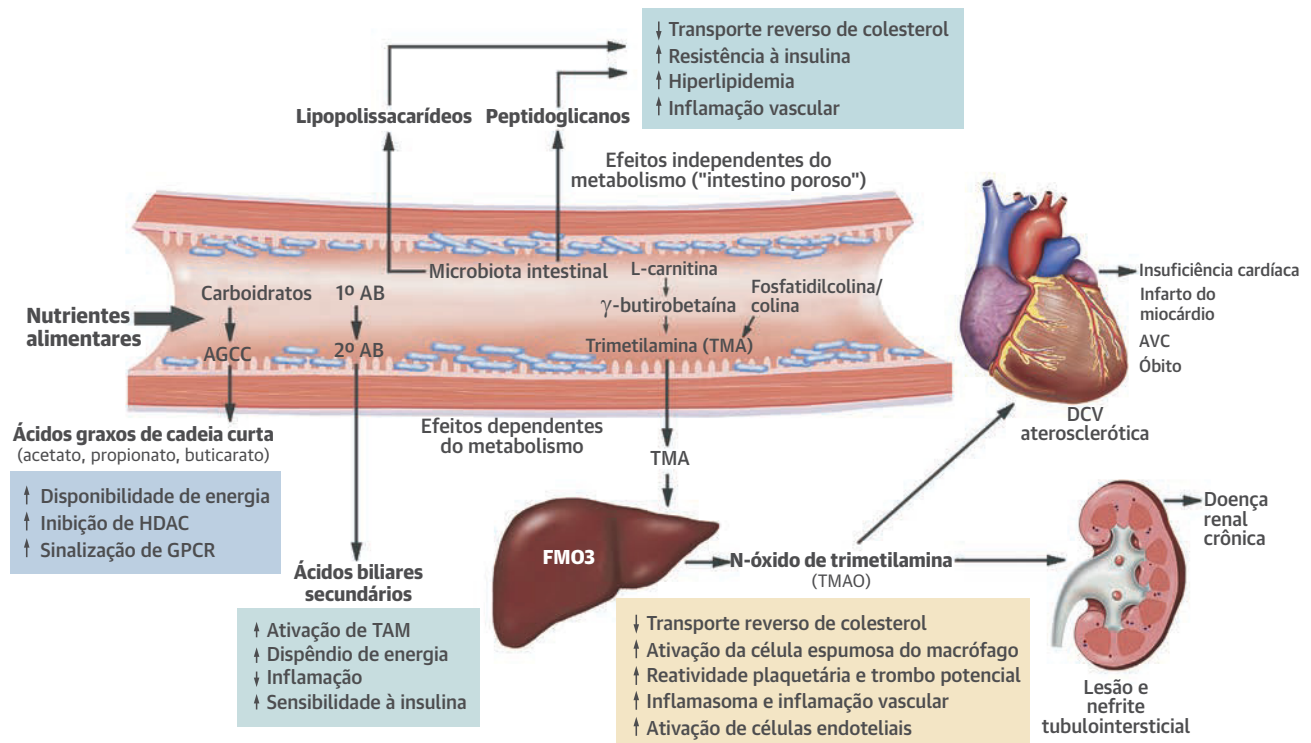
AIT = ataque isquêmico transitório; DAC = doença arterial coronariana; DCVA = doença cardiovascular aterosclerótica; DCV = doença cardiovascular; IM = infarto do miocárdio; RFLP = restriction fragment length polymorphism (polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição).

outras espécies. No entanto, a maioria da pesquisa mecanicista sobre microbiota intestinal utiliza o modelo murino com seus fenótipos e genótipos bem-definidos, bem como variações ambientais cuidadosamente controladas como, por exemplo, dietas e condições de domicílio em experimentos. Os camundongos podem variar muito entre linhagens de endocruzamento e podem ser bem diferentes dos seres humanos na anatomia, genética e fisiologia, bem como exposições ambientais e ingestão alimentar. Diferentes modelos de camundongos também podem levar a mudanças divergentes na composição da microbiota intestinal e podem ter uma relação diferente entre a microbiota intestinal e o hospedeiro. No entanto, muitas provas de conceito utilizam modelos de camundongo gnotobióticos [todos os microrganismos são conhecidos ou excluídos (como naqueles sem germes)]. Alguns dos dados mais fortes que demonstraram a possível participação da microbiota intestinal na susceptibilidade a DCV utilizaram camundongos sem germes durante os estudos de transplante microbiano para demonstrar a transmissão de um fenótipo ou uma doença, que preenche um elemento essencial do “postulado de Koch” para patogênese microbiana (15, 16). Exemplos em que estudos com camundongos de transferência microbiana demonstraram a transmissão de fenótipos relevantes para DCV incluem obesidade e/ou adiposidade (17, 18),

aterosclerose (19, 20), hipertensão arterial (21-23), trombose (24), insuficiência renal (25) e resistência à insulina (26, 27). A introdução de amostras fecais humanas para demonstrar a transmissibilidade de fenótipos de doenças (por exemplo, características da síndrome metabólica) foi relatada (28). Discussões sobre o papel contributivo da microbiota intestinal na obesidade e doenças inflamatórias têm sido extensivamente revisadas em outros lugares (29).

ALTERAÇÕES NA COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL: DISBIOSE

O termo “disbiose” refere-se a um desequilíbrio nas comunidades microbianas dentro ou sobre o corpo. Alterações na composição da microbiota intestinal associada a presença de numerosas doenças e/ou fenótipos foram o foco da maioria dos estudos sobre microbioma na última década. A capacidade de identificar os padrões específicos de composição da microbiota que estão associados a maior suscetibilidade da doença ao longo do tempo é um conceito atraente. No intestino saudável, *Bacteroidetes* e *Firmicutes* contribuem à maioria do total das espécies bacterianas, e sua relação é frequentemente considerada uma estimativa relativa de saúde da microbiota intestinal. Embora intrigante e, potencialmente, perspicaz, os *Bacteroidetes* e *Firmicutes*

ILUSTRAÇÃO CENTRAL. Microbiota intestinal e suas contribuições metabólicas para a saúde e doença cardiovascular

Tang, W.H.W. et al. J Am Coll Cardiol. 2019;73(16):2089-105.

Nutrientes alimentares são filtrados pela microbiota intestinal pelos efeitos dependentes de metabolismo [geração de metabólitos microbianos, como ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs) e trimetilamina de carboidratos alimentares e colina/carnitina, respectivamente] e efeitos independentes do metabolismo (lipopolissacarídeos e peptidoglicano), levando, por sua vez, a alterações metabólicas que afetam os sistemas cardiovascular e finalidades do órgão (145). BA = ácidos biliares; DCV = doença cardiovascular; FMO3 = flavina monooxigenase; GPCR = receptores acoplados à proteína G; HDAC = histona deacetilase; TAM = tecido adiposo marrom.

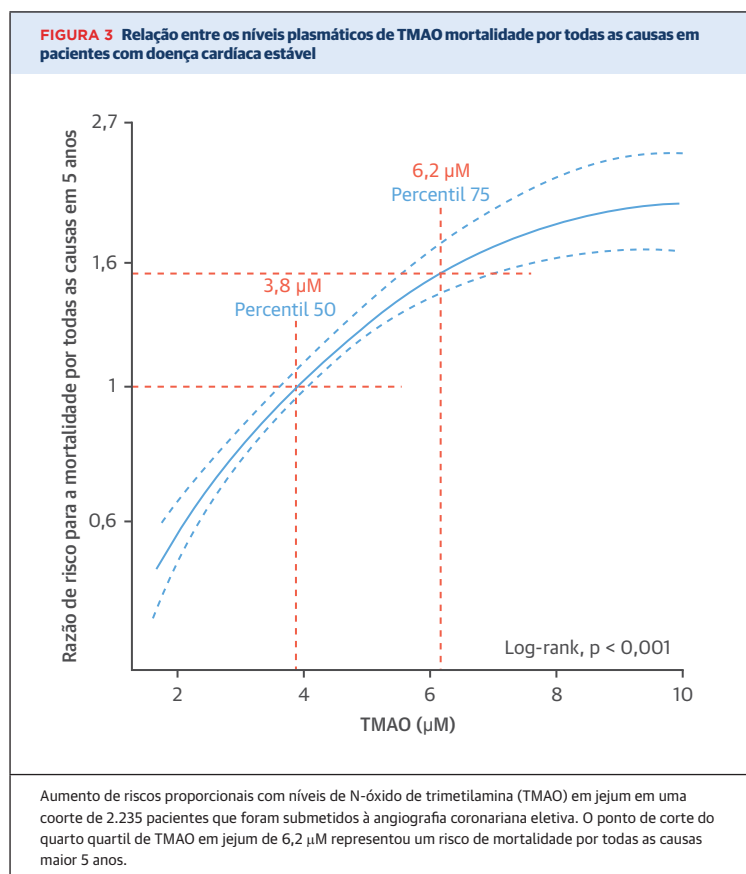
representam diversos filios, e tais análises são, por conseguinte, relativamente grosseiras e também puramente associativa por natureza. Além disso, as interações microbianas do hospedeiro são muitas vezes dinâmicas e dependem da disponibilidade de nutrientes no local, tensão de oxigênio, pH, motilidade gástrica e muitos outros parâmetros. Portanto, as comunidades microbianas são, muitas vezes, únicas e distintas entre regiões, e ao longo de todo o aparelho digestivo. Essa característica acrescenta desafios na interpretação da composição microbiana baseada em análises de materiais fecais (30). Vírus, fungos e *Archaea* contribuem, também, para os dados da sequência de DNA sem hospedeiro obtidos durante a análise de sequenciamento de profundidade além de bactérias, contribuindo assim para uma maior complexidade nas análises e interpretações.

DISBIOSE EM ATEROSCLEROSE E DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA. Alterações na composição microbiana distintas foram descritas na definição da doença aterosclerótica coronariana (DAC) em vários es-

tudos de caso-controle que utilizaram amostras fecais de pacientes com fenótipos diferentes (Tabela 1). Não foi totalmente caracterizado se elas representam táxons microbianos associados a DAC versus medicamentos ou fatores de risco que contribuem ao desenvolvimento da DAC. O primeiro estudo que explorou as alterações da composição microbiana associadas a placas ateroscleróticas, bem como microbiota intestinal e oral, foi relatado por Koren et al. (31). Esse estudo utilizou pirosequenciamento de genes 16S rRNA para buscar táxons bacterianos cujas proporções foram associadas a DAC. Mais estudos contemporâneos relataram alterações características em pacientes com DAC que tiveram um aumento significativo de *Firmicutes* (*Lactobacillales*) acoplados com uma diminuição na *Bacteroidetes* (*Bacteroides* e *Prevotella*), o que não foi observado em uma coorte comparativa de pacientes com diabetes (32). Em um dos maiores estudos de associação de amplo metagenoma até o momento, Jie et al. (33) observaram uma maior abundância de *Enterobacteriaceae* e bacté-

rias associadas à cavidade oral e bactérias produtoras de butirato relativamente escassas em pacientes com DCV aterosclerótica versus indivíduos saudáveis como controle (33). A influência potencial de disbiose na patogênese da DCV aterosclerótica não deve ser confundida com investigações anteriores que focaram em patógenos microbianos implicados em associações epidemiológicas. Estudos mecanicistas implicaram que patógenos microbianos específicos, como *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori* e *Porphyromonas gingivalis* poderiam diretamente invadir células vasculares e leucócitos, promovendo inflamação da gengiva ou pulmões. No entanto, ensaios clínicos randomizados com antibióticos para atingir esses patógenos microbianos não produziram quaisquer benefícios clínicos na redução da morbidade e da mortalidade em pacientes com DAC. As contribuições patogênicas desses micróbios permanecem incertas (34). Um exame cuidadoso dos primeiros estudos revelou que *Chryseomonas* foi identificado em amostras de placa aterosclerótica, e a abundância combinada de *Veillonella* e *Streptococcus* em placas ateroscleróticas foram correlacionados com sua abundância na cavidade oral, que é outra ligação indireta entre doença periodontal e aterosclerose (31). Uma coorte maior com amostras disponíveis de endarterectomia revelou táxons que pertenciam predominantemente a *Proteobacteria* e *Actinobacteria*, sem diferença entre pacientes assintomáticos e sintomáticos, ou regiões da placa, o que sugere menor influência na vulnerabilidade da placa (35).

DISBIOSE NA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA. Alterações na composição microbiana intestinal foram bem descritas em pacientes com insuficiência cardíaca (IC), especialmente com redução da diversidade e depleção da microbiota intestinal do núcleo (36). Como um resultado possível, observou-se que pacientes com IC eram mais propensos a infecções por *Clostridium difficile* (37). A caracterização cuidadosa de superfícies luminiais intestinais tem revelado aumento bacteriano significativamente maior com biofilme da mucosa e aumento de adesões bacterianas em pacientes com IC versus indivíduos sem IC como controle (38). Com edema na parede do intestino durante a congestão esplâncnica acompanhada de IC, a função de barreira intestinal é prejudicada, e componentes estruturais da microbiota podem ter uma interação maior com a mucosa intestinal do hospedeiro (Ilustração central). Quando essas interações ocorrem com a superfície das células epiteliais intestinais através de receptores de reconhecimento de padrão, isso pode estimular respostas imunes do hospedeiro e levar à inflamação vascular. Essa situação foi observada em casos de IC em que exacerbações agudas foram associadas ao aumento da detecção de lipopolis-



sacarídeos circulantes e a respostas inflamatórias (39). Uma maior abundância de colônias microbianas patogênicas (*Candida* spp) e bactérias (*Campylobacter*, *Shigella* e *Yersinia*) foram isoladas a partir de amostras fecais de pacientes com IC, especialmente naqueles com elevação da pressão atrial direita e diminuição da função da barreira intestinal (40). Três coortes independentes de IC que utilizaram técnicas de sequenciamento para caracterizar a composição microbiana intestinal relataram uma diminuição consistente na diversidade microbiana e uma depleção de vários produtores de butirato (*Fecalibacterium prausnitzii*, família *Lachnospiraceae*, *Eubacterium hallii*) que foram inversamente associados a biomarcadores inflamatórios (36, 41-43).

DISBIOSE E HIPERTENSÃO ARTERIAL E DIABETES MELLITUS. Embora haja diversos relatórios sobre perfis de microbiota intestinal, pacientes com diabetes tipo 2 têm assinaturas de microbiota intestinal distintas em comparação com indivíduos sem diabetes (44). Especificamente, observou-se concentrações menores de micróbios produtores de butirato, como *Roseburia intestinalis* e *Fecalibacterium prausnitzii*, e concentrações maiores de *Lactobacillus gasseri*, *Streptococcus mutans*

e algumas espécies de *Clostridiales*, *Desulfovibrio* e *Proteobacteria* (45). A administração de metformina aumentou a *Akkermansia muciniphila* e resultou em um aumento relativo em algumas espécies de *Escherichia* que poderiam ter efeitos benéficos sobre a homeostase da glicose (46, 47). Entretanto, pacientes resistentes à insulina apresentaram aumento dos níveis de aminoácidos de cadeia ramificada, que foram especialmente associados à presença de *Prevotella copri* e *Bacteroides vulgatus*, o que pode aumentar a resistência à insulina e os níveis de aminoácidos de cadeia ramificada em camundongos (48). Os estudos humanos revelaram que as respostas de glicose pós-prandial à ingestão alimentar podem ser moduladas pela microbiota intestinal (49).

A pressão arterial elevada é causa principal de DCV, e a alta ingestão de sal na dieta tem sido implicada na fisiopatologia da hipertensão arterial. Alterações do microbioma intestinal em resposta à alta ingestão de sal foram recentemente observadas em um estudo experimental em camundongos (50). A alta ingestão de sal resultou em um empobrecimento de *Lactobacillus murinus*. Por conseguinte, o tratamento de camundongos com *Lactobacillus murinus* preveniu a hipertensão sensível a sal, em parte pela modulação de células TH17 (50). Esses resultados merecem mais estudos em seres humanos.

INTERVENÇÕES PROBIÓTICAS E DIETÉTICAS VISANDO MICROBIOTA INTESTINAL. Uma visão da microbiota intestinal e suas respectivas vias metabólicas proporcionou a oportunidade de explorar o papel contributivo da microbiota intestinal na geração de variabilidade de respostas fisiológicas de nutrientes alimentares. Aproveitando a capacidade de monitorar os níveis contínuos de glicose, um padrão glicêmico individualizado surgiu quando informações dietéticas cuidadosamente curadas com algoritmos de aprendizado de máquina foram baseadas em informações metagenômicas (49). As respostas do microbioma foram medidas em >800 pessoas usando o 16S rRNA e o perfil metagenômico *shotgun* para avaliar taxonomia e função, respectivamente; portanto, adequar a ingestão dietética ao microbioma intestinal de um indivíduo poderia potencialmente minimizar um aumento na glicose pós-prandial (49). Esses resultados destacaram como aconselhamento alimentar e/ou intervenções podem ter o potencial para ser adaptado individualmente para cada pessoa (devido à enorme variação na resposta da glicose pós-prandial à comida “ruim” e “boa”). Essas observações podem permitir uma precisão avançada maior sobre o aconselhamento nutricional no futuro, na medida em que entramos na era da “medicina personalizada”. No entanto, ainda são necessários estudos prospectivos rigorosos para determinar se tais abordagens podem afetar o risco cardiovascular.

Teoricamente, a modulação direta da composição microbiana tem o potencial de restaurar as comunidades microbianas saudáveis e promover a saúde cardiovascular. Em um modelo de infarto do miocárdio em camundongos, a administração de antibióticos de largo espectro foi associada a alterações nos níveis de leptina e catabólitos de aminoácidos aromáticos, bem como uma redução do tamanho do infarto (51). Além disso, a administração de *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 foi associada à atenuação da remodelação cardíaca pós-infarto em camundongos (51, 52). Curiosamente, os micróbios alimentares apenas colonizaram transitóriamente os intestinos. Ao contrário da diarreia associada a antibióticos e a *Clostridium difficile*, não se estabeleceu em estudos humanos se probióticos e prebióticos podem influenciar diretamente as distribuições microbianas gerais (53, 54). Embora existam relatos variados de efeitos de redução da pressão arterial e de lipídios com probióticos, estudos com intervenção humana que demonstrem sua eficácia são limitados, e não existem recomendações clínicas para sua prescrição (55).

METABÓLITOS MICROBIANOS COMO MODULADORES FISIOLÓGICOS: ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA E ÁCIDOS BILIARES

Um papel chave para a microbiota intestinal é apoiar todos os dias funções fisiológicas na digestão de alimentos através de vários processos de fermentação em resposta à ingestão de substratos (56). Alguns metabólitos podem ser absorvidos diretamente na circulação do hospedeiro e servem como hormônios para órgãos distantes como sítios de ação. Outros metabólitos podem ser metabolizados por enzimas do hospedeiro semelhantes a pro-hormônios, que servem como mediadores ou moléculas sinalizadoras. É provável que a maioria dos metabólitos gerados por microbiana possam proporcionar efeitos sinérgicos que promovem a saúde. No entanto, metabólitos tóxicos também podem acumular, especialmente quando espécies patogênicas estão colonizando ou quando os mecanismos normais de limpeza do hospedeiro (por exemplo, função renal) desses metabólitos estão comprometidos. A detecção dessa “metaboloma de comida” fornece uma oportunidade única de obter uma ideia não só para a qualidade e a quantidade da ingestão de alimentos, mas também para as consequências funcionais como resultado do metabolismo microbiano complexo do hospedeiro (57).

EFEITOS FISIOLÓGICOS DE ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA. A fermentação anaeróbica de nutrientes não digeridos, como amido resistente, fibras dietéticas e vários polissacarídeos complexos, produzem ácidos

graxos variando de 1 a 6 cadeias de carbono, que são comumente referidas como ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs). Os exemplos incluem acetato, propionato e butirato, que são absorvidos de maneira ativa e passiva no epitélio colônico na veia porta (58). Embora forneçam cerca de 5% a 10% de energia para o hospedeiro humano, os AGCCs servem como moléculas sinalizadoras para sistemas corporais, incluindo a modulação de sistemas autonômicos e pressão arterial sistêmica, bem como respostas inflamatórias e outras funções celulares. Os AGCCs apresentam uma ampla variedade de funções fisiológicas, incluindo inibição da histona deacetilase, da quimiotaxia e da modulação de fagocitose, indução de espécies reativas de oxigênio, proliferação celular e alteração da integridade da barreira intestinal (58). Pacientes com diabetes mellitus tipo 2 têm menor abundância de bactérias produtoras de butirato e mais *Lactobacillus* spp (44, 45, 59). AGCCs, em particular, butirato, podem servir como substrato energético para as células epiteliais dos intestinos (60, 61). Além disso, tratamento com vancomicina reduz a abundância de bactérias produtoras de butirato em pacientes com síndrome metabólica, o que destaca seu importante papel na manutenção da sensibilidade à insulina (62).

Manifestações mecanicistas recentes também revelaram que AGCCs podem ativar diretamente receptores distintos e específicos acoplados à proteína G. Alguns dos receptores acoplados à proteína G identificados para interagir com AGCCs de estudos genéticos de modelo de camundongos incluem o receptor 41 da proteína G (GRP41) e 78 receptores olfativos (Olf78) (Figura 2) (63). Em particular, o Olf78 é altamente expresso no aparelho justaglomerular renal, onde media a secreção de renina em resposta a AGCCs. Além disso, ambos Olf78 e GRP41 são expressos em células do músculo liso de pequenos vasos de resistência, em que diferencialmente mediam o tônus vascular. Curiosamente, camundongos *knock-out* com Olf78 são hipotensos (64), enquanto camundongos *knock-out* GRP41 são hipertensos (65), o que implica que essas vias podem ser ligações fisiologicamente importantes entre AGCCs e controle da pressão arterial do hospedeiro. O propionato AGCC de 3 carbonos pode estimular Olf78 para elevar a pressão arterial, enquanto a estimulação de GRP41 pode reduzir a pressão arterial (64, 66). O papel obrigatório da microbiota intestinal em gerar AGCCs foi demonstrado por tratamento com antibióticos que elevou a pressão arterial em camundongos *knock-out* Olf78, assim, apoiando o envolvimento desses receptores no controle da pressão arterial. Estudos recentes em animais demonstraram que AGCCs derivados da microbiota intestinal são essenciais para a resposta imune do hospedeiro e a capacidade de reparo cardíaco após o infarto do miocárdio em um modelo de camundongo

com ou sem antibióticos (67). No entanto, permanece limitada a demonstração direta de tais efeitos em humanos com DCV.

EFEITOS FISIOLÓGICOS DOS ÁCIDOS BILIARES E MODULAÇÕES MICROBIANAS.

Ácidos biliares facilitam a absorção de gorduras dietéticas e moléculas solúveis em gordura. Vários ácidos biliares podem regular o metabolismo energético através da ativação de receptores nucleares, como ácido biliar acoplado à proteína G do receptor 1 (TGR5) e o receptor X farnesoide (FXR) (68). O FXR intestinal parece regular o colesterol hepático 7 α -hidroxilase (CYP7A1), a enzima de taxa limitante na síntese de ácido biliar, por meio de um mecanismo dependente de fator de crescimento dos fibroblastos (FGF)-15/19 (69). Por conseguinte, os seres humanos produzem uma grande quantidade de ácido biliar hidrofílico e conjugado, que é mantido por antagonismo de retrocontrole positivo de FXR no intestino e no fígado. Por meio da hidrólise de sais biliares e da 7 α -desidroxilação do ácido biliar, a microbiota intestinal é capaz de produzir hormônios do ácido biliar secundário que afetam a fisiologia do hospedeiro por agonismo do FXR no intestino e no fígado, resultando em uma quantidade menor de ácidos biliares hidrofílicos e conjugados (68). Ácidos biliares como o ácido deoxicólico podem servir como um agente antimicrobiano direto por causa de sua hidrofobicidade e propriedades detergentes nas membranas bacterianas (70). Portanto, existe um equilíbrio dinâmico entre quantidade e composição do ácido biliar do microbioma e da dieta intestinal. A hidrofiliabilidade da quantidade do ácido biliar pode ser associada a estados da doença, enquanto os níveis reduzidos de ácidos biliares no intestino podem ser associados ao aumento bacteriano e à inflamação. Um análogo do ácido biliar semissintético e um agonista potente do FXR que foi recentemente aprovado para o tratamento de hepatopatia gordurosa não alcoólica, ácido obetecólico, pode reduzir a translocação bacteriana e a inflamação intestinal (71).

O POTENCIAL TERAPÊUTICO DAS INTERVENÇÕES DIETÉTICAS PARA MODULAR AGCCS.

As muitas ligações entre a comunidade microbiana intestinal alterada, metabólitos e a suscetibilidade para DCV e doenças metabólicas têm colocado em evidência o microbioma intestinal como novo alvo potencial para a terapêutica. Atualmente, a modulação da dieta é a principal ferramenta terapêutica utilizada na prática clínica para afetar doenças metabólicas crônicas, e embora interações de estilo de vida possam afetar claramente a comunidade microbiana intestinal da estrutura e função, há poucos estudos que exploraram os efeitos de intervenções dietéticas sobre o microbioma intestinal em humanos. Os estudos existentes sobre dieta na microbiota intestinal

em humanos observaram, no geral, efeitos modestos no curto prazo (72). No entanto, alterações extremas de dietas à base de animais para dietas à base de plantas podem modificar as produções sistêmicas e regionais dos AGCCs, contribuindo potencialmente para alguns dos efeitos benéficos propostos dessas dietas. Em um estudo, uma dieta à base de animais foi associada a aumento na abundância de microrganismos tolerantes a bile (*Alistipes*, *Bilophila* e *Bacteroides*) e redução nos níveis de *Firmicutes* que metabolizam polissacarídeos dietéticos de plantas (*Roseburia*, *Eubacterium rectale* e *Ruminococcus bromii*) (53). Como resultado, houve redução significativa no acetato fecal e nas concentrações de butirato quando os indivíduos mudaram de dieta à base de plantas para à base de animais (53). A transplantação da microbiota fecal de doadores para pacientes com resistência à insulina e síndrome metabólica levou à melhora na sensibilidade à insulina e foi associada a maior abundância de bactérias produtoras de butirato como *Roseburia* (28). Colonizar camundongos sem germes e deficientes em apolipoproteína E (Apoe-/-) com comunidades microbianas intencionais, com ou sem o *Roseburia intestinalis* revelou que interações com micróbios na dieta são fundamentais para a compreensão da interação entre microbiota e DCV (73). Na presença de polissacarídeos vegetais, *Roseburia intestinalis* poderia produzir butirato e conferir proteção contra a aterosclerose, embora nenhuma proteção tenha sido observada naqueles em dietas de polissacarídeo baixo em vegetal (73). Da mesma forma, camundongos da microbiota protegeram Apoe-/- contra aterosclerose quando alimentados com uma dieta rica em *chow* em polissacarídeos vegetais, mas não quando alimentados com dietas do estilo ocidental (74).

METABÓLITOS MICROBIANOS COMO MEDIADORES PATOGENICOS: N-ÓXIDO DE TRIMETILAMINA

Descobertas de mediadores patogênicos potenciais que, direta ou indiretamente, modulam as susceptibilidades da doença forneceram uma janela valiosa para interações microbianas no hospedeiro, que podem modular riscos cardiorenais. Em uma descoberta inicial baseada na análise metabômica sem alvo, Wang et al. (75) identificaram 18 analitos de pequenas moléculas, que na coorte caso-controle posterior para de validação (aproximadamente 2.000 indivíduos) repetidamente distinguiu entre pacientes com e sem futuro desenvolvimento de eventos cardiovasculares adversos maiores (morte, infarto do miocárdio e AVC). Alguns desses metabólitos foram identificados como preditores de risco de DCV conhecidos, que não estão associadas a microbiota intestinal (como L-citrulina) (76). Três dos

analitos (m/z 76, 104 e 118) foram correlacionados estreitamente uns com os outros, o que sugere participação em uma via comum. Um em particular (m/z 76) parecia estar conduzindo a associação com riscos de DCV incidente e, posteriormente, demonstrou ser N-óxido de trimetilamina (TMAO), uma microbiota intestinal dependente por produto de colina dietética e fosfatidilcolina (75). Outro metabólito desconhecido cujos níveis foram fortemente associados com os riscos de DCV incidentes também foi identificado como o aminoácido trimetilisina (TML), que se demonstrou servir como um precursor de nutriente para a geração de TMAO dependente da microbiota intestinal (77).

GERAÇÃO DE MICROBIANA DE TML E PRODUÇÃO DE HOSPEDEIRO DE TMAO.

Catabolismo microbiano de nutrientes dietéticos que possuem agrupamento de trimetilamina (TMA) [N(CH₃)₃], como colina, fosfatidilcolina e L-carnitina, podem servir como precursores de geração de TMA por enzimas microbianas específicas ("liase TMA"), residindo nos intestinos (75, 78, 79). TMA, um gás odoroso com cheiro de peixe podre, é então absorvido pelo hospedeiro, e após a chegada ao fígado pela circulação portal, é rapidamente convertido em TMAO pela flavina monooxigenase hepática (FMOs; particularmente FMO3) (80). Embora os camundongos do sexo feminino pareçam ter maior atividade de FMO3 do que camundongos do sexo masculino, estudos de associação ampla do genoma humano ainda precisam identificar quaisquer diferenças de sexo nas variantes do FMO3 (81, 82). Pacientes com polimorfismos genéticos de FMO3 experienciaram um distúrbio metabólico de TMA excessivo, chamado de síndrome do odor de peixe (ou trimetilaminúria) (83). O TMAO é finalmente excretado predominantemente pelos rins (Ilustração central) (84).

Muito da química do TMA como um metabólito tóxico foi inicialmente estudado por causa de seu acúmulo como resultado da purificação em esgoto (85). Colina é uma abundante parcela química na bile, e continuamente chega ao intestino em onívoros e veganos. A carnitina é um nutriente abundante em carnes, especialmente carnes vermelhas. Tanto a colina e carnitina dentro do intestino são absorvidas no intestino delgado por meio de transportadores específicos, mas a absorção é incompleta, especialmente com grandes refeições que podem saturar os sistemas de captação. Consequentemente, tanto a ingestão dietética de colina e carnitina pode levar a elevações significativas na TMA e TMAO, o que se demonstrou ter muitos efeitos adversos no metabolismo do hospedeiro, especialmente aqueles que afetam a saúde cardiovascular (86).

GERAÇÃO E ATEROGÊNESE DE TMAO INDUZIDA POR DIETA. Depois de observar que os níveis plasmáticos de TMAO são dependentes de dose associadas à DAC

em indivíduos, estudos funcionais iniciais procuraram determinar se as associações observadas foram mecanicamente ligadas à causa da doença. Para demonstrar diretamente uma contribuição pró-aterogênica da via de TMAO com meta-organismos (ou seja, envolvendo tanto micróbio e hospedeiro), estudos iniciais alimentaram camundongos com uma dieta rica em colina ou carnitina, e demonstraram aumentos nos níveis de plasma TMAO, formação de células espumosas do macrófago com colesterol e maior desenvolvimento da placa aterosclerótica da aorta (75, 79). Por outro lado, camundongos sem germes (ausência de micróbios intestinais) ou supressão de antibiótico de largo espectro e de curto prazo de microbiota intestinal eliminou a capacidade de geração de TMAO e suprimiu o aumento da placa aterosclerótica dependente da dieta (colina ou carnitina) (75, 79). Experimentos de transplante microbiano utilizando comunidades microbianas cecais recuperadas de uma linhagem pura de alta produção de TMA/TMAO de camundongos (C57BL/6J) em comparação com uma de baixa produção de TMA/TMAO (camundongos NZW/LacJ) demonstraram transmitir um aumento dependente da dieta de colina na aterosclerose (19). Da mesma forma, Zhu et al. (24) demonstraram que o transplante microbiano de uma comunidade de alta produção de TMA poderia transmitir geração de TMAO e aumento potencial de trombose em camundongos recipientes sem germes. Em outros estudos que utilizaram camundongos sem germes como recipientes e comunidades microbianas sintéticas capazes de produzir TMA *versus* não produtoras de TMA, foi firmemente estabelecido que o metabólito aterogênico TMAO e o metabolismo de colina foram integralmente ligados a microbiota intestinal e suas consequências funcionais adversas (20, 87).

OS ESTUDOS HUMANOS DE VALOR PROGNÓSTICO DOS NÍVEIS CIRCULANTES DE TMAO. Quando traduzido para os seres humanos, a supressão da produção de TMAO foi observada em indivíduos saudáveis, tendo um curso curto de antibióticos mal absorvidos, o que ilustrou o papel obrigatório da microbiota intestinal em na geração de TMA/TMAO (79, 88). Em uma coorte de >1.800 indivíduos, níveis plasmáticos de TMAO foram positivamente associados à DAC, doença arterial periférica e história de infarto do miocárdio, independente dos fatores de risco tradicionais (75). Em um estudo posterior que combinou dados de >4.000 indivíduos que se submeteram à angiografia coronariana eletiva, TMAO elevado previu eventos cardíacos adversos grandes, como morte, infarto do miocárdio e AVC durante um período de 3 anos, mesmo na presença de níveis elevados de colina e betaína (metabólitos não microbianos) (88, 89). Esses efeitos de prognóstico

também foram observados em subgrupos de pacientes com história de insuficiência cardíaca (90), diabetes mellitus (91), doença arterial periférica (92), doença renal crônica (DRC) (93), elevada carga aterosclerótica (94), síndrome coronariana aguda ou infarto do miocárdio (95-97), e até mesmo pacientes sem DCV (98), todos independentes de fatores de risco tradicionais. Além disso, níveis elevados de TMAO foram associados a um grau de carga aterosclerótica, como definido pelo número de veias com DAC por angiografia, e com escores do SYNTAX (sinergia entre PCI com *Taxus* e cirurgia cardíaca) (99). Esses resultados foram validados por coortes independentes em diferentes continentes e revisados recentemente em várias metanálises (100-102), que sugeria uma estimativa de valor de corte de >6 µM (aproximadamente o ponto de corte do terceiro e/ou quarto quartil de muitas coortes) foi preditor de maior risco de eventos cardíacos adversos (Figura 3). No entanto, naqueles com excesso de TMAO circulante (como aqueles com estágio final de doença renal em hemodiálise, com o primeiro quartil em excesso de 25 a 50 pM), o valor prognóstico incremental do TMAO pareceu ser reduzido (103,104), e probióticos não tiveram efeitos sobre os níveis de TMAO nesta população (105).

Embora TMAO em modelos animais exerça numerosos efeitos de promoção da aterosclerose e/ou trombose e inflamação, o receptor preciso ou sensor químico que detecta TMAO permanece desconhecido. Estudos em animais indicam que a produção de TMA/TMAO leva à modulação de colesterol e de metabolismo de esteróis e/ou do ácido biliar, assim como alterações da quantidade, composição e transportes de ácido biliar (79). Efeitos globais adicionais de TMAO incluem comprometimento do transporte reverso do colesterol e a promoção do transporte reverso do colesterol. Evidências experimentais *in vitro* e *in vivo* de TMAO também demonstraram disfunção vascular e respostas inflamatórias (106), incluindo na via inflamassoma NLRP3 (107,108). Em camundongos mais velhos, antibióticos reverteram a disfunção endotelial e o enrijecimento arterial acompanhados por níveis menores de TMAO e de estresse oxidativo, bem como uma maior expressão de enzimas antioxidantes (109).

Recentemente, demonstrou-se que TMAO tinha efeitos diretos sobre as plaquetas, alterando o cálcio intracelular dependente de estímulo, sinalizando em resposta a múltiplos agonistas, fomentando aumento da reatividade plaquetária e riscos trombóticos. Por exemplo, a injeção direta de TMAO ou colina dietética e elevação de TMAO dependente de microbiota intestinal demonstrou aumentar a responsividade de plaquetas e promover formação mais rápida de coágulo *in vivo*, utilizando vários modelos de trombose em camundongos (24). Da mesma forma, a manipulação genética dos níveis de expressão

de FMO3 hepático do hospedeiro em camundongos (por exemplo, redução através de oligonucleotídeos antisense alvos ou sobre-expressão do transgene) demonstraram alterar os níveis de TMAO sistêmico, e, correspondentemente, ambos alteraram a responsividade plaquetária e o potencial de trombose in vivo (110). Aumento da responsividade plaquetária com suplementação de colina dietética e elevação de TMAO também foi observada em estudos de intervenção recente que examinaram a agregação plaquetária nas respostas de humanos (111). Esses estudos também demonstraram que a aspirina em baixa dose ligeiramente reduziu níveis de TMAO em indivíduos, e atenuou o efeito pró-trombótico (maior respostas de agregação plaquetária) observado com níveis elevados de TMAO (111).

Relatou-se que níveis elevados de TMAO em indivíduos com função renal normal na coorte de Framingham anunciaram risco maior para desenvolvimento de DRC (112), e estudos em modelo animal, demonstrou-se que elevação crônica de TMAO promoveu tanto comprometimento funcional renal e fibrose tubulointersticial, juntamente com a ativação das vias do fator de transformação do crescimento-beta de pró-fibróticos (93). O modelo de camundongos induzidos com adenina de DRC, o aumento concomitante na expressão hepática de FMO3 ocorreu com aumentos dos níveis circulantes de TMAOs (113). Da mesma forma, indivíduos com IC tiveram níveis elevados de TMAO e piores resultados (90, 114-116). Em modelos murinos, o aumento dos níveis de TMAO exacerbou a remodelação cardíaca com sobrecarga de pressão via constrição transaórtica (117).

OUTROS METABÓLITOS GERADOS NA MICROBIOTA INTESTINAL RELACIONADOS. O mesmo nutriente pode ser processado por diferentes vias metabólicas e em diferentes regiões do intestino; assim, a metaboloma de comida detectada a partir de amostras de plasma só pode representar a soma total de seus balanços. No complexo da via de biossíntese da carnitina, precursores da carnitina, γ -butirobetaína (γ BB) e TML também foram investigados como possíveis substratos para produção de TMA/TMAO (77, 118). Especificamente, a L-carnitina é convertida em TMAO via 2 transformações dependentes de microbiota intestinal e sequencial em seres humanos — uma geração rápida inicial do γ BB intermédio aterogênico, seguida pela transformação em TMA via comunidades de microbiota de baixa abundância em vez de espécie única em resposta a padrões de dieta onívora (119). Níveis elevados de ambos os metabólitos foram associados com desfechos adversos de longo prazo em coortes de pacientes, mas estudos mecanicistas revelaram que poderiam exercer efeitos patogênicos e/ou fisiológicos um pouco diferentes na saúde cardiovascular do que TMAO (77, 79). Por exemplo, embora a carnitina

dietética no modelo Apoe-/- acelere a aterosclerose, esse efeito parece ser mediado pela TMA gerada pela microbiota intestinal (e, assim, TMAO) porque o efeito dietético da carnitina não é mais observado quando a microbiota intestinal é suprimida com antibióticos orais mal absorvidos. Os estudos clínicos com humanos demonstraram que o valor de prognóstico da carnitina na predição incidente de risco de DCV foi atenuada em modelos estatísticos em que TMAO foi incluído (79). Estudos que examinaram a associação entre níveis circulantes de γ BB e riscos cardiovasculares adversos incidentes ainda não foi devidamente avaliada. Da mesma forma, é necessária a análise do valor prognóstico clínico da γ BB antes de ajustes para TMAO *versus* ajustes seguintes para TMAO em trabalhos futuros, porque o fornecimento dietético de γ BB a camundongos propensos a aterosclerose aumentou a aterosclerose raiz aórtica, mas somente na presença de microbiota intestinal intacta e geração de TMAO (118). É provável que tenhamos observado apenas a ponta do iceberg de metabólitos produzidos microbialmente que modulam a DCV. A recente identificação de propionato de imidazol como um metabólito produzido microbialmente que é enriquecido na diabetes tipo 2 e induz resistência à insulina quando injetado em camundongos sugere que outras classes de metabólitos devem ser consideradas como moduladoras da doença (120).

INTERVENÇÕES DIETÉTICAS E MEDICAMENTOSAS COM ALVO NOS NÍVEIS DE TMAO.

Como AGCCs, é evidente que a formação de TMA/TMAO é em grande parte dependente de fontes de nutrientes. Fontes alimentares de colina e/ou fosfatidilcolina e carnitina podem claramente influenciar os níveis sistêmicos. De modo geral, os veganos e vegetarianos têm níveis inferiores de TMAO circulante e de capacidades fecais de geração de TMA/TMAO do que suas contrapartes onívoras (79). Especificamente, dietas ricas em carne vermelha estão associadas com maiores níveis circulantes de TMAO e excreção renal fracional significativamente reduzida de TMAO em comparação com dietas com carne branca ou sem carne (121). A exposição a longo prazo de suplemento de L-carnitina oral também pode induzir a capacidades de geração de TMA/TMAO em seres humanos. Esse mesmo efeito do suplemento de L-carnitina foi observado em camundongos (118) e em humanos (122, 123). Como são suplementos nutricionais comuns de venda livre e servem como aditivos alimentares para consumo humano e animal, seu impacto de longo prazo geral na saúde cardiovascular é desconhecido e precisa ser investigado. Os níveis de plasma de TMAO também podem aumentar com alto teor de gordura (124), embora os efeitos sejam menos claros em dietas isocalóricas (121). Também é de interesse clínico que

medicamentos cardioprotetores, como as estatinas, também possam ter efeitos no TMAO (125). Indivíduos saudáveis que recebem suplemento de colina ou carnitina podem ter um aumento no nível de TMAO circulante, porém esses níveis podem ser parcialmente atenuados pela ingestão concomitante de aspirina oral (111, 119, 126). Em um estudo recente de intervenção clínica, o transplante microbiano fecal de doadores veganos para recipientes da síndrome metabólica não alterou os níveis de TMAO, apesar de melhorar os índices de controle glicêmico (127). No entanto, os níveis basais de TMAO em indivíduos com síndrome metabólica incluídos no estudo foram, em geral, baixos na linha de base, tornando o estudo mais poderoso ao observar uma melhora em anormalidades no metabolismo da glicose do que uma redução na geração de TMAO dependente de microbiota (127).

Uma minoria dos peixes tem níveis elevados de TMAO (especialmente peixes de mar), em que o metabólito é utilizado como parte do mecanismo de prevenção de congelamento. Assim, a ingestão de peixe pode gerar altos níveis de TMAO em humanos, embora o peixe específico e mesmo a época do ano (temperatura da água em que o peixe foi pescado) possam afetar os níveis de TMAO em peixes (128,129). Portanto, não é surpreendente que questões têm sido levantadas em relação se o TMAO é meramente um marcador de DCVs, como décadas de pesquisas epidemiológicas demonstraram que o consumo de peixes pode reduzir o risco de DCV (130, 131). Há relatos de efeitos variáveis de forma aguda ou de curto prazo dos grupos de alimentos, como ovos (rico em fosfatidilcolina) e carnes vermelhas (ricas em carnitina) em níveis circulantes de TMAO (129). No entanto, deve-se ter cuidado sobre como fazer hipóteses causais de que contar grupos de alimentos equivale a modular vias metabólicas da microbiota e/ou hospedeiro. Partindo de uma perspectiva científica, as concentrações de TMA são elevadas em peixes em comparação com quantidades equivalentes de proteína de soja e caseína (leite). Porém, quando quantidades equivalentes de proteínas dessas fontes foram alimentadas a camundongos com propensão aterogênica, aqueles alimentados com proteínas de peixe tiveram a maior quantidade de formação de ateromas (132). É importante destacar também que nem todos os peixes são equivalentes. A maioria dos peixes não têm ácidos graxos ômega-3. Além disso, não foi demonstrado diretamente que as mudanças no consumo de peixe são benéficas a todos os pacientes (130), nem naqueles que são vulneráveis à acumulação de TMAO (por exemplo, em pacientes com DRC).

Com a disponibilidade de TMAO como um teste de diagnóstico clínico *in vitro* para identificar aqueles com maior risco de DCV, ainda se desconhece se as recomen-

dações dietéticas podem ser adaptadas para monitorar TMAO, da mesma forma que os triglicerídeos e a glicemia sanguínea são monitorados e fornecem aconselhamento dietético. Ainda precisar ser determinado se as recomendações dietéticas atuais que promovem a saúde cardiovascular têm potencial impacto benéfico sobre o microbioma intestinal em geral ou TMAO especificamente. É importante reconhecer que a maioria dos aconselhamentos dietéticos recomenda abordagens que se esperaria baixar TMAO, incluindo a redução do consumo de gorduras e calorias, e centrando-se na redução de comidas com alta gordura e colesterol alto (por exemplo, em geral, produtos de origem animal). Um painel europeu recente levou em conta o impacto potencial do TMAO gerado pela microbiota intestinal para as recomendações dietéticas de referência para a colina (133). Dados preliminares que suportam os efeitos de redução de TMAO da dieta e exercício hipocalóricos (134), bem como o jejum intermitente (135), são promissores.

O POTENCIAL DE INTERVENÇÕES TERAPÊUTICAS PARA MODULAR DIRETAMENTE A PRODUÇÃO DO TMAO.

Abordagens para manipular o microbioma intestinal e suas vias metabólicas são promissoras, embora ainda tenham de ser conduzidas na prática clínica. A identificação de enzimas microbianas que trabalham em conjunto para converter nutriente como colina ou carnitina em TMA geraram a descoberta de vários inibidores de pequena molécula que podem modular os níveis de TMA/TMAO e causar efeitos cardiovasculares adversos em estudos experimentais (79, 136-138). O protótipo de um inibidor de liase do TMA é chamado de 3,3-dimetil-1-butanol, que, em culturas de células microbianas e modelos em camundongos *in vivo* pode reduzir a produção de TMA/TMAO sem comprometer a sobrevivência de células microbianas (138). Camundongos que receberam 3,3-dimetil-1-butanol pareciam ter uma redução na carga aterosclerótica, menor formação de células espumosas do macrófago e ter atenuado a progressão da doença cardiorrenal (138). O levantamento de fontes alimentares comuns identificou 3,3-dimetil-1-butanol em algumas amostras de azeite de oliva extravirgem prensado a frio, um componente importante da dieta mediterrânea, que tem sido associada à melhora na saúde cardiovascular (138). No entanto, o impacto da dieta mediterrânea sobre as alterações do TMAO foi um pouco conflitante (139-141). A última geração de inibidores da liase do TMA foi relatada recentemente como altamente potente, suprimindo os níveis de TMAO em modelos animais. Esses agentes também têm mostrado o potencial de escolher um alvo e acumular dentro de microbiota intestinal, o que permite a inibição sustentada de enzimas microbianas produtoras de TMA com a exposição sistêmica limitada dentro do hospedeiro (142).

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Nos últimos anos, dados acumulados sugeriram uma ligação importante entre o microbioma intestinal e DCV. Tornou-se claro que o microbioma desempenha um papel importante na intersecção da dieta e da DCV, isto é, metabolizando componentes da dieta que levam à liberação de AGCCs, alguns dos quais provavelmente promovem efeitos cardiovasculares benéficos importantes. No entanto, existe uma grande lacuna de conhecimento, pois a maioria dos estudos têm focado em caracterizar a composição microbiana em vez de alterações funcionais e suas consequências. Reconhecemos agora que o metabolismo dependente de microbioma também pode levar à produção de metabólitos com efeitos cardiovasculares adversos possíveis, como TMAO, que pode promover maior risco de aterosclerose e trombose. Essas observações fornecem uma oportunidade excelente para o desenvolvimento e teste de novas estratégias terapêuticas que visam o microbioma intestinal para a prevenção e tratamento da DCV. As abordagens podem incluir intervenções dietéticas personalizadas, probióticos e/ou prebióticos, ou inibidores microbianos não letais que têm

como alvo vias específicas, uma vez identificadas (por exemplo, produção de TMA). Também se esperaria dos agentes que visam a via de TMAO ter vários potenciais benefícios terapêuticos, incluindo a redução da progressão do declínio funcional renal, progressão da IC e desfechos adversos em coortes numerosas de alto risco (aquelas com diabetes tipo 2, DRC e IC). No entanto, estudos prospectivos de intervenção de bom poder são necessários para validar essa nova abordagem terapêutica. Também é importante salientar que as doenças cardiometabólicas provavelmente resultam de vários metabólitos, que podem contribuir para uma extensão variável em diferentes indivíduos com alta ou baixa susceptibilidade, e que TMAO é provavelmente apenas a “ponta do iceberg”. A futura identificação de metabólitos produzidos microbialmente e investigação de se são ou não causalmente ligados a doenças cardiometabólicas oferecerá possíveis oportunidades para melhorar a saúde e a prevenção cardiovascular.

CORRESPONDÊNCIA. Dr. W.H. Wilson Tang, Cleveland Clinic, 9500 Euclid Avenue, Desk J3-4, Cleveland, Ohio, EUA 44195. E-mail: tangw@ccf.org. Twitter: @WilsonTangMD.

REFERÊNCIAS

- Benjamin EJ, Virani SS, Callaway CW, et al. Heart disease and stroke statistics-2018 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2018;137:e67-492.
- Estruch R, Ros E, Salas-Salvado J, et al. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *N Engl J Med* 2013;368:1279-90.
- Tang WH, Hazen SL. The gut microbiome and its role in cardiovascular diseases. *Circulation* 2017; 135:1008-10.
- Cerf-Bensussan N, Gaboriau-Routhiau V. The immune system and the gut microbiota: friends or foes? *Nat Rev Immunol* 2010;10:735-44.
- Lloyd-Price J, Abu-Ali G, Huttenhower C. The healthy human microbiome. *Genome Med* 2016;8: 51.
- Lloyd-Price J, Mahurkar A, Rahnavard G, et al. Strains, functions and dynamics in the expanded Human Microbiome Project. *Nature* 2017;550: 61-6.
- Lax S, Smith DP, Hampton-Marcell J, et al. Longitudinal analysis of microbial interaction between humans and the indoor environment. *Science*, 2014 (345), pp. 1048-52.
- Robertson RC, Manges AR, Finlay BB, Prendergast AJ. The human microbiome and child growth - first 1000 days and beyond. *Trends Microbiol* 2019;27:131-47.
- Forster SC, Kumar N, Anonye BO, et al. A human gut bacterial genome and culture collection for improved metagenomic analyses. *Nat Biotechnol* 2019;37:186-92.
- Zou Y, Xue W, Luo G, et al. 1,520 reference genomes from cultivated human gut bacteria enable functional microbiome analyses. *Nat Biotechnol* 2019;37:179-85.
- Lagier JC, Khelaifa S, Alou MT, et al. Culture of previously uncultured members of the human gut microbiota by culturomics. *Nat Microbiol* 2016;1: 16203.
- Lefterova MI, Suarez CJ, Banaei N, Pinsky BA. Next-generation sequencing for infectious disease diagnosis and management: a report of the Association for Molecular Pathology. *J Mol Diagn* 2015; 17:623-34.
- Pasolli E, Asnicar F, Manara S, et al. Extensive unexplored human microbiome diversity revealed by over 150,000 genomes from metagenomes spanning age, geography, and lifestyle. *Cell* 2019; 176:649-662 e20.
- Cao Y, Fanning S, Proos S, Jordan K, Srikumar S. A review on the applications of next generation sequencing technologies as applied to food-related microbiome studies. *Front Microbiol* 2017;8:1829.
- Neville BA, Forster SC, Lawley TD. Commensal Koch's postulates: establishing causation in human microbiota research. *Curr Opin Microbiol* 2018;42: 47-52.
- Vonaesch P, Anderson M, Sansonetti PJ. Pathogens, microbiome and the host: emergence of the ecological Koch's postulates. *FEMS Microbiol Rev* 2018;42:273-92.
- Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 2009;457:480-4.
- 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;444:1027-31.
- Gregory JC, Buffa JA, Org E, et al. Transmission of atherosclerosis susceptibility with gut microbial transplantation. *J Biol Chem* 2015;290: 5647-60.
- 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:e02481.
- Li J, Zhao F, Wang Y, et al. Gut microbiota dysbiosis contributes to the development of hypertension. *Microbiome* 2017;5:14.
- Durgan DJ, Ganesh BP, Cope JL, et al. Role of the gut microbiome in obstructive sleep apnea-induced hypertension. *Hypertension* 2016;67: 469-74.
- Mell B, Jala VR, Mathew AV, et al. Evidence for a link between gut microbiota and hypertension in the Dahl rat. *Physiol Genomics* 2015;47:187-97.
- Zhu W, Gregory JC, Org E, et al. Gut microbial metabolite TMAO enhances platelet hyperreactivity thrombosis risk. *Cell* 2016;165:111-24.
- Xu KY, Xia GH, Lu JQ, et al. Impaired renal function and dysbiosis of gut microbiota contribute to increased trimethylamine-N-oxide in chronic kidney disease patients. *Sci Rep* 2017;7: 1445.
- Ussar S, Griffin NW, Bezy O, et al. Interactions between gut microbiota, host genetics and diet

- modulate the predisposition to obesity and metabolic syndrome. *Cell Metab* 2015;22:516-30.
27. Zhang L, Bahl MI, Roager HM, et al. Environmental spread of microbes impacts the development of metabolic phenotypes in mice transplanted with microbial communities from humans. *ISME J* 2017;11:676-90.
28. Vrieze A, Van Nood E, Holleman F, et al. Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. *Gastroenterology* 2012;143:913-916 e7.
29. Kasselmann LJ, Vernice NA, DeLeon J, Reiss AB. The gut microbiome and elevated cardiovascular risk in obesity and autoimmunity. *Atherosclerosis* 2018;271:203-13.
30. Lavelle A, Lennon G, O'Sullivan O, et al. Spatial variation of the colonic microbiota in patients with ulcerative colitis and control volunteers. *Gut* 2015;64:155-61.
31. Koren O, Spor A, Felin J, et al. Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108 Suppl 1: 4592-8.
32. Emoto T, Yamashita T, Sasaki N, et al. Analysis of gut microbiota in coronary artery disease patients: a possible link between gut microbiota and coronary artery disease. *J Atheroscler Thromb* 2016;23:908-21.
33. Jie Z, Xia H, Zhong SL, et al. The gut microbiome in atherosclerotic cardiovascular disease. *Nat Commun* 2017;8:845.
34. Andraws R, Berger JS, Brown DL. Effects of antibiotic therapy on outcomes of patients with coronary artery disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA* 2005;293:2641-7.
35. Lindskog Jonsson A, Hallenius FF, Akrami R, et al. Bacterial profile in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 2017;263:177-83.
36. Luedde M, Winkler T, Heinsen FA, et al. Heart failure is associated with depletion of core intestinal microbiota. *ESC Heart Fail* 2017;4:282-90.
37. Mamic P, Heidenreich PA, Hedlin H, Tennakoon L, Staudenmayer KL. Hospitalized patients with heart failure and common bacterial infections: a nationwide analysis of concomitant clostridium difficile infection rates and in-hospital mortality. *J Cardiac Fail* 2016;22:891-900.
38. Sandek A, Bauditz J, Swidsinski A, et al. Altered intestinal function in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:1561-9.
39. Sandek A, Bjarnason I, Volk HD, et al. Studies on bacterial endotoxin and intestinal absorption function in patients with chronic heart failure. *Int J Cardiol* 2012;157:80-5.
40. Pasini E, Aquilani R, Testa C, et al. Pathogenic gut flora in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol HF* 2016;4:220-7.
41. Cui X, Ye L, Li J, et al. Metagenomic and metabolomic analyses unveil dysbiosis of gut microbiota in chronic heart failure patients. *Sci Rep* 2018;8:635.
42. Kamo T, Akazawa H, Suda W, et al. Dysbiosis and compositional alterations with aging in the gut microbiota of patients with heart failure. *PLoS One* 2017;12:e0174099.
43. Kummel M, Mayerhofer CCK, Vestad B, et al. Gut microbiota signature in heart failure defined from profiling of 2 independent cohorts. *J Am Coll Cardiol* 2018;71:1184-6.
44. Karlsson FH, Tremaroli V, Nookaew I, et al. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature* 2013;498:99-103.
45. Qin J, Li Y, Cai Z, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* 2012;490:55-60.
46. Forslund K, Hildebrand F, Nielsen T, et al. Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota. *Nature* 2015;528:262-6.
47. Shin NR, Lee JC, Lee HY, et al. An increase in the *Akkermansia* spp. population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in diet-induced obese mice. *Gut* 2014;63:727-35.
48. Pedersen HK, Gudmundsdottir V, Nielsen HB, et al. Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity. *Nature* 2016;535:376-81.
49. Zeevi D, Korem T, Zmora N, et al. Personalized nutrition by prediction of glycemic responses. *Cell* 2015;163:1079-94.
50. Wilck N, Matus MG, Kearney SM, et al. Salt-responsive gut commensal modulates TH17 axis and disease. *Nature* 2017;551:585-9.
51. Lam V, Su J, Koprowski S, et al. Intestinal microbiota determine severity of myocardial infarction in rats. *FASEB J* 2012;26:1727-35.
52. Gan XT, Ettinger G, Huang CX, et al. Probiotic administration attenuates myocardial hypertrophy and heart failure after myocardial infarction in the rat. *Circ Heart Fail* 2014;7:491-9.
53. David LA, Maurice CF, Carmody RN, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* 2014;505:559-63.
54. Khalesi S, Bellissimo N, Vandelanotte C, Williams S, Stanley D, Irwin C. A review of probiotic supplementation in healthy adults: helpful or hype? *Eur J Clin Nutr* 2019;73:24-37.
55. Cicero AFG, Colletti A, Bajraktari G, et al. Lipid-lowering nutraceuticals in clinical practice: position paper from an International Lipid Expert Panel. *Nutr Rev* 2017;75:731-67.
56. Scott KP, Gratz SW, Sheridan PO, Flint HJ, Duncan SH. The influence of diet on the gut microbiota. *Pharmacol Res* 2013;69:52-60.
57. Scalbert A, Brennan L, Manach C, et al. The food metabolome: a window over dietary exposure. *Am J Clin Nutr* 2014;99:1286-308.
58. Ohira H, Tsutsui W, Fujioka Y. Are short chain fatty acids in gut microbiota defensive players for inflammation and atherosclerosis? *J Atheroscler Thromb* 2017;24:660-72.
59. Larsen N, Vogensen FK, van den Berg FW, et al. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS One* 2010;5:e9085.
60. Donohoe DR, Garge N, Zhang X, et al. The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. *Cell Metab* 2011;13:517-26.
61. Donohoe DR, Wali A, Brylawski BP, Bultman SJ. Microbial regulation of glucose metabolism and cell-cycle progression in mammalian colonocytes. *PLoS One* 2012;7: e46589.
62. Vrieze A, Out C, Fuentes S, et al. Impact of oral vancomycin on gut microbiota, bile acid metabolism, and insulin sensitivity. *J Hepatol* 2014;60: 824-31.
63. Pluznick JL. Renal and cardiovascular sensory receptors and blood pressure regulation. *Am J Physiol Renal Physiol* 2013;305:F439-44.
64. Pluznick JL, Protzko RJ, Gevorgyan H, et al. Olfactory receptor responding to gut microbiota-derived signals plays a role in renin secretion and blood pressure regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110:4410-5.
65. Natarajan N, Hori D, Flavahan S, et al. Microbial short chain fatty acid metabolites lower blood pressure via endothelial G protein-coupled receptor 41. *Physiol Genomics* 2016;48:826-34.
66. Pluznick JL, Zou DJ, Zhang X, et al. Functional expression of the olfactory signaling system in the kidney. *Proc Natl Acad Sci US A* 2009;106:2059-64.
67. Tang TWH, Chen HC, Chen CY, et al. Loss of gut microbiota alters immune system composition and cripples postinfarction cardiac repair. *Circulation* 2019;139:647-59.
68. Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB, Bajaj JS. Bile acids and the gut microbiome. *Curr Opin Gastroenterol* 2014;30:332-8.
69. Kim I, Ahn SH, Inagaki T, et al. Differential regulation of bile acid homeostasis by the farnesoid X receptor in liver and intestine. *J Lipid Res* 2007;48:2664-72.
70. Begley M, Gahan CG, Hill C. The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol Rev* 2005;29:625-51.
71. Ubeda M, Lario M, Munoz L, et al. Obeticholic acid reduces bacterial translocation and inhibits intestinal inflammation in cirrhotic rats. *J Hepatol* 2016;64:1049-57.
72. Wu GD, Chen J, Hoffmann C, et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*, 2011 (334), pp. 105-8.
73. Kasahara K, Krautkramer KA, Org E, et al. Interactions between *Roseburia intestinalis* and diet modulate atherogenesis in a murine model. *Nat Microbiol* 2018;3:1461-71.
74. Lindskog Jonsson A, Caesar R, Akrami R, et al. Impact of gut microbiota and diet on the development of atherosclerosis in ApoE(-/-) mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2018;38:2318-26.
75. Wang Z, Klipfeller E, Bennett BJ, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature* 2011;472:57-63.
76. Tang WH, Shrestha K, Wang Z, Troughton RW, Klein AL, Hazen SL. Diminished global arginine bioavailability as a metabolic defect in chronic systolic heart failure. *J Cardiac Fail* 2013;19:87-93.
77. Li XS, Wang Z, Cajka T, et al. Untargeted metabolomics identifies trimethyllysine, a TMAO-producing nutrient precursor, as a predictor of incident cardiovascular disease risk. *JCI Insight* 2018;3:e99096.
78. Rath S, Heidrich B, Pieper DH, Vital M. Uncovering the trimethylamine-producing bacteria of the human gut microbiota. *Microbiome* 2017; 5:54.
79. Koeth RA, Wang Z, Levison BS, et al. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med* 2013;19:576-85.
80. Bennett BJ, de Aguiar Vallim TQ, Wang Z, et al. Trimethylamine-N-oxide, a metabolite associated with atherosclerosis, exhibits complex

- genetic and dietary regulation. *Cell Metab* 2013;17:49-60.
- 81.** Hartiala J, Bennett BJ, Tang WH, 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;34:1307-13.
- 82.** Warrior M, Shih DM, Burrows AC, et al. The TMAO-generating enzyme flavin monooxygenase 3 is a central regulator of cholesterol balance. *Cell Rep* 2015;10:326-38.
- 83.** Humbert JA, Hammond KB, Hathaway WE. Trimethylaminuria: the fish-odour syndrome. *Lancet* 1970;2:770-1.
- 84.** 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;10:e0143731.
- 85.** Thomas JM, Alexander M. Microbial formation of secondary and tertiary amines in municipal sewage. *Appl Environ Microbiol* 1981;42:461-3.
- 86.** Tang WH, Kitai T, Hazen SL. Gut microbiota in cardiovascular health and disease. *Circ Res* 2017;120:1183-96.
- 87.** Skye SM, Zhu W, Romano KA, et al. Microbial transplantation with human gut commensals containing CutC is sufficient to transmit enhanced platelet reactivity and thrombosis potential. *Circ Res* 2018;123:1164-76.
- 88.** Tang WH, Wang Z, Levison BS, et al. Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2013;368:1575-84.
- 89.** Wang Z, Tang WH, Buffa JA, et al. Prognostic value of choline and betaine depends on intestinal microbiota-generated metabolite trimethylamine-N-oxide. *Eur Heart J* 2014;35:904-10.
- 90.** Tang WH, Wang Z, Fan Y, 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;64:1908-14.
- 91.** Tang WH, Wang Z, Li XS, et al. Increased trimethylamine N-oxide portends high mortality risk independent of glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Chem* 2017;63:297-306.
- 92.** Senthong V, Wang Z, Fan Y, Wu Y, Hazen SL, Tang WH. Trimethylamine N-oxide and mortality risk in patients with peripheral artery disease. *J Am Heart Assoc* 2016;5:e004237.
- 93.** Tang WH, Wang Z, Kennedy DJ, 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.
- 94.** Senthong V, Wang Z, Li XS, 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:e002816.
- 95.** Li XS, Obeid S, Klingenberg R, 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.
- 96.** Sheng Z, Tan Y, Liu C, et al. Relation of circulating trimethylamine N-oxide with coronary atherosclerotic burden in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2019;123:894-8.
- 97.** Tan Y, Sheng Z, Zhou P, et al. Plasma trimethylamine N-oxide as a novel biomarker for plaque rupture in patients with ST-segment-elevation myocardial infarction. *Circ Cardiovasc Interv* 2019;12:e007281.
- 98.** Yu D, Shu XO, Rivera ES, et al. Urinary levels of trimethylamine-N-oxide and incident coronary heart disease: a prospective investigation among urban Chinese adults. *J Am Heart Assoc* 2019;8:e010606.
- 99.** Senthong V, Li XS, Hudec T, et al. Plasma trimethylamine N-oxide, a gut microbe-generated phosphatidylcholine metabolite, is associated with atherosclerotic burden. *J Am Coll Cardiol* 2016;67:2620-8.
- 100.** 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;6.
- 101.** Qi J, You T, Li J, et al. 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;22:185-94.
- 102.** Schiattarella GG, Sannino A, Toscano E, et al. Gut microbe-generated metabolite trimethylamine-N-oxide as cardiovascular risk biomarker: a systematic review and dose-response meta-analysis. *Eur Heart J* 2017;38:2948-56.
- 103.** Kaysen GA, Johansen KL, Chertow GM, et al. Associations of trimethylamine N-oxide with nutritional and inflammatory biomarkers and cardiovascular outcomes in patients new to dialysis. *J Ren Nutr* 2015;25:351-6.
- 104.** Stubbs JR, Stedman MR, Liu S, et al. Trimethylamine N-oxide and cardiovascular outcomes in patients with end-stage kidney disease receiving maintenance hemodialysis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2019 [E-pub ahead of print].
- 105.** Borges NA, Stenvinkel P, Bergman P, et al. Effects of probiotic supplementation on trimethylamine-N-oxide plasma levels in hemodialysis patients: a pilot study. *Probiotics Antimicrob Proteins* 2018 [E-pub ahead of print].
- 106.** Seldin MM, Meng Y, Qi H, et al. Trimethylamine N-oxide promotes vascular inflammation through signaling of mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappaB. *J Am Heart Assoc* 2016;5:e002767.
- 107.** Boini KM, Hussain T, Li PL, Koka S. Trimethylamine-N-oxide instigates NLRP3 inflammasome activation and endothelial dysfunction. *Cell Physiol Biochem* 2017;44:152-62.
- 108.** Chen ML, Zhu XH, Ran L, Lang HD, Yi L, Mi MT. Trimethylamine-N-Oxide induces vascular inflammation by activating the NLRP3 inflammasome through the SIRT3-SOD2-mtROS signaling pathway. *J Am Heart Assoc* 2017;6:e006347.
- 109.** Brunt VE, Gioscia-Ryan RA, Richey JJ, et al. Suppression of the gut microbiome ameliorates age-related arterial dysfunction and oxidative stress in mice. *J Physiology* 2019 [E-pub ahead of print].
- 110.** Zhu W, Buffa JA, Wang Z, et al. Flavin monooxygenase 3, the host hepatic enzyme in the metaorganismal trimethylamine N-oxide-generating pathway, modulates platelet responsiveness and thrombosis risk. *J Thromb Haemost* 2018;16:1857-72.
- 111.** Zhu W, Wang Z, Tang WHW, Hazen SL. Gut microbe-generated trimethylamine N-oxide from dietary choline is prothrombotic in subjects. *Circulation* 2017;135:1671-3.
- 112.** Rhee EP, Clish CB, Ghorbani A, et al. A combined epidemiologic and metabolomic approach improves CKD prediction. *J Am Soc Nephrol* 2013;24:1330-8.
- 113.** Johnson C, Prokopenko AJ, West RE 3rd, Nolin TD, Stubbs JR. Decreased kidney function is associated with enhanced hepatic flavin monooxygenase activity and increased circulating trimethylamine N-Oxide concentrations in mice. *Drug Metab Dispos* 2018;46:1304-9.
- 114.** Suzuki T, Heaney LM, Bhandari SS, Jones DJ, Ng LL. Trimethylamine N-oxide and prognosis in acute heart failure. *Heart* 2016;102:841-8.
- 115.** Tang WH, Wang Z, Shrestha K, et al. Intestinal microbiota-dependent phosphatidylcholine metabolites, diastolic dysfunction, and adverse clinical outcomes in chronic systolic heart failure. *J Cardiac Fail* 2015;21:91-6.
- 116.** Troseid M, Ueland T, Hov JR, et al. Microbiota-dependent metabolite trimethylamine-N-oxide is associated with disease severity and survival of patients with chronic heart failure. *J Intern Med* 2015;277:717-26.
- 117.** Organ CL, Otsuka H, Bhushan S, et al. Choline diet and its gut microbe-derived metabolite, trimethylamine N-oxide, exacerbate pressure overload-induced heart failure. *Circ Heart Fail* 2016;9:e002314.
- 118.** Koeth RA, Levison BS, Culley MK, et al. gamma-Butyrobetaine is a proatherogenic intermediate in gut microbial metabolism of L-carnitine to TMAO. *Cell Metab* 2014;20:799-812.
- 119.** Koeth RA, Lam-Galvez BR, Kirsop J, et al. L-Carnitine in omnivorous diets induces an atherogenic gut microbial pathway in humans. *J Clin Invest* 2019;129:373-87.
- 120.** Koh A, Molinaro A, Stahlman M, et al. Microbially produced imidazole propionate impairs insulin signaling through mTORC1. *Cell* 2018;175:947-961 e17.
- 121.** Wang Z, Bergeron N, Levison BS, et al. Impact of chronic dietary red meat, white meat, or nonmeat protein on trimethylamine N-oxide metabolism and renal excretion in healthy men and women. *Eur Heart J* 2019;40:583-94.
- 122.** Fukami K, Yamagishi S, Sakai K, et al. Oral L-carnitine supplementation increases trimethylamine-N-oxide but reduces markers of vascular injury in hemodialysis patients. *J Cardiovasc Pharmacol* 2015;65:289-95.
- 123.** Miller MJ, Bostwick BL, Kennedy AD, et al. Chronic oral L-carnitine supplementation drives marked plasma TMAO elevations in patients with organic acemias despite dietary meat restrictions. *JIMD Rep* 2016;30:39-44.
- 124.** Boutagy NE, Neilson AP, Osterberg KL, et al. Probiotic supplementation and trimethylamine-N-oxide production following a high-fat diet. *Obesity (Silver Spring)* 2015;23:2357-63.
- 125.** Li DY, Wang Z, Li XS, Hazen SL, Tang WH. Relationship between statin use and trimethylamine N-oxide in cardiovascular risk assessment (abstract). *J Am Coll Cardiol* 2018;71:A115.

126. Vallance HD, Koochin A, Branov J, et al. Marked elevation in plasma trimethylamine-N-oxide (TMAO) in patients with mitochondrial disorders treated with oral L-carnitine. *Mol Genet Metab Rep* 2018;15:130-3.
127. Smits LP, Kootte RS, Levin E, et al. Effect of vegan fecal microbiota transplantation on carnitine- and choline-derived trimethylamine-N-oxide production and vascular inflammation in patients with metabolic syndrome. *J Am Heart Assoc* 2018;7.
128. Kruger R, Merz B, Rist MJ, et al. Associations of current diet with plasma and urine TMAO in the KarMeN study: direct and indirect contributions. *Mol Nutr Food Res* 2017;61. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700363>.
129. Cho CE, Taesuwan S, Malysheva OV, et al. 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;61. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600324>.
130. Lajous M, Willett WC, Robins J, et al. Changes in fish consumption in midlife and the risk of coronary heart disease in men and women. *Am J Epidemiol* 2013;178:382-91.
131. Mozaffarian D, Lemaitre RN, Kuller LH, et al. Cardiac benefits of fish consumption may depend on the type of fish meal consumed: the Cardiovascular Health Study. *Circulation* 2003;107:1372-7.
132. Yazdekhesti N, Brandsch C, Schmidt N, et al. Fish protein increases circulating levels of trimethylamine-N-oxide and accelerates aortic lesion formation in apoE null mice. *Mol Nutr Food Res* 2016;60:358-68.
133. Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. Dietary Reference Values for choline. *EFSA J* 2016;14:e04484.
134. Erickson ML, Malin SK, Wang Z, Brown JM, Hazen SL, Kirwan JP. Effects of lifestyle intervention on plasma trimethylamine N-oxide in obese adults. *Nutrients* 2019;11:pii: E179.
135. Washburn RL, Cox JE, Muhlestein JB, et al. Pilot study of novel intermittent fasting effects on metabolomic and trimethylamine N-oxide changes during 24-hour water-only fasting in the FEELGOOD trial. *Nutrients* 2019;11:pii: E246.
136. Craciun S, Balskus EP. Microbial conversion of choline to trimethylamine requires a glycol radical enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109:21307-12.
137. Zhu Y, Jameson E, Crosatti M, et al. Carnitine metabolism to trimethylamine by an unusual Rieske-type oxygenase from human microbiota. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014;111:4268-73.
138. Wang Z, Roberts AB, Buffa JA, et al. Nonlethal inhibition of gut microbial trimethylamine production for the treatment of atherosclerosis. *Cell* 2015;163:1585-95.
139. De Filippis F, Pellegrini N, Vannini L, et al. High-level adherence to a Mediterranean diet beneficially impacts the gut microbiota and associated metabolome. *Gut* 2016;65:1812-21.
140. Guasch-Ferre M, Hu FB, Ruiz-Canela M, et al. Plasma metabolites from choline pathway and risk of cardiovascular disease in the PREDIMED (Prevention With Mediterranean Diet) study. *J Am Heart Assoc* 2017;6:e006524.
141. Pignanelli M, Just C, Bogiatzi C, et al. Mediterranean diet score: associations with metabolic products of the intestinal microbiome, carotid plaque burden, and renal function. *Nutrients* 2018;10.
142. Roberts AB, Gu X, Buffa JA, et al. Development of a gut microbe-targeted nonlethal therapeutic to inhibit thrombosis potential. *Nat Med* 2018;24:1407-17.
143. Segata N, Waldron L, Ballarini A, et al. Metagenomic microbial community profiling using unique clade-specific marker genes. *Nat Methods* 2012;9:811-4.
144. Morgan XC, Huttenhower C. Chapter 12: Human microbiome analysis. *PLoS Comput Biol* 2012;8:e1002808.
145. Karlsson FH, Fak F, Nookaew I, et al. Symptomatic atherosclerosis is associated with an altered gut metagenome. *Nat Commun* 2012;3:1245.
146. Dinakaran V, Rathinavel A, Pushpanathan M, Sivakumar R, Gunasekaran P, Rajendhran J. Elevated levels of circulating DNA in cardiovascular disease patients: metagenomic profiling of microbiome in the circulation. *PLoS One* 2014;9:e105221.
147. Yin J, Liao SX, He Y, et al. Dysbiosis of gut microbiota with reduced trimethylamine-N-oxide level in patients with large-artery atherosclerotic stroke or transient ischemic attack. *J Am Heart Assoc* 2015;4:e002699.
148. Feng Q, Liu Z, Zhong S, et al. Integrated metabolomics and metagenomics analysis of plasma and urine identified microbial metabolites associated with coronary heart disease. *Sci Rep* 2016;6:22525.

PALAVRAS-CHAVE disbiose, microbiota intestinal, ácidos biliares secundários, ácidos graxos de cadeia curta, N-óxido de trimetilamina