



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

ANÁLISIS DEL MICROBIOMA ORAL Y SU CORRELACIÓN CON EL PERFIL
INFLAMATORIO EN PACIENTES CON INFARTO AGUDO AL MIOCARDIO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

PAULINA HERNÁNDEZ RUIZ

DIRECTOR DE TESIS

DRA. MARÍA MAGDALENA AGUIRRE GARCÍA
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR

DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL
FACULTAD DE MEDICINA

DR. ROLANDO EFRAÍN HERNÁNDEZ MUÑOZ
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

CIUDAD DE MÉXICO, NOVIEMBRE DE 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Índice

Agradecimientos	Pág. 2
Lista de abreviaturas	Pág. 3
Resumen en español	Pág. 4
Resumen en inglés (Abstract)	Pág. 5
1. Introducción	Pág. 6
1.1 Generalidades de infarto agudo al miocardio	Pág. 7
1.2 Generalidades del análisis de microbioma	
1.2.1 Secuenciación masiva por amplicones del gen 16s rRNA	Pág. 12
1.2.2 Diversidad del microbioma	Pág. 14
1.3 Microbioma oral en estado de salud	Pág. 14
1.4 Disbiosis del microbioma oral y su relación con enfermedad periodontal	Pág. 16
1.5 Disbiosis oral en enfermedades cardiovasculares	Pág. 19
1.6 Metabolitos y sub-productos bacterianos asociados al microbioma	Pág. 23
2. Diseño experimental	
Justificación	Pág. 28
Hipótesis	Pág. 29
Objetivos	Pág. 30
Criterios de selección	Pág. 31
3. Métodos	
3.1 Selección de sujetos de estudio	Pág. 32
3.2 Determinación de la evaluación periodontal	Pág. 33
3.3 Obtención de muestras biológicas	Pág. 34
3.4 Aislamiento de DNA de la muestra de placa supragingival	Pág. 34
3.5 Secuenciación genómica	Pág. 35
3.6 Análisis de los datos del 16s	Pág. 35
3.7 Cuantificación de citocinas	Pág. 37
3.8 Cuantificación de N-óxido de trimetilamina	Pág. 38
3.9 Cuantificación de lipopolisacárido	Pág. 38
3.10 Análisis estadístico	Pág. 39
4. Resultados	
4.1 Sujetos de estudio	Pág. 40
4.2 Análisis metagenómico	Pág. 44
4.3 Concentración de citocinas	Pág. 57
4.4 Concentración de N-óxido de trimetilamina	Pág. 60
4.5 Cuantificación de lipopolisacárido	Pág. 61
4.6 Análisis de correlación de la diversidad del microbioma oral y marcadores bioquímicos	
4.6.1 Correlación entre género bacterianos y citocinas	Pág. 63
4.6.2 Correlación entre el microbioma oral, marcadores bioquímicos y el N-óxido de trimetilamina	Pág. 65
4.6.3 Correlación de N-óxido de trimetilamina y lipopolisacárido con citocinas	Pág. 66
4.6.4 Correlación entre el N-óxido de trimetilamina y marcadores bioquímicos	Pág. 67
5. Discusión	Pág. 68
6. Limitaciones	Pág. 77
7. Conclusión	Pág. 78
Bibliografía	Pág. 79
Anexos	Pág. 88

Los logros son resultado de la perseverancia
que motivan las personas que nos construyen, aman,
nos acompañan y confían en nosotros.

Agradecimientos

Dirijo el presente agradecimiento al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, al apoyo proporcionado por CONAHCyT (número de becario 737874); así como a los financiamientos otorgados por DGAPA-PAPIIT (IN218619 y IN212422) para la realización del presente estudio.

Hago un reconocimiento a mi tutora principal, la Dra. María Magdalena Aguirre García y al comité tutor, Dra. Yolanda López Vidal, Dr. Rolando Hernández Muñoz y así como al Dr. Luis Amezcua Guerra como tutor externo, por dirigir e incentivar el aprendizaje adquirido durante la realización de este estudio. Así mismo, reconozco la valiosa contribución del profesor Amedeo Amedei, aunado a su experiencia en el estudio del microbioma.

Agradezco a la Dra. Alma Reyna Escalona Montaña por su dedicación y enseñanza en la metodología del presente trabajo.

Igualmente, extiendo mi agradecimiento a la Dra. Sandra Pinto Cardoso por su asesoría en el análisis bioinformático, y al Dr. Héctor González Pacheco por su apoyo en el reclutamiento y diagnóstico de los pacientes de este protocolo, así como el apoyo del personal del CORE-Lab, Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”.

De forma personal, mi gratitud a mi compañera Adriana Alviter con quien compartí este gran reto de aprendizaje.

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxiribonucleico
ASV	Amplicon Sequence Variants, por sus siglas en inglés
CPO	Índice de dientes cariados, perdidos y obturados
ECV	Enfermedades cardiovasculares
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HOMD	Human Oral Microbiome Database
hs-PCR	proteína C reactiva de alta sensibilidad
IAM	Infarto agudo al miocardio
IAMCEST	Infarto agudo al miocardio con elevación del segmento ST
IAMSEST	Infarto agudo al miocardio sin elevación del segmento ST
IFN γ	Interferón gamma
IL	Interleucina
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LEfSe	Análisis de discriminación lineal con efecto de tamaño
LPS	Lipopolisacárido
MACE	Evento cardiovascular mayor adverso. Mayor adverse cardiovascular event, por sus siglas en inglés
OD	Órganos dentarios
PCoA	Análisis de componentes principales
PDB	Placa dentobacteriana
QIIME2	Quantitative Insights into Microbial Ecology 2
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
TGF β	Factor de crecimiento transformante beta
TH	Linfocitos T helper (cooperadores)
TIMI	Escala de trombolisis en infarto al miocardio. Thrombolysis in myocardial infarction score, por sus siglas en inglés
TMA	Trimetilamina
TMAO	N-óxido de trimetilamina
TNF	Factor de necrosis tumoral
UPLC-MS/MS	Cromatografía líquida acoplado a espectrómetro de masas

Resumen

La alta incidencia de las enfermedades isquémicas y el riesgo de mortalidad elevado en nuestra población, sugiere el análisis de los factores que contribuyen al establecimiento de dichos padecimientos, particularmente, el infarto agudo al miocardio. En ese sentido, se ha propuesto que la disbiosis en cavidad oral asociada al desarrollo de algún grado de enfermedad periodontal (gingivitis o periodontitis), promueve una respuesta inflamatoria y se asocia a un mayor riesgo cardiovascular en estos pacientes. Por tal motivo, en el presente estudio se analizó la diversidad de la microbiota oral asociada al estado de salud bucal en pacientes con IAM, relacionado con el grado de riesgo cardiovascular sustentado en una escala clínica basado en la inflamación sistémica, así como su influencia en la respuesta inflamatoria de estos pacientes, así como la concentración de N-óxido de trimetilamina y lipopolisacárido.

Todos los pacientes fueron diagnosticados con algún grado de enfermedad periodontal y se identificó una mayor abundancia de *Prevotella*, el cual se relacionó con la concentración de IL 6. De igual forma, se identificaron diferencias significativas en géneros como *Ottowia* y *Absconditabacteria_(SR1_[G-1])*, los cuales se encontraron en mayor abundancia en pacientes categorizados sin riesgo y gingivitis. Se observó que la concentración de N-óxido de trimetilamina presentó una correlación positiva con la presencia de *Porphyromonas*. El análisis de cuantificación de lipopolisacárido, solo fue identificado en un par de sujetos.

Finalmente, se concluyó que la diversidad de la microbiota oral contribuye en el establecimiento de una respuesta inmune en el hospedero e influye en un riesgo grave cardiovascular. Así mismo, se establece la posible participación de la microbiota oral en la disbiosis intestinal, y se sugiere establecer un análisis en prospectiva.

Abstract

The high incidence of ischemic diseases and the high mortality risk in our population suggest the analysis of the factors that contribute to the establishment of these conditions, particularly acute myocardial infarction. In this regard, it has been proposed that dysbiosis in the oral cavity associated with periodontal disease (gingivitis or periodontitis), promotes an inflammatory response, and increases cardiovascular risk in these patients. For this reason, the present study analyzed the diversity of the oral microbiota associated with oral health status in patients with acute myocardial infarction, related to the degree of cardiovascular risk based on a clinical scale based on systemic inflammation, as well as its influence on the inflammatory response in these patients, and the concentration of trimethylamine N-oxide and lipopolysaccharide.

All patients were diagnosed with some degree of periodontal disease and a higher abundance of *Prevotella* was identified, which was related to the concentration of IL 6. Similarly, significant differences were identified in genera such as *Ottowia* and *Absoconditabacteria_(SR1_[G-1])*, which were found in greater abundance in patients categorized without risk and gingivitis. It was observed that the concentration of trimethylamine N-oxide presented a positive correlation with the presence of *Porphyromonas*. The analysis of lipopolysaccharide quantification was only identified in a couple of subjects.

Finally, it was concluded that the diversity of the oral microbiota contributes to the establishment of an immune response in the host and influences a serious cardiovascular risk. Likewise, the possible participation of the oral microbiota in intestinal dysbiosis is established, and a prospective analysis is suggested.

1. Introducción

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) y la periodontitis son consideradas entre las principales causas de morbilidad en México. A nivel global, se estima que la tasa de mortalidad relacionada con ECV es del 31% (1). En México, las enfermedades cardíacas isquémicas representan la primera causa de mortalidad en hombres >60 años y la segunda causa en mujeres en el mismo rango de edad (2). En su caso, la periodontitis constituye la sexta causa en la estadística de morbilidad nacional del año 2022, siendo más frecuente en el grupo de edad de 25 a 44 años, que corresponde al 31% de los sujetos; de forma general, se diagnostica con mayor frecuencia en mujeres (65.4%) y particularmente en el grupo de edad de 25 a 44 años representa el 71.4% de los casos analizados (3). En este punto, el reporte de una cohorte de sujetos mexicanos con periodontitis y hospitalizados por padecimientos pulmonares, identificaron una prevalencia de enfermedad periodontal grave en el 25% de los sujetos, observando una mayor frecuencia en hombres (76%) con una edad promedio de 45 años (Desviación estándar \pm 16.9) (4).

Las ECV se definen como un grupo de desórdenes del tejido cardíaco y vasos sanguíneos entre ellos el infarto agudo al miocardio (IAM) (5). Por otra parte, la periodontitis es una inflamación crónica causada por microorganismos patógenos de la cavidad oral, misma que se encuentra asociada al daño del tejido conjuntivo de soporte de los órganos dentarios, provocando la pérdida de los mismos (6).

Dentro del cuerpo humano se han identificado diferentes ambientes colonizados por microorganismos. El término microbiota define el conjunto de bacterias, hongos, virus, protozoarios y arqueas que colonizan determinado ambiente (7) ; mientras que el término microbioma se refiere al complejo de moléculas producidas por estos microorganismos,

donde igualmente se considera la participación de los elementos estructurales y metabolitos (8).

La microbiota tiene diferentes funciones tales como los mecanismos de tolerancia oral, digestión y absorción de nutrientes, los cuales, al estar en equilibrio, promueven una homeostasis en el hospedero (9,10). Particularmente, se ha definido que la microbiota de la cavidad oral se compone de cerca de 700 especies bacterianas diferentes. En general, se conoce que una modificación en la diversidad de la microbiota del hospedero conocida con el término de “disbiosis”, genera una respuesta inflamatoria leve y persistente debido a que los microorganismos patógenos y sus productos tienen la capacidad de entrar a circulación(6,10,11). De forma particular, la disbiosis del microbioma oral e intestinal genera un estado de enfermedad, así como el establecimiento de una bacteremia y una respuesta inflamatoria persistente, capaz de relacionarse con la patogenia de diversos padecimientos, entre los que se encuentran las enfermedades cardiovasculares como el infarto agudo al miocardio (10).

1.1 Generalidades de infarto agudo al miocardio

El Síndrome coronario agudo comprende un conjunto de padecimientos de naturaleza isquémica, dentro de los que se identifican: la angina de pecho inestable y el infarto agudo al miocardio (IAM), donde se determinan las variantes diagnósticas provenientes de los segmentos analizados en las ondas y segmentos de los registros electrocardiográficos (onda P, el intervalo PR, el complejo QRS, el intervalo QT, el segmento ST, la onda T y la onda U); dichas variantes son IAM con elevación del segmento ST (IAMCEST) e IAM sin elevación del segmento ST (IAMSEST). Particularmente, el infarto al miocardio se define como la necrosis de fibras del músculo cardiaco debido a un periodo de isquemia

prolongado, a causa de una reducción del flujo sanguíneo, generalmente corroborado por la presencia de marcadores que indican daño tisular (12).

El protocolo de tratamiento de IAM depende del tiempo de evolución, contempla un periodo menor a 12 horas para un pronóstico favorable y consiste en una revascularización de la arteria obstruida en el menor tiempo posible. Se han referido dos tipos de tratamiento, la fibrinólisis medicamentosa como una intervención temprana en un tiempo menor a 2 horas de haberse presentado sintomatología y posteriormente, dentro de las 6 a 24 horas se indica el tratamiento de angioplastia primaria o reperfusión (13).

Se ha determinado que la patogenia del IAM no depende únicamente de la formación de una placa ateromatosa, también influye la relación de los mecanismos de la inflamación relacionados con el desarrollo de estos padecimientos; de modo que un estudio previamente publicado, mediante el análisis de biomarcadores específicos como proteína C reactiva, en conjunto con la sintomatología y la identificación del segmento ST en el registro electrocardiográfico, determina cuatro diferentes mecanismos responsables del desarrollo del IAM, los cuales son: fisura de placa ateromatosa con y sin inflamación sistémica, erosión de placa aterosclerótica e IAM sin la formación de trombo (14).

Se ha definido a la placa ateromatosa como el acúmulo de partículas de lípidos extracelulares, macrófagos con cristales de colesterol fagocitado, denominados células espumosas y células muertas acumulado en la capa íntima de la pared arterial formando un cuerpo lipídico o necrótico, misma que posee un infiltrado inflamatorio, conformado principalmente por macrófagos y linfocitos T que secretan interleucina 6 (IL 6) y factor de necrosis tumoral (TNF), favoreciendo el estado pro-inflamatorio y desarrollo de la placa. A su vez, la placa ateromatosa se encuentra rodeada por una capa fibrosa compuesta por una matriz rica en colágena y células de músculo liso. Esta capa fibrosa es susceptible a ruptura, lo cual origina la formación de trombo, resultado de la presencia del factor

activador de plaquetas y factor de crecimiento transformante β (TGF β), este último estimula a las células de músculo liso para producción de matriz extracelular (15).

El estado inflamatorio tiene repercusión sobre la estabilidad de la placa aterosclerótica, esto se debe a la presencia de linfocitos TH1 secretores de interferón γ (IFN γ) el cual inhibe la producción de matriz extracelular, provocando una inestabilidad de la placa. Así mismo, los macrófagos tipo 2 secretan metaloproteinasas 1,8 y 13, responsables de la ruptura del colágeno intersticial. Por otro lado, el efecto de la interleucina 4 (IL 4) sobre los linfocitos TH2 y macrófagos tipo 1 promueven la secreción de interleucina 10 (IL 10) y factor de crecimiento transformante β (TGF β) que induce la reparación de los tejidos. Es importante resaltar, que la diferenciación entre macrófagos tipo 1 y 2, se debe a la presencia de mediadores como resolvinas, lipoxinas, maresinas y protectinas (15).

El análisis de biomarcadores inflamatorios como albúmina y proteína C reactiva, así como la cuantificación de leucocitos, ha permitido determinar el mecanismo de inflamación asociado al IAM y la repercusión que tiene sobre el manejo clínico y pronóstico de este padecimiento. Tal es el caso del estudio sobre una cohorte validada de 7,396 pacientes diagnosticados con IAM, el cual determina un puntaje y clasificación del proceso inflamatorio, basados en parámetros de biomarcadores principalmente, proteína C reactiva, albúmina y leucocitos. Los resultados de dicha clasificación lograron determinar cuatro distintos grados riesgo de acuerdo a la inflamación, de nula a grave; siendo este último, el que mayor índice de mortalidad hospitalaria presenta (16). Es necesario considerar esta categoría de inflamación sistémica, ya que esta escala será utilizada para la estandarización de los grupos de estudio del presente protocolo, misma que se resume en la tabla 1:

Tabla 1. Escala clínica de riesgo basada en la inflamación sistémica

<i>Sin riesgo</i>	<i>Leve</i>	<i>Moderada</i>	<i>Grave</i>
3 marcadores por debajo del umbral	a) Leucocitos ≥ 9.3	a) Albúmina ≤ 3.6	a) hs-PCR* ≥ 13.0 y Albúmina ≤ 3.6
	b) hs-PCR* ≥ 13.0	b) Leucocitos ≥ 9.3 y hs-PCR* ≥ 13.0	b) 3 marcadores presentes
		c) Leucocitos ≥ 9.3 y Albúmina ≤ 3.6	

Leucocitos (x103/ μ l), *hs-PCR- proteína C reactiva de alta sensibilidad (mg/L), albúmina (g/dL) (16).

Se ha determinado la relación causal entre el estado inflamatorio y la tasa de mortalidad en pacientes con enfermedades cardiovasculares, mismo que se encuentra relacionado con un rango de edad avanzada. Tal es el caso de la cohorte donde se demostró que el bloqueo de IL 1 β , redujo el riesgo de eventos cardiovasculares recurrentes en sujetos mayores de 60 años (17). Por otra parte, se ha considerado que niveles elevados de IL 6 en plasma se encuentra relacionado con aterosclerosis relacionada con la edad, esto debido a la senescencia de las células inmunes (18). Otro factor que contribuye al estado inflamatorio se debe a la activación de los receptores tipo Toll 4 mediado por una disbiosis en la microbiota intestinal relacionada con la edad avanzada, provocando la diferenciación de células Stem hematopoyéticas hacia un linaje mieloide; esta diferenciación se encuentra asociado a altos niveles de IL 6 que contribuye al desarrollo de aterosclerosis (19).

Recientemente, se ha descrito la influencia de los factores de riesgo modificables estándar en la tasa de mortalidad de los pacientes con IAM, que incluyen hipertensión, hipercolesterolemia, diabetes y tabaquismo, y aquellos pacientes sin estos factores tradicionales (20); estos últimos representan la tasa de mortalidad más alta y está asociada a un IAMCEST, previamente definido (21). Además, se han considerado otros

factores de riesgo modificables independientes, como los factores psicosociales, la ingesta de alcohol, la inactividad física y la dieta (22).

Como anteriormente se mencionó, además de la escala clínica de riesgo basado en la inflamación sistémica, los médicos disponen de diversas evaluaciones de estratificación de riesgo de los sujetos con IAM, tales como la clase Killip Kimball, basada en el análisis de 250 sujetos con IAM, donde se predice el estado de la enfermedad coronaria, la mortalidad intra-hospitalaria y el pronóstico a 6 meses; se analizan 4 clases, donde se detalla la clase I: pacientes sin signos de falla cardiaca, clase II: falla cardiaca moderada, clase III: edema pulmonar y clase IV: choque cardiogénico (23). Por su parte, la escala GRACE (por sus siglas en inglés, Global Registry of Acute Coronary Events), identifica el riesgo de moratidad basado en parámetros como: edad, tensión arterial, frecuencia cardiaca, marcadores de daño cardiaco, creatina sérica, clase Killip y hallazgos electrocardiográficos (24). Finalmente, la escala TIMI (Thrombolysis in myocardial infarction, por sus siglas en inglés), determina diversos factores como: edad mayor o igual a 65, enfermedad coronaria conocida, administración de ácido acetilsalicílico en los últimos 7 días, cambios en el electrocardiograma y marcadores de daño cardiaco; todo ello con el fin de predecir la gravedad de la enfermedad arterial coronaria, la carga trombótica y el flujo en las arterias coronarias; dicha escala se puede categorizar en bajo, intermedio y alto (25).

1.2 Generalidades del análisis del microbioma

1.2.1 Secuenciación masiva por amplicones del gen 16s rRNA

La aplicación de las técnicas de secuenciación masiva por amplicones del gen 16s rRNA ha contribuido a la identificación taxonómica de la microbiota bacteriana (26, 27). Esta técnica se basa en el hecho de que las secuencias altamente conservadas del gen 16s rRNA son específicas y varía entre las especies bacterianas; se produce con una secuencia de ADN amplificada mediante el uso de iniciadores universales de las regiones conservadas (28). El gen 16s rRNA tiene un tamaño de ~1500pb y posee 9 regiones hipervariables (V1-V9), las cuales, al ser analizadas pueden lograr la identificación taxonómica adecuada a nivel de género con una identidad >97%. La elección de las diferentes subregiones se puede realizar de forma individual o agrupada y debe considerarse de acuerdo al objetivo particular del estudio, ya que se ha determinado que los resultados obtenidos son variables con respecto a la identidad taxonómica; así mismo, las regiones más analizadas son V3-V4 de 174 y 291 pares de bases respectivamente y, a pesar que se ha definido el análisis completo de las 9 regiones como el más óptimo, existen regiones altamente informativas en la clasificación taxonómica como las regiones V1- V3 (29, 30).

La secuenciación de nueva generación contempla diversas tecnologías, entre ellos la secuenciación por síntesis en plataformas como Illumina (Novaseq6000), la cual desarrolla el análisis de secuencias pareadas de fragmentos de 250 pares de bases. Este tipo de tecnologías permiten la obtención de datos en gran volumen que requieren un análisis bioinformático y estadístico que establezcan conclusiones significativas desde un punto de vista biológico o clínico; para ello, se tienen herramientas de cómputo capaces de analizar estos datos a gran escala. El análisis bioinformático en el presente protocolo se basó en el software QIIME2, el cual tiene entre sus herramientas, la definición de la

calidad Phred de las secuencias en un rango Q10 a Q40, el cual determina la probabilidad de error en las bases de 1 entre 10 hasta 1 base errónea entre 10,000. De igual forma, las secuencias son importadas con el fin de generar secuencias representativas de ASV's (Amplicon Sequence Variants, por sus siglas en inglés), las cuales determinan la asignación taxonómica, así como el cálculo de la diversidad alfa y beta estimada y la ejecución de análisis multivariado. La figura 1 representa el flujo que indica el análisis de secuencias por plataforma QIIME2 (26, 31).

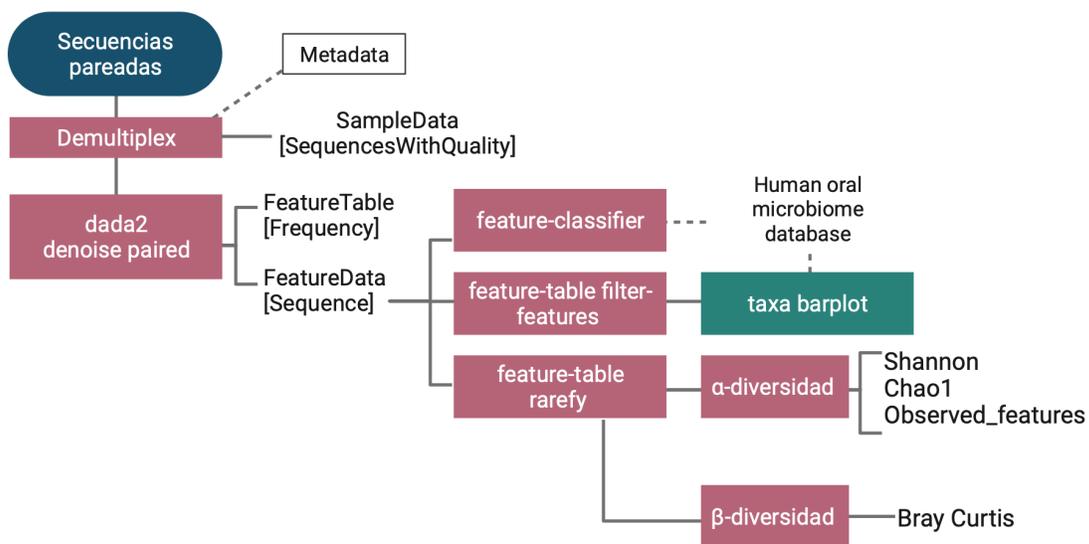


Figura 1. Diagrama de flujo de trabajo del análisis bioinformático ejecutados en plataforma QIIME2.2022.2. Etiqueta de color azul refiere el tipo de archivos importados para el análisis. Etiquetas de color rosa refiere los métodos aplicados. Etiqueta verde refiere el archivo de visualización.

1.2.2 Diversidad del microbioma

La diversidad se define como una medida de la variedad de especies dentro de una comunidad ecológica específica; particularmente, la diversidad del microbioma se puede calcular mediante distintos índices de diversidad, del número de especies (riqueza) o la fracción de especies predominantes (abundancia) (32, 33). La riqueza es comparada entre comunidades mediante el índice de Chao1 y OTUS observados; mientras que la riqueza y abundancia puede ser analizada entre comunidades por el índice de Shannon (34). Por otro lado, la diversidad beta se refiere al análisis de la diversidad entre dos sitios (33) y mide los cambios en la diversidad determinada a través de gráficos o gradientes dentro de un ambiente; pueden ser variables de tipo discreto o continuo (35).

1.3 Microbiota oral en estado de salud

Es importante reconocer que la diversidad del microbioma oral difiere del sitio anatómico específico, por ejemplo: muestras de placa dentobacteriana supra o subgingival, mucosa, lengua y saliva, así como la condición sistémica relacionada con la dieta, edad y estilo de vida hospedero (6, 12,36,37). En individuos con un diagnóstico oral saludable se ha determinado una microbiota menos diversa comparado con los sujetos con alteraciones orales (38). De forma general, se identifican cinco phyla predominantes que corresponden al 95% del total de la microbiota oral: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* y *Actinobacteria* (27).

En mucosa oral se determina una microbiota común entre individuos, compuesto por géneros como *Streptococcus sp.*, *Gemella sp.*, *Granulicatella sp.*, y *Veillonella sp.*; mientras que las muestras de placa dentobacteriana analizada en distintos periodos de dentición, además de géneros comunes se observan *Fusobacterium sp.*, *Tanerella (T. forsythia)* *Corynebacterium sp.*, *Kingella sp.*, *Prevotella sp.*, *Terrahaemophilus sp.*,

Capnocytophaga (C.gingivalis), Porphyromonas sp., Campylobacter (C. gracilis) , Actinomyces sp. y Haemophilus sp. (39,40).

En placa dentobacteriana supragingival, la especie comensal detectada con mayor frecuencia es *Fusobacterium nucleatum*, identificada como colonizador secundario en el desarrollo del biofilm y de forma simultánea, genera el medio anaerobio requerido por especies de *Porphyromonas* para su co-agregación (38,41). Las muestras de placa dentobacteriana subgingival se compone en su mayoría por los siguientes géneros: *Fusobacterium sp., Actinomyces sp., Streptococcus sp., Neisseria sp., Capnocytophaga sp., Prevotella sp., Corynebacterium sp. y Rothia sp.* Aunado a estos géneros, en saliva se ha determinado una microbiota común caracterizada por géneros como *Porphyromonas*, mientras que a nivel especie se identifican: *Streptococcus mitis, Streptococcus salivarius, Granulicatella adjacens, Neisseria flavescens, Rothia mucilaginosa y Prevotella melaninogenica* (38, 39, 42). Con respecto al estudio la microbiota en saliva, se determina que su composición refleja el estado de salud oral del individuo y depende del estadio de desarrollo dental; además se ve influenciada por la forma de nacimiento, periodo de lactancia y el uso de antibióticos (37). La figura 2 muestra los tipos de phyla y géneros más abundantes con respecto a su localización anatómica en cavidad oral identificaados por secuenciación genómica.

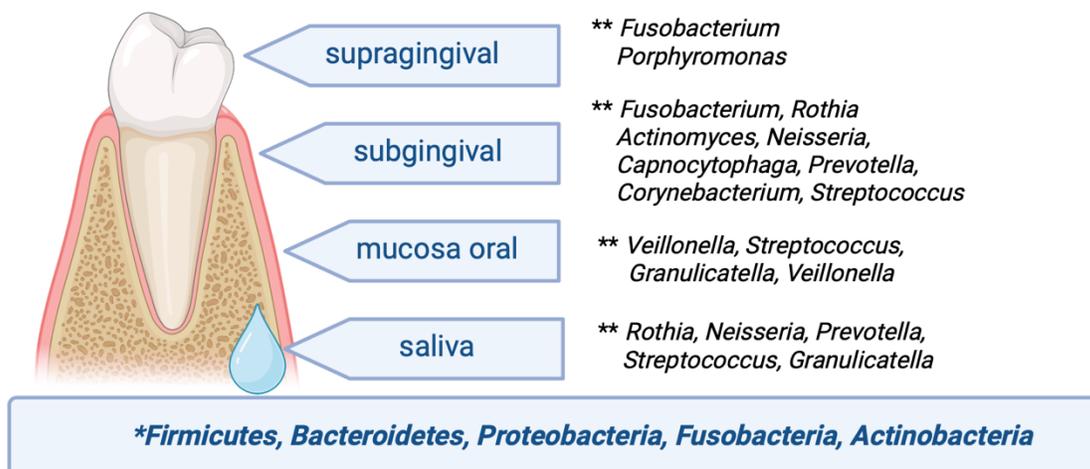


Figura 2. Microbiota oral en estado de salud por localización anatómica. (*) Tipos de phylum más abundantes. (**) Tipos de género más abundante. Ilustración creada en BioRender.

1.4 Disbiosis del microbiota oral y su relación con enfermedad periodontal

Se ha relacionado el desarrollo de la periodontitis con un complejo formado por tres microorganismos comensales: *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* y *Tannerella forsythia*; sin embargo, a partir de los ensayos de secuenciación genómica de nueva generación se ha establecido que la disbiosis de la microbiota oral presente en individuos con periodontitis tiene una mayor abundancia de los tres microorganismos que componen el complejo rojo. En este punto, se identificó una relación bacteriana entre géneros como *Treponema*, *Porphyromonas*, *Prevotella* y *Fusobacterium*. Particularmente en muestras de placa subgingival se observaron especies como *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas endodontalis*, *Tannerella forsythia* y *Parvimonas*. En muestras de saliva de sujetos con enfermedad periodontal, se indicó alta prevalencia de especies como *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, *Filifactor alocis* y *Aggregatibacter actinomycetemitans* (12, 37, 42, 43).

La disbiosis provocada en la periodontitis promueve una abundancia del género *Porphyromonas* en el 13% de los sujetos en comparación con una abundancia del 3.35% en pacientes sanos, particularmente en pacientes de edad adulta (42, 44, 45). *P. gingivalis* ha sido catalogado como el periodontopatógeno más asociado al desarrollo de la enfermedad periodontal; sin embargo, se ha identificado en conjunto con *Haemophilus heamolyticus*, *Prevotella melaninogenica* y *Campylobacterium ochracea* en una abundancia similar (12, 46, 47). Con una relevancia similar a *P. gingivalis*, se ha definido la participación de *Prevotella nigrescens* como importante promotor de periodontitis, relacionado con resorción de hueso alveolar (48).

En sujetos con periodontitis se ha descrito una microbiota oral más diversa en comparación con individuos sanos e incluso se ha relacionado con las diferentes características clínicas de la periodontitis, tales como pérdida de órganos dentarios y soporte óseo, bolsas periodontales y sangrado gingival (12,38). Ejemplo de ello, es la identificación de *P. endodontalis* y *T. forsythia* relacionado con inflamación gingival, así como la asociación de *A. actinomycetemcomitans* con la pérdida de tejidos de soporte del órgano dentario (49,50). La abundancia de *P. gingivalis* se encuentra relacionada con la presencia de bolsas periodontales de ≥ 4 mm localizadas en un porcentaje elevado de los pacientes evaluados; mientras que en bolsas periodontales ≥ 5 mm se encuentra una abundancia considerable de *T. forsythia* (51).

El desarrollo de periodontitis se debe principalmente a bacterias Gram negativas, de modo que se ha analizado la presencia de lipopolisacárido (LPS) en suero y saliva, ya que supone una translocación de productos bacterianos debido a la pérdida de continuidad en el epitelio gingival; este hallazgo presenta una correlación positiva entre niveles de LPS en saliva y niveles de pérdida de hueso alveolar (52). Así mismo, se identificó una relación

entre la abundancia de *Prevotella intermedia* y la pérdida del hueso alveolar pronunciada en los pacientes con periodontitis (53).

La enfermedad periodontal se caracteriza por el daño en los tejidos de soporte de los órganos dentarios y la ulceración del epitelio gingival, lo cual promueve la translocación de periodontopatógenos y productos bacterianos como el LPS, que induce la activación de receptores tipo Toll y la expresión de citocinas proinflamatorias como TNF, IL 1 β e IL 6, las cuales tienen la capacidad de inducir una respuesta inflamatoria sistémica mediante las proteínas de fase aguda como proteína C reactiva, amiloide A sérica y fibrinógeno (10, 54).

Considerando la respuesta inmune sistémica en el hospedero, un estudio analiza la presencia de citocinas en saliva como biomarcadores inflamatorios en pacientes con periodontitis, determinaron una relación negativa en concentración de IL 10 con respecto al número de especies identificadas (43). Se ha descrito la acción de *A.*

Actinomycetemcomitans sobre la activación del complejo del inflamasoma, dicho complejo resulta de la oligomerización de dominios posterior a la señalización de receptores tipo NOD y finalmente promueve la maduración de IL 1 β e IL 18; de igual forma, *A.*

Actinomycetemcomitans estimula linfocitos T, activando una respuesta de las células T cooperadoras 1 y 17 (Th1, Th17), así como el factor ligando del receptor nuclear $\kappa\beta$ (RANKL) asociado a citocinas IL 6, IL 17 y TNF relacionadas con resorción ósea (50, 55-57). Se encontró que *P. gingivalis* estimula receptores tipo Toll 4 e interleucinas IL 1 β , IL 12, IL 23, además de una activación del inflamasoma, aumentando la respuesta inmunogénica (58,59). De igual forma, se considera la respuesta inmune generada por *Prevotella*, caracterizada por el incremento de células Th17 (IL 17) y supresión de células T cooperadoras tipo 2, inhibiendo la expresión de citocinas anti-inflamatorias (IL 4, IL 5, IL 9) (48).

1.5 Disbiosis oral en enfermedades cardiovasculares

Se han analizado los distintos mecanismos que relacionan la periodontitis y las ECV, considerando la translocación de periodontopatógenos y productos bacterianos a circulación, la respuesta inmune local y sistémica generada, así como el metabolismo bacteriano de lípidos que contribuyen en el desarrollo de estos padecimientos. La respuesta inmune del hospedero se ve alterada por la actividad de los periodontopatógenos, los cuales tienen la capacidad de promover anticuerpos tipo IgA que inducen inflamación sistémica y, por consiguiente, promueven la aterogénesis responsable en gran medida del desarrollo de IAM debido a la ruptura o erosión de placa ateromatosa. En este punto, estudios de cohorte han identificado la relación entre periodontitis con ECV e IAM; los resultados de dichos análisis estiman que el 33% a 58.6% de los sujetos con ECV presentaron un grado de enfermedad periodontal (49, 52, 60- 63).

La figura 3 representa un resumen los géneros y especies más abundantes en pacientes con periodontitis, identificada en placa subgingival (recuadro blanco) y saliva (recuadro azul); así mismo, se presentan los géneros identificados en circulación sanguínea y diversos géneros relacionados como factor de riesgo de enfermedades cardiovasculares (64).

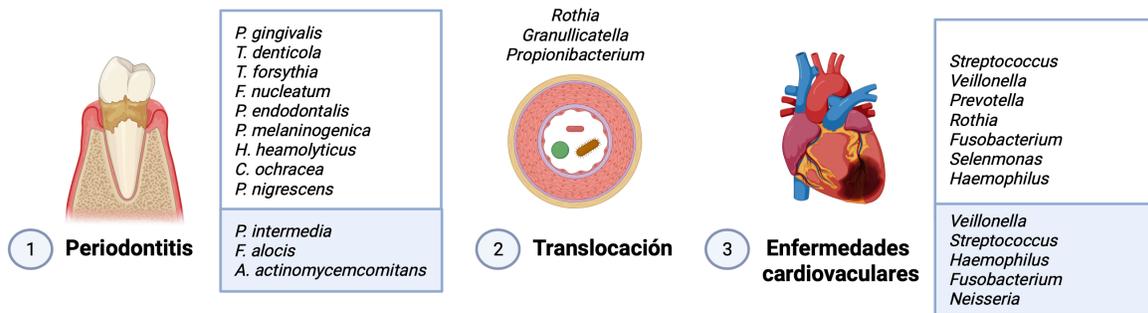


Figura 3. Descripción de especies provenientes de cavidad oral identificados en **1)** sujetos con periodontitis , **2)** translocación de especies provenientes de cavidad oral en circulación sistémica, **3)** géneros identificados como factor de riesgo de enfermedades cardiovasculares. “ECV” enfermedades cardiovasculares. Ilustración creada con BioRender.

Además de identificar la microbiota predominante en ECV, se ha logrado establecer la relación de algunos géneros bacterianos con marcadores bioquímicos, tales como proteína C reactiva, lípidos y apolipoproteínas. El mecanismo de inflamación y el metabolismo bacteriano de lípidos asociado a la formación de la placa ateromatosa, se relaciona con una concentración elevada de colesterol y lipoproteína de baja densidad (LDL) que son atribuibles a un mayor riesgo de aterosclerosis, responsable en gran medida de la patogenia de IAM. En este punto, se sugiere que la oxidación de LDL promueve la formación de macrófagos espumosos, mismos que al entrar en apoptosis, generan la liberación de cristales de colesterol responsables de la activación del inflammasoma y con ello, la liberación de pro IL 1 β e pro IL 18, lo cual influye en la formación de la placa ateromatosa (14, 65-67).

Se ha enfatizado la relación de la inflamación en el desarrollo del IAM y la influencia de la disbiosis de la microbiota oral e intestinal en el proceso inflamatorio e inmunológico de estos pacientes. La respuesta inmune del huésped se ve alterada por la actividad de los microorganismos responsables de enfermedad periodontal o periodontopatógenos, los

cuales tienen la capacidad inducir inflamación sistémica y promueven la aterogénesis responsable en gran medida del desarrollo de IAM (62). En este punto, se determinó la variabilidad de la microbiota oral en pacientes diagnosticados con IAM y la carga de inmunoglobulinas IgA e IgG relacionadas; por medio de una evaluación periodontal, así como la identificación de especies bacterianas como *A. actinomycetemcomitans*, *C. rectus* y *F. nucleatum* (49).

Mediante el análisis de la región 16S rRNA (V1-V2), se ha realizado la comparación de tres diferentes ambientes en pacientes con enfermedades cardiovasculares, placa ateromatosa, saliva y heces; en dicho análisis se identificaron los phyla *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* y *Fusobacteria* (68). De igual forma, un análisis de secuenciación masiva por amplicones del gen 16s rRNA (V3-V4) ha caracterizado la microbiota de mucosa oral, identificando como géneros predominantes: *Streptococcus* sp., *Veillonella* sp., *Leptotrichia* sp., *Neisseria* sp., *Prevotella* sp., *Rothia* sp., *Capnocytophaga* sp., *Fusobacterium* sp., *Selenomonas* sp. y *Haemophilus* sp. (69).

En un estudio realizado en pacientes que desarrollaron un IAMCEST en muestras de cavidad oral mediante la secuenciación masiva por amplicones del gen 16s rRNA (V3-V4), identificaron un patrón de disbiosis asociado a la disminución de *Firmicutes* y *Haemophilus* en comparación con sujetos sin IAMCEST; así mismo, mencionan una alta prevalencia de *Bacteroidetes*. Otro hallazgo de importancia, fue la identificación de una mayor diversidad en sujetos con IAMCEST (70).

El protocolo realizado en pacientes asiáticos diagnosticados con infarto agudo al miocardio con elevación del segmento ST, ha considerado que la traslocación de la microbiota oral e intestinal en plasma sanguíneo podría contribuir en la patogenia de eventos cardiovasculares. En dicho protocolo analizaron la presencia de LPS en plasma sanguíneo, además del aislamiento de ADN bacteriano en muestras sanguíneas, donde

identificaron diferentes phyla de microbiota oral, como *Lactobacillus*, *Bacteroidetes* y *Streptococcus*, así como especies provenientes de microbiota intestinal (71).

De igual forma, en un análisis realizado en biopsias de trombos en pacientes IAMCEST, se identificaron especies de la microbiota intestinal y oral (70), así como la identificación en torrente sanguíneo de especies bacterianas de ambos nichos, lo cual permitió sugerir que la permeabilidad de la barrera intestinal se ve alterada debido a la hipo-perfusión intestinal resultado de la isquemia producida por el IAM (71). También se ha propuesto la relación entre una higiene oral deficiente con una alteración de la microbiota intestinal, identificado por una mayor abundancia de *Bacteroidetes* (72).

De acuerdo al análisis de la microbiota intestinal en pacientes IAMCEST, una cohorte ha determinado una mayor abundancia en el phylum *Proteobacteria* en comparación con sujetos sanos (70), mientras que una cohorte distinta de sujetos IAMCEST con hiperglicemia, define una mayor abundancia de *Bacteroidetes* (73); estos hallazgos determinan una disbiosis intestinal. La participación de patógenos de cavidad oral como *Porphyromonas gingivalis* sobre el metabolismo intestinal, ha sido analizada en modelos murinos, identificando un incremento significativo en la concentración plasmática en los modelos de periodontitis inducida; sin embargo, en humanos no ha se detallado este mecanismo (74).

1.6 Metabolitos y sub-productos bacterianos asociados al microbioma intestinal

La disbiosis afecta la permeabilidad de la mucosa intestinal en el huésped, lo que influye en la traslocación de moléculas y metabolitos bacterianos a la circulación, promoviendo el estado inflamatorio del huésped (75-77).

Otro factor que involucra la disbiosis intestinal con el riesgo cardiovascular es la alteración de la barrera hemato-intestinal, la cual influye en la absorción de compuestos producidos por la microbiota intestinal; tal es el caso de la trimetilamina (TMA) asociado con el metabolismo de compuestos provenientes de la dieta, como fosfatidilcolina y L-carnitina; la TMA se absorbe y es oxidado en hígado por la enzima monooxigenasa-3, formando el N-óxido de trimetilamina (TMAO) (78). Este metabolito es cuantificado en plasma y ha sido descrito como un importante promotor de riesgo de enfermedad cardiovascular, relacionado con el desarrollo de la placa aterosclerótica debido a la alteración de las células endoteliales y la hiperreactividad de las plaquetas; también se ha notado el impacto del TMAO sobre el metabolismo del colesterol mediante el decremento en la síntesis de ácidos biliares; así mismo, TMAO promueve la formación de macrófagos espumosos y de igual forma, se ha notado la acción de TMAO sobre la activación del inflammasoma (76, 79).

La cuantificación de TMAO se ha relacionado con un mayor riesgo de mortalidad en pacientes diagnosticados con ECV e incluso, pacientes diagnosticados con IAM que inicialmente presentaron troponinas negativas, mostraron altos niveles de TMAO (82). Mediante el análisis de secuenciación masiva por amplicones del gen 16s rRNA de la microbiota intestinal, se determinó que los sujetos que presentaban una mayor abundancia del género *Prevotella*, demostraron una mayor concentración de TMAO en plasma (77). También en pacientes IAMCEST, se ha determinado una correlación positiva

entre la cuantificación plasmática de TMAO con la microbiota intestinal a nivel de taxa, como *Aerococcaceae* (78).

En pacientes con IAMCEST e hiperglicemia se estableció el análisis de la microbiota identificada en trombos; sus resultados definieron una correlación de la abundancia de *Prevotella* con niveles elevados de N-óxido de trimetilamina (TMAO) y se asoció a un menor índice de supervivencia en el seguimiento a un año de estos pacientes; además, identificaron una relación entre la abundancia de *Prevotella* en trombos y heces (73).

La microbiota oral presente en pacientes con periodontitis, provoca la exposición de lipopolisacárido (LPS) que promueve una respuesta inflamatoria sistémica relacionada con aterosclerosis e IAM. En pacientes diagnosticados con periodontitis y ECV al analizar los niveles séricos de LPS, encontraron una relación positiva, así como una asociación entre niveles de LPS en saliva y suero, sugiriendo la translocación de bacterias Gram negativas o de sus factores de virulencia a circulación sistémica (52). En asociación con niveles de LPS en suero de pacientes con IAMCEST, se observan grandes concentraciones de monocitos con marcadores en superficie CD14++ CD16+ y producción de citocinas pro-inflamatorias (71).

De igual forma, diversos análisis han sugerido que la principal vía de la translocación de lipopolisacárido (LPS) se debe a una alteración de la permeabilidad de la barrera intestinal; sin embargo, la disbiosis en la cavidad oral, también promueve dicha translocación. Al realizar la caracterización de la microbiota en un nicho subgingival, así como la identificación de LPS en saliva y suero; se determinó una asociación de 2.6% entre la endotoxina y el género *P. intermedia*, y el 3.2% asociado a la suma de 11 cepas provenientes de cavidad oral; el resto se determinó que proviene de la microbiota de

orofaringe, nasofaringe y respiratoria. En el mismo análisis, se definió una correlación positiva entre la cantidad de LPS identificado en saliva y suero; en el caso de sujetos con periodontitis activa, se encuentra una concentración elevada, particularmente, aquellos sujetos que reportaron una pérdida de hueso alveolar (52).

Igualmente, se ha descrito que el desarrollo de una endotoxemia genera un desequilibrio de las lipoproteínas en el hospedero, debido a la capacidad de unión con el LPS en circulación sanguínea y de este modo, se promueve su neutralización; por este motivo, se ha logrado establecer una relación entre los niveles de LPS en sujetos con periodontitis y algún grado de dislipidemia. Dicha aseveración, se sustenta mediante el análisis enfocado en la unión del LPS, determinada con mayor prevalencia con las lipoproteínas de muy baja densidad (LDL), lo cual provoca una disminución abrupta de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y modificando su función anti-aterogénica (84). Así mismo, en sujetos con periodontitis se ha reportado una baja concentración de HDL y apolipoproteína A1, además de una mayor concentración de LDL/V-LDL, apolipoproteína B y colesterol total (85).

Dentro de la actividad pro-aterogénica de la V-LDL se considera la activación de macrófagos y, en consecuencia, la expresión de TNF y la formación de células espumosas; por tal motivo, en sujetos con periodontitis con una elevada concentración de V-LDL y LPS, incrementa la expresión de TNF, IL 6 y CD14, así como elevación de los niveles de proteína C reactiva; incluso, se ha establecido una asociación significativa entre el grado de inflamación periodontal con los niveles V-LDL, triglicéridos y proteína C reactiva en sujetos con antecedentes de infarto agudo al miocardio (86).

Con relación a la traslocación de LPS, se ha detallado que en sujetos diagnosticados con periodontitis y ECV existe una relación positiva entre la concentración de LPS en suero y saliva (43). Así mismo, en el desarrollo de un proceso infeccioso el equilibrio de las lipoproteínas en el hospedero se ve afectada; de este modo, se ha identificado la relación del LPS con una baja concentración de lipoproteínas de alta densidad y apolipoproteína A1, así como una mayor concentración de lipoproteína de baja densidad y apolipoproteína B. lo anterior se debe a la unión promovida entre el LPS y las lipoproteínas de muy baja densidad, ocasionando una disminución de HDL y modificando su actividad anti-aterogénica (84-85). Por tal motivo, existen estudios que aseveran que la presencia de LPS asociado a una baja concentración de HDL, sugiere un predictor de un evento cardiovascular incidente (87).

La importancia del hallazgo de periodontopatógenos en sujetos con aterosclerosis, se ha atribuido a la presencia de una enzima peptidil arginina deaminasa producida por *P. gingivalis*, la cual modifica proteínas prevalentes en lesiones ateroscleróticas mediante la citrulinación. Por otro lado, se han reportado altas concentraciones de auto-anticuerpos contra proteínas citrulinadas, como la histona 2B, la cual se ha asociado a la presencia de calcificaciones en arterias coronarias, lo cual supone un agravante en dicha enfermedad (88).

La figura 4 representa un esquema de la relación de la disbiosis de la microbiota oral e intestinal en el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares.

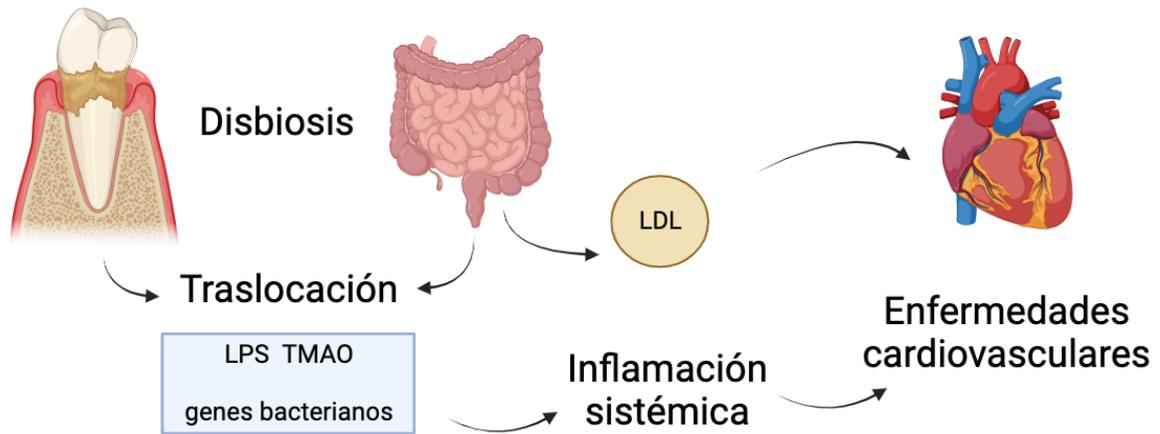


Figura 4. Disbiosis de la microbiota oral e intestinal y su relación en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. La disbiosis en cavidad oral e intestino, promueven la traslocación de productos (“LPS” lipopolisacárido), metabolitos (“TMAO” N-óxido de trimetilamina) y genes bacterianos, así como una alteración en el metabolismo de lípidos, identificado por una elevación de la lipoproteína de baja densidad “LDL”; estos eventos desencadenan el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Ilustración creada con BioRender.

2. Diseño experimental

Justificación

Las enfermedades isquémicas del corazón, dentro de las cuales se considera el infarto agudo al miocardio, representan la principal causa de mortalidad de la población en México; las estadísticas de mortalidad del Instituto Nacional de Estadística y Geografía de 2021 la caracterizan como la primera causa de muerte en hombres y mujeres. Durante el segundo trimestre de 2021, el Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” refirió que las cardiopatías isquémicas representan el 28.19% de morbilidad de un total de 1,050 casos de atención y una tasa de 23.33% de mortalidad dentro del periodo mencionado.

Por tal motivo, resulta de interés identificar la relación del microbioma oral y su influencia en la patogenia del IAM, que hasta la fecha se desconoce en nuestra población; así mismo, se pretende estudiar la posible correlación de los marcadores biológicos como lo son: citocinas pro y anti-inflamatorias, el N-óxido de trimetilamina y lipopolisacárido, así como la participación del estado de salud oral en el desarrollo del infarto agudo al miocardio. De tal manera, se desea conocer si: ¿La diversidad de la microbiota oral asociado al estado de salud bucal influye en un mayor riesgo cardiovascular en pacientes con IAMCEST, y contribuye al establecimiento de una respuesta inflamatoria exacerbada?

Hipótesis

La diversidad de la microbiota oral en pacientes con IAMCEST es diferente en los distintos grados de riesgo cardiovascular, de igual manera, se relaciona con diferencias en la concentración de las citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, así como el N-óxido de trimetilamina y el lipopolisacárido.

Objetivos

a) Objetivo general

Analizar la diversidad de la microbiota oral en pacientes con IAMCEST comparada en los diferentes grados de riesgo cardiovascular y su estado de salud bucal, y su relación con la concentración de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, N-óxido de trimetilamina y lipopolisacárido.

b) Objetivos específicos

1. Caracterizar la microbiota de la placa supragingival de pacientes con IAMCEST asociado a su estado de salud oral y a la escala clínica basada en la inflamación sistémica.
2. Cuantificar las citocinas pro-inflamatorias (IL 6, IL 1 β , TNF, IFN γ , IL 8, IL 17A) y anti-inflamatorias (IL 4, IL 10, TGF β) en suero de pacientes IAMCEST.
3. Cuantificar el N-óxido de trimetilamina y lipopolisacárido en plasma de pacientes IAMCEST.
4. Relacionar la diversidad de la microbiota oral y el estado de salud oral con los distintos grados de riesgo cardiovascular y la concentración de citocinas, N-óxido de trimetilamina y lipopolisacárido.

Criterios de selección

a) Criterios de inclusión

- Pacientes diagnosticados con evento primario de infarto agudo al miocardio con elevación del segmento ST (IAMCEST) con menos de 72 horas de evolución.

b) Criterios de exclusión

- Diagnóstico distinto a infarto agudo al miocardio con elevación de segmento ST.
- Pacientes que hayan recibido un tratamiento previo de reperfusión o trombolíticos.
- Diagnóstico de una enfermedad infecciosa, autoinmune o cáncer identificadas al momento del ingreso.
- Pacientes que hayan recibido cualquier tipo de antimicrobiano, antiinflamatorio, glucocorticoides o inmunosupresores en el último mes.

c) Criterios de eliminación

- Datos clínicos no registrados.
- Muestras de ADN degradado identificado por electroforesis en gel.
- Muestras de ADN que no cumplan parámetros de calidad, identificada por una absorbancia de A260/280 de 1.8 por espectrofotometría UV.

3. Métodos

La figura 5 muestra el diagrama de flujo resumido de los métodos aplicados en el presente protocolo de investigación y se encuentran detallados en los siguientes puntos.

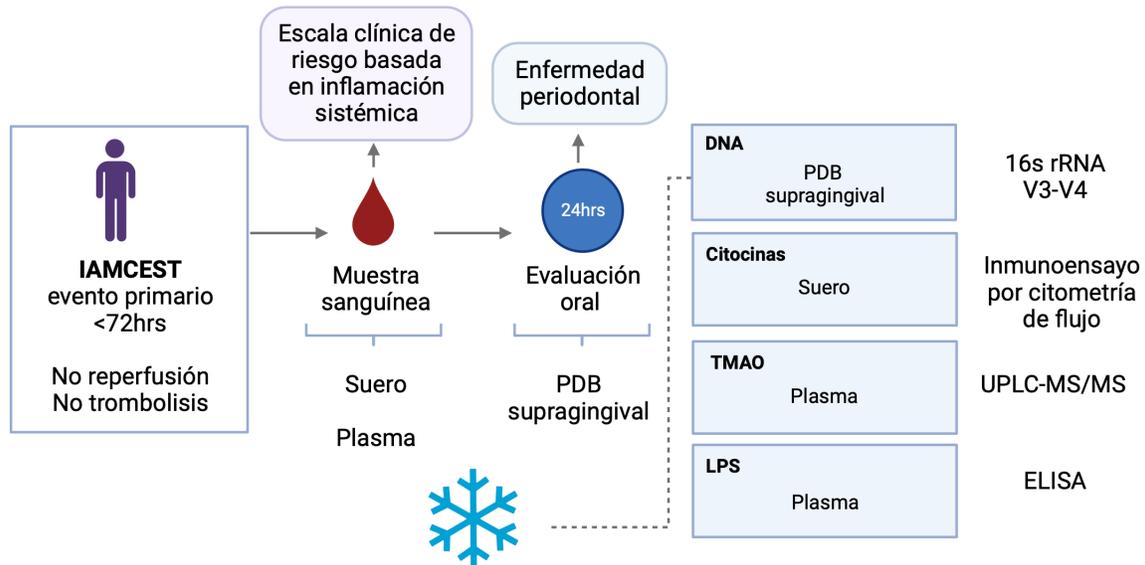


Figura 5. Diagrama de métodos; de izquierda a derecha, se describen la selección de sujetos seguido de la obtención de muestras, las cuales fueron almacenadas hasta su procesamiento a -20°C. La escala de riesgo basada en la inflamación sistémica descrita previamente, considera los parámetros de leucocitos, albúmina y proteína C reactiva. La evaluación oral se realizó 24 horas posteriores al ingreso de los pacientes. Finalmente se enlistan los métodos aplicados en el presente protocolo. IAMCEST: infarto agudo al miocardio con elevación del segmento ST. PDB: placa dentobacteriana, TMAO: N-óxido de trimetilamina, LPS: lipopolisacárido, UPLC-MS /MS: Cromatografía líquida acoplado a espectrometría de masas.

3.1 Selección de sujetos de estudio

Se llevó a cabo un estudio observacional y transversal. Los sujetos fueron reclutados en el periodo de marzo de 2019 a marzo de 2020, de forma mediata y posterior a su ingreso a la Unidad de Cuidados Coronarios del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”. El diagnóstico de IAMCEST fue determinado por Médicos Cardiólogos, basado en los hallazgos observados en el electrocardiograma, seguido de los parámetros establecidos por las guías de la definición universal del infarto al miocardio (5). Únicamente se

seleccionaron aquellos sujetos con un evento primario de IAMCEST en un periodo de evolución de 72 horas, que no hubieran recibido un tratamiento previo de reperfusión o trombolíticos; luego de una invitación y autorización, se realizó un cuestionario de salud general y el acuerdo de un consentimiento previamente informado.

En la definición de la escala de riesgo basado en la inflamación sistémica, se tiene como referencia la evaluación de los valores séricos de albúmina, proteína C reactiva y el conteo de leucocitos; basados en los puntos de corte, estos parámetros determinan la clasificación de la siguiente manera: 1 punto basado en el conteo de leucocitos ($\geq 9.3 \times 10^3/\mu\text{L}$), 2 puntos para la cuantificación de proteína c reactiva ($\geq 13.0 \text{ mg/L}$) y 3 puntos basados en la concentración de albumina ($\leq 3.6 \text{ g/dL}$); de este modo, se determinan cuatro categorías distintas: 0 puntos, sin signos de inflamación sistémica; 1-2 puntos riesgo leve; 3-4 puntos, riesgo moderado y 5-6 puntos, riesgo grave (13) (Tabla 1).

El análisis de albúmina sérica y proteína C reactiva de alta sensibilidad fueron medidos fotométricamente usando el analizador químico clínico AU680 (Beckman Coulter, Fullerton, CA), mientras que los leucocitos fueron contabilizados mediante el uso del analizador hematológico automatizado DxH900 (Beckman Coulter, Miami, FL); mismo que fue determinado en el laboratorio central del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez".

3.2 Determinación de la evaluación periodontal

Para evaluar el estado de salud periodontal, se consideraron los siguientes parámetros: presencia de placa dentobacteriana o cálculo, eritema y sangrado gingival, observación clínica de la pérdida de la cresta alveolar, movilidad dental, inserción del nivel del margen gingival a unión cemento esmalte $>3\text{mm}$, órganos dentarios ausentes y la identificación de un patrón de pérdida ósea incisivo molar (89). La evaluación oral se realizó dentro de las siguientes 24 horas posteriores al ingreso del paciente.

3.3 Obtención de muestras biológicas

Al ingreso del paciente, se obtuvo la muestra sanguínea (10 ml total en promedio) en tubos de tereftalato de polietileno (BD Vacutainer) sin anticoagulante para la obtención de suero y con ácido etildiamin tetrasódico (EDTA) para plasma, las cuales se mantuvieron en congelación a -80°C; 24 horas posteriores al ingreso se realizó la toma de muestra de placa dentobacteriana supragingival (1mg en promedio), obtenida mediante el raspado de las superficies dentales vestibulares y linguales de los órganos dentarios presentes con una cureta Gracey ¾ esterilizada. Todas las muestras fueron recolectadas en un contenedor estéril de polipropileno de 1.5 ml de volumen (Eppendorf) con 1ml de etanol 70% y fueron almacenadas a -20°C hasta su procesamiento.

3.4 Aislamiento de DNA de la muestra de placa dentobacteriana supragingival

Previamente se realizó un proceso de centrifugado a 12,000 rpm por 1 minuto para precipitar la muestra de placa dentobacteriana (PDB); en una campana de flujo laminar estéril, el etanol se decanta y el remanente se deja evaporar en un periodo de 10 minutos en promedio. Se realizó el aislamiento de ADN de la muestra mediante el uso del kit EZ-10 Spin Column Genomic DNA Minipreps, Animal (Bio Basic Inc, cat. BS427), siguiendo las indicaciones del fabricante. Una vez verificada el grado de pureza del material genético ($A_{260}/A_{280}=1.8-2.0$) por espectrofotometría UV (Nanodrop, 100, Thermofisher) y la calidad mediante electroforesis en geles de agarosa 1% teñidas con Bromuro de Etidio, analizando las imágenes documentadas en un detector de quimioluminiscencia y fluorescencia ed/infrarrojo cercano (FR/NIR) (Chemidoc Image System, BioRad).

3.5 Secuenciación genómica

Las muestras de ADN aislado fueron enviadas a un laboratorio externo (Novogene, China), donde se confirma la integridad del ADN mediante electroforesis por microcapilaridad (Agilent, Fragment Analyzer System 5400), continuando con el proceso de amplificación por reacción en cadena de polimerasa del gen 16s rRNA región V3-V4. Se describen los cebadores utilizados para la amplificación (341F CCTAYGGGRBGCASCAG, 806R GGACTACNNGGGTATCTAAT).

El proceso de secuenciación genómica fue realizado en la plataforma Illumina NovaSeq 6000 PE250, usando el protocolo de 2x250 pares de bases.

3.6 Análisis de secuenciación masiva por amplicones del gen 16s rRNA

Se recibieron datos en crudo en formato (Forward y Reverse), mismos que fueron analizados por medio del programa informático “Quantitative Insights into Microbial Ecology 2” (QIIME2) versión 2022.2. De primera instancia, se realiza la hoja de metadatos en formato “.csv” con las variables por analizar, previamente validado por la extensión Keemei [*Google Sheets*]. Con el comando “DADA2” se realizó la unión de los archivos fastQ paired-end, así como la remoción de quimeras y la construcción de la tabla de variante de secuencia de *amplicón* (“ASV” por sus siglas en inglés, *amplicon sequence variants*) (90). Se obtuvieron 2,740,002 secuencias; la calidad de las secuencias fue filtrada a un valor Q30 (1 base errónea en 1000), se obtuvieron 1,635,220 secuencias en este filtrado con el comando dada2. Posteriormente, se realizó la asignación taxonómica mediante la base de datos Human Oral Database (HOMD) versión V15.2 con una identidad del 99%, previamente entrenada para la región V3 y V4 (91). Posteriormente, se realizó el filtrado de las secuencias con el comando “filter- features” y se obtuvieron 1,629,764 secuencias; el rareficado de estas secuencias (Tabla 2) se realizó a una profundidad de 50,000 (Figura 6).

Tabla 2. Total de secuencias obtenidas por etapa de filtrado en el análisis de la plataforma QIIME2

	<i>Demultiplex</i>	<i>Dada2</i>	<i>Feature-table</i>	<i>Feature-table</i>
		<i>Denoise-paired</i>	<i>Filter-features</i>	<i>Rarefy</i>
Total	2,740,002	1,635,220	1,629,764	850,000
Mínimo	98,658	54,445	54,102	50,000
Máximo	178,278	119,742	119,487	50,000
Media	161,176	96,727.41	95,868.47	50,000
Features	-	3,329	1,940	1,940

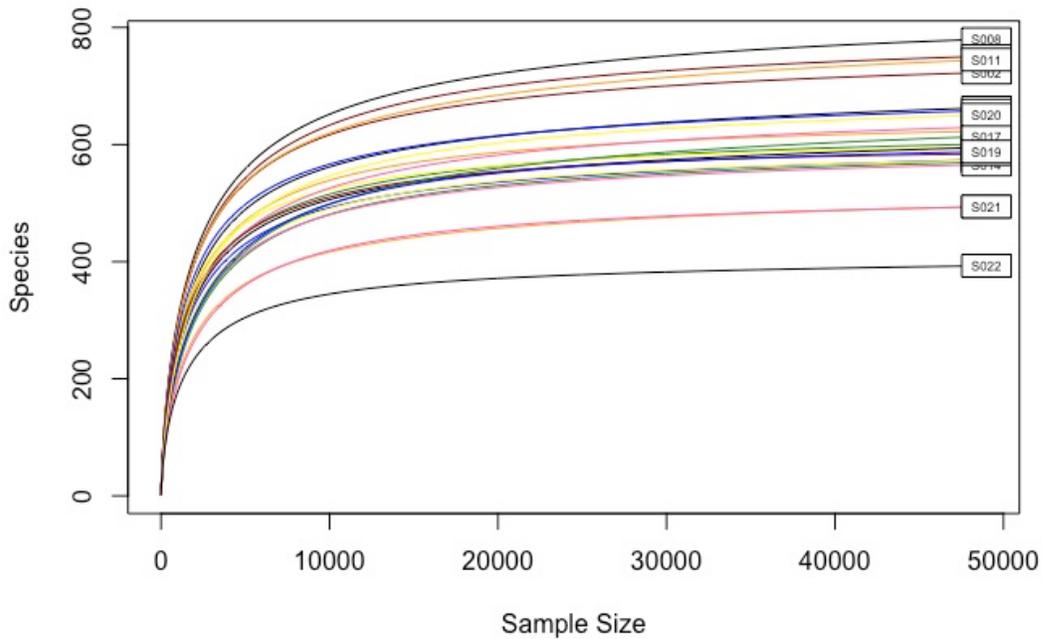


Figura 6. Curvas de rarefacción. Se muestra el rareficado a una profundidad de 50,000 secuencias y el número de especies incluidas para cada sujeto. Gráfica elaborada en el paquete “vegan”, plataforma R.

Mediante el paquete “phyloseq” v. 1.38.0, R”, se creó un archivo en formato “.rsd” para la realización del análisis de α diversidad mediante el índice de Shannon, Chao1 y Observed features y el análisis de β diversidad mediante el índice de Bray Curtis, representado por un análisis de coordenados principales (PCoA) (“ampvis2” v. 2.7.23, R). Igualmente se realizó el Análisis de Varianza Multivariado con Permutaciones (PERMANOVA, 999 permutations) para la identificación de diferencias entre grupos (“vegan” [v. 2.6-2], R). Se aplicó el análisis de dispersión de la homogeneidad mediante el uso de la función “betadisper” (paquete “vegan” v.2.6-2, R) y finalmente, el análisis de discriminación lineal con efecto de tamaño (Linear discriminant analysis effect size “LEfSe”), utilizando los parámetros por defecto y un parámetro LDA igual o menor a 3 (Galaxy v. 1.0) (92). Finalmente, se realizó un análisis comparativo basado en la expresión de genes determinado por la paquetería “DESeq2” (v.1.34.0, R) (93).

3.7 Cuantificación de citocinas

Se realizó la cuantificación de citocinas en suero por medio de inmunoensayo por citometría de flujo, mediante el uso del kit Legendplex Human Essential Immune Response Panel (13plex) (Biolegend, cat. #740930), siguiendo las indicaciones del fabricante. El panel utilizado incluyó las siguientes citocinas: interleucina4 (IL4), interleucina 2 (IL 2), CXCL10 (IP10), interleucina 1 β (IL 1 β), tumor necrosis factor (TNF), CCL2 (MCP1), interleucina 17A (IL17A), interleucina 6 (IL 6), interleucina 10 (IL 10), interferon γ (IFN γ), interleucina 12 (IL 12p70), chemokine ligand 8 (CXCL8) y factor de crecimiento transformante β 1 (TGF β 1). Los datos de concentración de citocinas fueron procesados en el citómetro de flujo BD FACSAria BD (Biosciences, San Jose, CA, USA) y analizados mediante el software en línea Biolegend LEGENDplex™ (<https://legendplex.qognit.com>). De dicho panel, se seleccionaron nueve citocinas para su

inclusión en este protocolo. El ensayo se realizó por triplicado y la referencia de la concentración de cada citocina se presenta en la tabla suplementaria 1.

3.8 Cuantificación de N-óxido de trimetilamina

La cuantificación del N-óxido de trimetilamina en plasma fue realizado mediante el análisis por cromatografía líquida acoplado a espectrómetro de masas UPLC-MS/MS (AB SCIEX API 4000), proporcionado por el proveedor del servicio Creative Proteomics (Nueva York, Estados Unidos, <https://www.creative-proteomics.com>).

3.9 Cuantificación de lipopolisacárido

Se realizó previamente una selección de las muestras de plasma almacenadas, con el objetivo de descartar la contaminación de las mismas; se realizó un cultivo en medio de enriquecimiento bacteriológico por 24 horas a 37°C. De las 22 muestras de sujetos, se eligieron 11 muestras para continuar con el inmunoensayo ligado a enzimas para la detección de antígenos “ELISA” (Instant Enzyme-linked immunoabsorbent assay kit. Cloud-clone corp. SN 78A604A59A). Dicho ensayo se realizó por duplicado de cada muestra con el protocolo descrito por el fabricante en placa de 96 pozos, finalmente, se determina la lectura de la concentración en espectrofotómetro a 450nm (Epoch microplate spectrophotometer, Biotek). Se realizó el promedio de las absorbancias y la curva de concentraciones [30 ng/μl, 15 ng/μl, 7.5 ng/μl, 3.75 ng/μl, 1.88 ng/μl, 0.94 ng/μl, 0.47 ng/μl, 0.23 ng/μl]; mediante un análisis de regresión lineal en la plataforma R [v.4.1.2] se determinó a concentración expresada en ng/μl de cada muestra.

3.10 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante la aplicación de prueba exacta de Fisher y Kruskal- Wallis, previo análisis de la distribución mediante la prueba de Shapiro-Wilk. El análisis de correlación se aplicó la prueba de Spearman, mientras que el cálculo del rango intercuartil se realizó mediante la prueba de Bisagra de Tukey. Todos los análisis de significancia se establecieron en un valor de $p \geq 0.05$. Para el análisis y la representación gráfica de los resultados se utilizaron los siguientes paquetes “ampvis2” v.2.7.23, “DESeq2” v. 1.34.0, “corrplot” v.0.92 y “ggplot2” v.3.3.6 del programa informático R [v.4.1.2].

4. Resultados

4.1 Sujetos de estudio

Se reclutaron 27 sujetos, de los cuales, cinco sujetos fueron eliminados por la omisión de algún dato clínico de referencia, diagnóstico de IAMCEST no confirmado, o por el uso de antibiótico en el último mes. Los 22 sujetos incluidos fueron distribuidos dentro de la escala clínica de riesgo basada en la inflamación sistémica categorizados de la siguiente manera: sujetos sin riesgo (n=3), riesgo leve (n=8), moderado (n=7) y grave (n=4). La tabla 3 muestra la distribución de los sujetos por grupo considerando género, antecedentes patológicos referidos, así como el estado periodontal determinado en la evaluación oral. Se observó que el rango de edad fue de 36 a 74 años de edad y en su mayoría, se incluyeron sujetos de género masculino (95%). La totalidad de los sujetos presentaron algún grado de enfermedad periodontal; el diagnóstico de gingivitis se presentó en el 45.5% de los sujetos y periodontitis en el 54.5%; no se observaron diferencias significativas entre la comparación entre los grupos de riesgo.

La historia médica de los sujetos determinó que 5 sujetos refirieron antecedentes de diabetes, 7 sujetos con hipertensión, 4 sujetos presentaron dislipidemia y 9 sujetos refirieron el hábito de tabaquismo activo; se observó que ningún sujeto de la categoría de riesgo grave reportó el hábito de tabaquismo y en la comparación entre grupos, se observó una diferencia estadísticamente significativa. De la totalidad de los sujetos, el 9% refirieron un tratamiento de estatinas, ácido acetilsalícilico en el 13%, antihipertensivos en el 31% e hipoglucemiantes en el 13% de los sujetos. Con relación a las características clínicas observadas, se identificó que el grupo de riesgo grave, presentaron una mayor proporción de sujetos con una clase de Killip-Kimball mayor a 2, más de dos arterias coronarias afectadas, categoría de TIMI mayor a 2 y un índice Grace mayor.

Tabla 3. Resumen de características clínicas sistémicas de la cohorte

	<i>Sin riesgo</i> N=3	<i>Leve</i> N=8	<i>Moderado</i> N=7	<i>Grave</i> N=4	<i>p</i> <i>value</i>	
Edad, años ^a	61 (65-58)	60 (54-69)	55 (36-74)	62 (55-70)	0.367	◇
Masculino ^b	3(100)	7 (87.5)	7 (100)	3 (75)	0.758	□
Evaluación periodontal						
Gingivitis ^a	2 (66)	2 (25)	5 (71.4)	1 (25)	0.272	□
Periodontitis ^a	1 (33)	6 (75)	2 (28.6)	3 (75)		
Historia médica del paciente						
Diabetes ^a	1(33)	1 (12.7)	1 (14.3)	2 (50)	0.442	□
Hipertensión ^a	2 (66)	1 (12.7)	2 (28.6)	2 (50)	0.291	□
Dislipidemia ^a	1 (33)	Non	3 (42.9)	Non	0.088	□
Tabaquismo activo ^a	3(100)	2 (25)	4 (57.1)	Non	0.037*	□
Tratamiento previo						
Estatinas ^a	Non	2 (25)	1 (14.3)	Non	0.855	□
Ácido acetilsalicílico ^a	Non	2 (25)	1(14.3)	Non	1.000	□
Antihipertensivo ^a	1 (33)	2 (25)	2 (28.6)	1 (25)	1.000	□
Hipoglucemiante ^a	Non	1 (12.7)	1 (14.3)	1 (25)	1.000	□
Características clínicas						
Clase Killip-Kimbal ≥ 2 ^a	Non	3 (37.5)	Non	1 (25)	0.336	□
Número de arterias afectadas ≥ 2 ^a	1(3)	4 (50)	4 (57.1)	3 (75)	0.706	□
TIMI ≥ 2 ^a	3 (100)	6 (75)	4 (66.7)	3 (75)	0.901	□
GRACE ^b	93 (27)	132 (30)	89 (38)	124.5 (51.5)	0.390	◇
Evento cardiovascular mayor adverso ^b	1 (33)	1 (12.7)	2 (28.6)	1 (25)	0.821	□
Leucocitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) ^b	7.7 (0.85)	12.9 (4.1)	10.8 (0.7)	10.1 (14)	0.086	◇
Albumina (g/dL) ^b	4.0 (0.2)	3.9 (0.3)	3.5 (0.5)	2.9 (0.6)	0.001*	◇
Proteína C-reactiva (mg/L) ^b	3.1 (2.7)	1.5 (4)	8.7 (12.2)	78.5 (38)	0.016*	◇
Troponina cardíaca I (ng/mL) ^b	3.9 (9.5)	3.5 (48.9)	0.19 (1.28)	11.6 (42.2)	0.532	◇
Colesterol total (mg/dL) ^b	135.6 (20.3)	185.7 (80.1)	171.3 (54.5)	146.5 (66.3)	0.174	◇

	<i>Sin riesgo</i> N=3	<i>Leve</i> N=8	<i>Moderado</i> N=7	<i>Grave</i> N=4	<i>p</i> <i>value</i>	
Lipoproteína de alta densidad HDL (mg/dL) ^b	37.4 (13.4)	35.9 (10.6)	32.4 (15.9)	27.5 (18.6)	0.705	◇
Lipoproteína de baja densidad LDL (mg/dL) ^b	90.4 (7.7)	125.8 (72.7)	108.4 (54.9)	91 (48.7)	0.178	◇
Índice de masa corporal ^b	26.4 (1.6)	26.8 (4.8)	28.1 (1.1)	28.2 (8.8)	0.690	◇

^a Frecuencia (%), ^b Mediana (IQR). Valor de p ◇: Kuskal-Wallis o □: Prueba exacta de Fisher.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos con respecto a los marcadores de albúmina y proteína c reactiva. Esta descripción permitió definir las características clínicas, antecedentes y marcadores bioquímicos identificados en los sujetos con respecto a la estratificación de riesgo.

Se realizó una evaluación oral para cada sujeto, donde se determinaron características dentales y periodontales, las cuales se describen por categoría en la tabla 4. Con respecto a las características dentales, se observó que el 40.9% de los sujetos presentaron más de 5 órganos dentarios con caries, el 45.5% del total de los sujetos presentó una pérdida de más de 6 órganos dentarios y el 90.9% de los sujetos, presentó un índice CPO (índice de dientes cariados, perdidos y obturados) individual mayor a 6, lo que determina un riesgo muy alto de caries en esta cohorte con relación a la clasificación de la Organización Mundial de la Salud, descrita en el pie de la figura referenciada.

Se observó que los sujetos categorizados con riesgo grave, presentaron características periodontales deficientes, lo cual permitió identificar un estado de salud periodontal mayormente comprometido en estos sujetos. Considerando la prevalencia de enfermedad periodontal presente en estos sujetos, se toma en consideración para la descripción de los análisis posteriores.

Tabla 4. Resumen de características clínicas buco-dentales de la cohorte

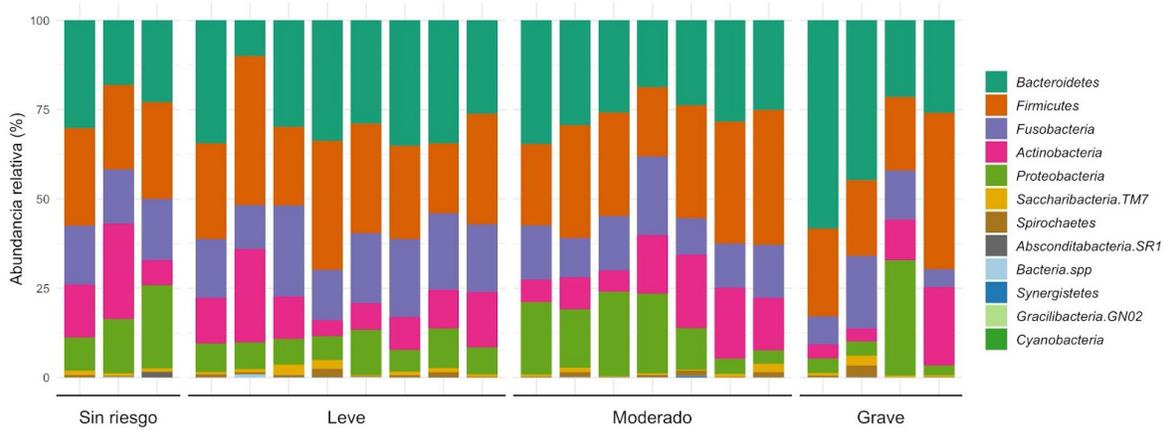
	<i>Sin riesgo</i> N=3	<i>Leve</i> N=8	<i>Moderado</i> N=7	<i>Grave</i> N=4	<i>p</i> <i>value</i>
Diagnóstico periodontal					
Gingivitis ^a	2 (66)	2 (25)	5 (71.4)	1 (25)	0.272
Periodontitis ^a	1 (33)	6 (75)	2 (28.6)	3 (75)	
Características dentales					
OD con caries >5 ^a	2(66.7)	3(37.5)	2(28.2)	2(50)	0.722
OD perdidos >6 ^a	2(66.7)	4(50)	2(28.6)	2(50)	0.732
Índice CPO >6 ^a	3(100)	8(100)	6(85.7)	3(75)	0.619
Características periodontales					
Nivel inserción >3mm ^a	1 (33)	6 (75)	2 (28.6)	3 (75)	0.272
Pérdida ósea >30% ^a	1 (33)	4 (50)	2 (28.6)	2 (50)	0.870
Movilidad ^a	Non	3 (37.5)	Non	2 (50)	0.136
Furca involucrada ^a	Non	Non	Non	1 (25)	0.318

^a Frecuencia (%) Valor de p □: Prueba exacta de Fisher. **OD**: órganos dentarios. Valores de referencia de la OMS con respecto al Índice CPO: Muy bajo 0-1.1, bajo 1.2-2.6, Moderado 4.5-6.5 y Muy alto >6.

4.2 Descripción taxonómica de la microbiota oral

La figura 7 detalla la abundancia relativa a nivel de phylum (Figura 7A) y género (Figura 7B) identificada en cada sujeto y se encuentran agrupados de acuerdo a la escala clínica de riesgo basado en la inflamación sistémica. De forma general, en los sujetos que desarrollaron el IAMCEST se observó que los phyla principales, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Actinobacteria* y *Proteobacteria* representan el 97% de la proporción de las muestras. De esta proporción, el phylum más abundante fue *Bacteroidetes*. En los sujetos categorizados sin riesgo, leve y moderado, se observó que el phylum *Firmicutes* fue el más abundante, seguido por *Bacteroidetes* y *Fusobacteria*. En los sujetos con riesgo grave, se observó que *Bacteroidetes* fue el phylum más abundante (37.8%), seguido de *Firmicutes* (27.3%) y *Fusobacteria* (11.7%) (Figura 7A). De igual forma, los 15 géneros más abundantes se presentan en la Figura 8; se observó que el más abundante fue *Prevotella*, particularmente en sujetos con riesgo grave (31.7%), seguido de sujetos con riesgo leve (20.1%), riesgo leve (17.6%) y riesgo moderado (13.8%). En los sujetos categorizados sin riesgo, se observó que *Corynebacterium* (11%), *Veillonella* (8.5%) y *Leptotrichia* (8.5%), fueron los géneros más abundantes. Por su parte, los sujetos categorizados con riesgo leve, presentaron una mayor abundancia de *Fusobacterium* (11.1%), *Veillonella* (9.9%) y *Leptotrichia* (7.7%); mientras que los sujetos con riesgo moderado fueron los géneros *Veillonella* y *Fusobacterium* (10% y 8.1%, respectivamente). Se consideraron 125 taxas con una abundancia menor del 1%, las se encuentran referenciadas en una sola clasificación dentro de la tabla referenciada.

A) Phylum



B) Género

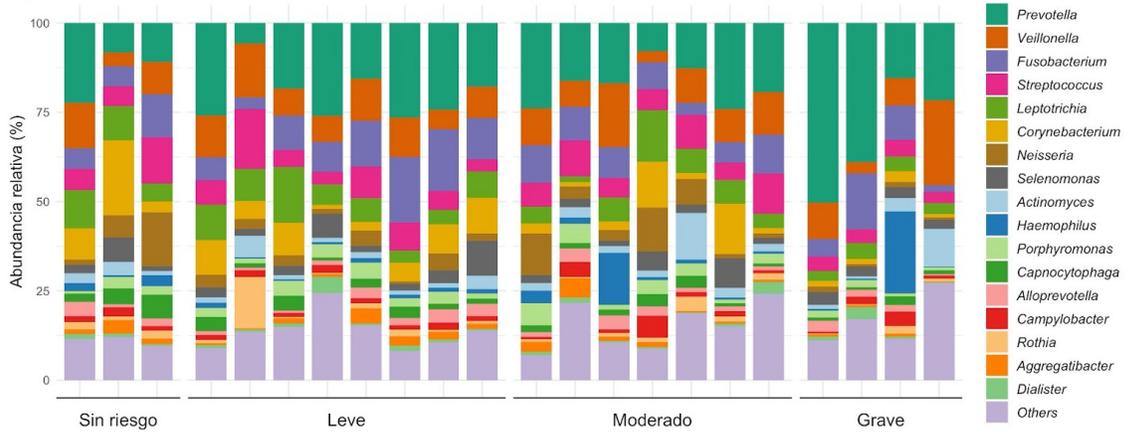


Figura 7. Abundancia relativa a nivel de phylum (A) y género (B) distribuida por la escala de riesgo basada en la inflamación sistémica. La categoría de otros, corresponde a géneros en una abundancia relativa <1%.

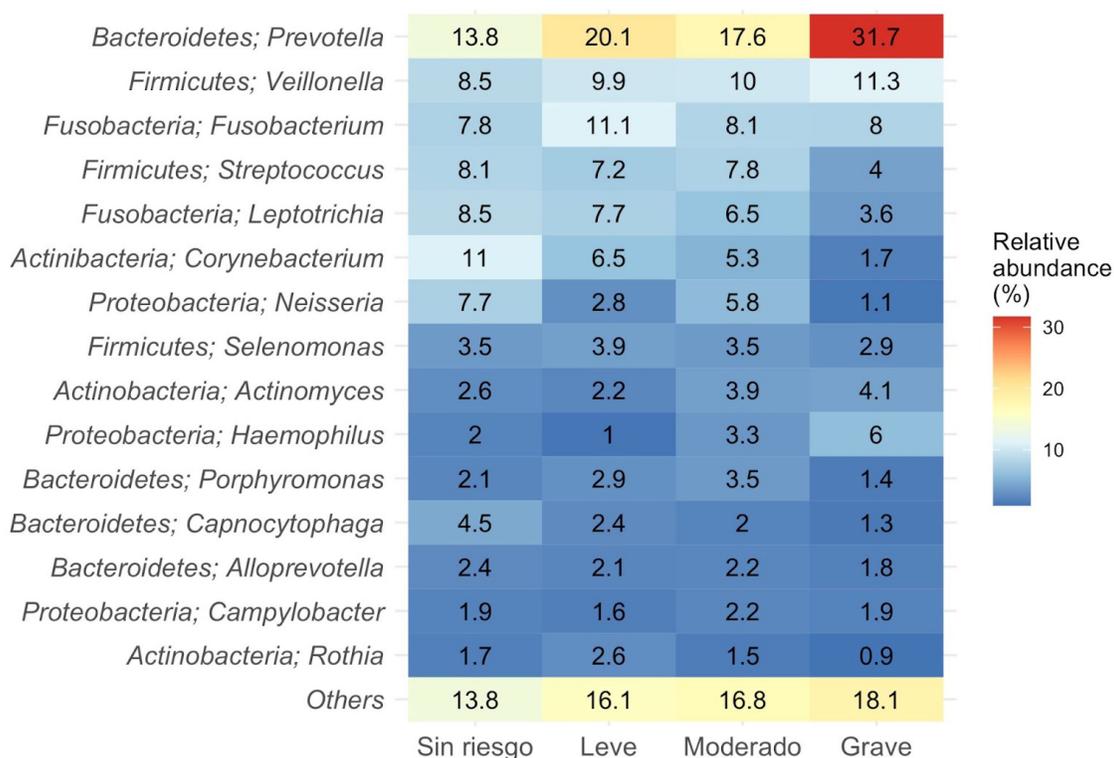


Figura 8. Abundancia relativa de los 15 géneros más frecuentes en la agrupación de los sujetos por la escala clínica de riesgo basado en la inflamación sistémica

La figura 9 detalla la abundancia relativa a nivel de phylum y género, donde los sujetos se encuentran agrupados de acuerdo a la escala de riesgo basada en la inflamación sistémica y al grado de enfermedad periodontal. Con respecto a la descripción de los sujetos con gingivitis y la clasificación de riesgo categorizados sin riesgo, leve y moderado, el tipo de phylum más abundante fue *Firmicutes* (25.4%, 34.2% y 26.8%), mientras que, en el sujeto categorizado con gingivitis y riesgo grave, *Bacteroidetes* fue el más frecuente (58.3%). Por otro lado, en sujetos con diagnóstico de periodontitis categorizados sin riesgo y riesgo moderado, el phylum *Firmicutes* presentó una abundancia mayor (27.1% y 27.6%), así como en sujetos con periodontitis y riesgo leve y grave, *Bacteroidetes* fue el más abundante (31.4% y 30.7%) (Figura 9A).

La descripción a nivel de género se muestra en la figura 9B, donde se observa que *Prevotella* presentó una mayor abundancia en la mayoría de los niveles de la escala clínica de riesgo basada en la inflamación sistémica, principalmente en sujetos con riesgo grave representando una frecuencia de 50.3% en sujetos con gingivitis y 25.3% en periodontitis. De forma particular, en los sujetos con gingivitis sin riesgo presentaron una mayor abundancia de *Corynebacterium* (14.8%) y *Leptotrichia* (10.1%); los sujetos con riesgo leve tienen una mayor proporción de los géneros *Veillonella* (13.3%) y *Streptococcus* (11.7%); mientras que, en los sujetos con riesgo moderado y grave, *Veillonella* (9.6 y 10.1%) y *Fusobacterium* (7.8 y 4.9%) tuvieron una mayor frecuencia.

En la figura 9B, se describe la proporción de géneros en sujetos con periodontitis; donde se observó que *Neisseria* se presentó en una proporción del 15% en el sujeto categorizado sin riesgo; mientras que en los sujetos con riesgo leve y moderado se identificaron géneros como *Fusobacterium* y *Veillonella* con una proporción mayor al 8%, al igual que en los sujetos con riesgo grave, que presentaron una proporción mayor de 9% de estos mismos géneros. Cabe aclarar que la clasificación de Otros, considera géneros identificados en una frecuencia menor al 1%.

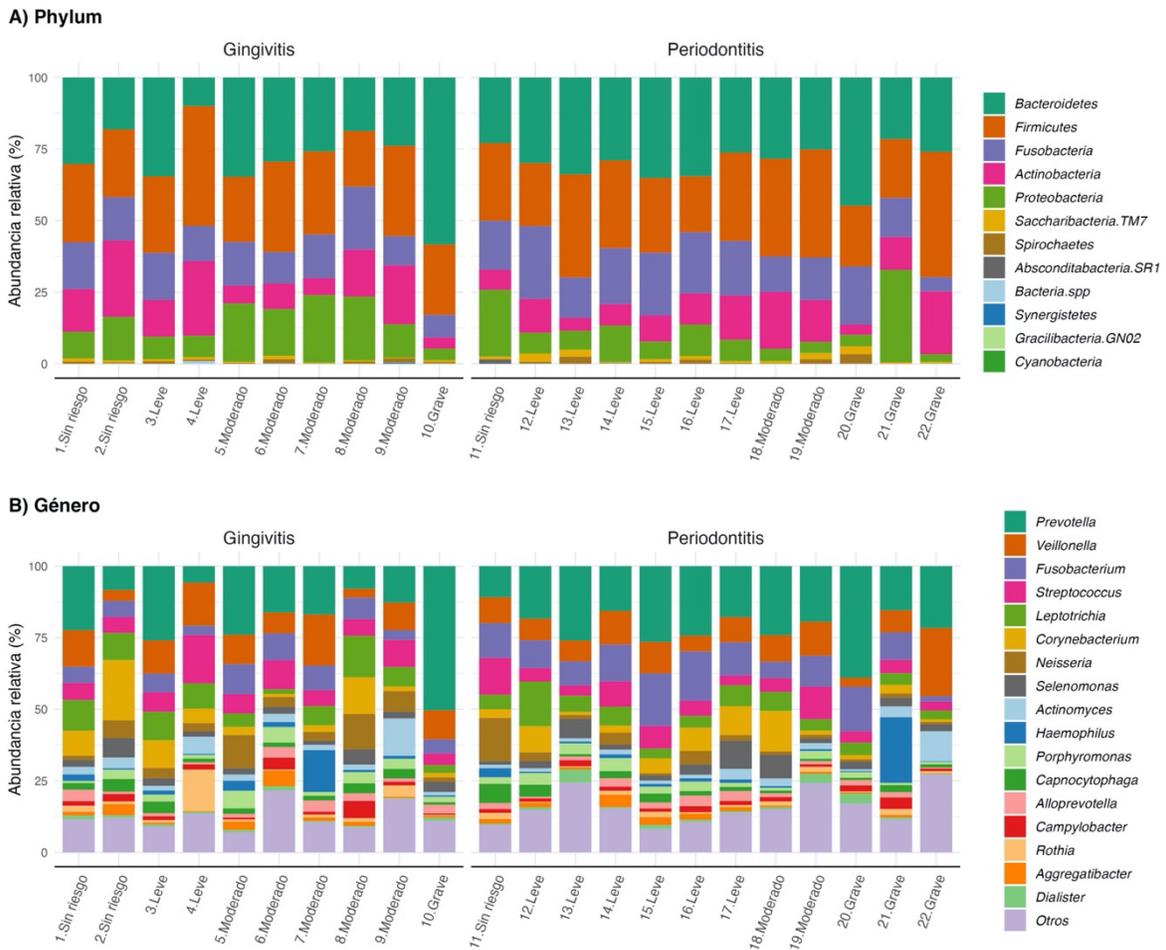


Figura 9. Abundancia relativa a nivel de phylum (A) y género (B) distribuida por el grado de enfermedad periodontal y la escala clínica de riesgo basada en la inflamación sistémica . La categoría de otros, corresponde a géneros en una abundancia relativa <1%.

En un análisis comparativo considerando la escala clínica de riesgo basado en la inflamación sistémica, se identificó el género *Absconditabacteria_(SR1)[G-1]* en un incremento en sujetos sin riesgo ($p.adjust=0.00002$, $log_2FoldChange=7.723$, DESeq2) (Figura 10).

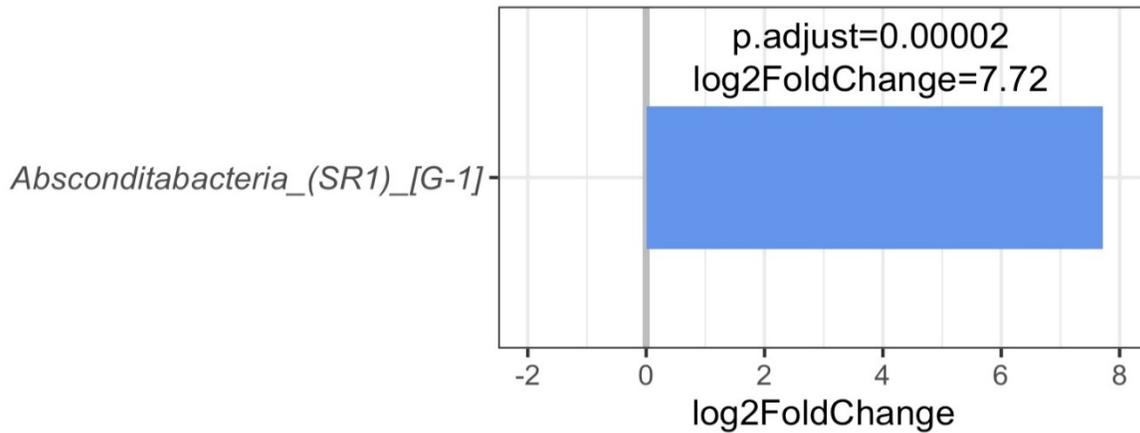


Figura 10. Gráfico de barra muestra el log2FoldChange de *Absconditabacteria_(SR1)_[G-1]* en sujetos sin riesgo de acuerdo con la escala de riesgo basada en la inflamación sistémica. (p.adjust=0.0002, log2FoldChange=7.723).

La figura 11 describe la abundancia relativa de los principales tipos de género considerando el grado de enfermedad periodontal; se observó que *Prevotella* es el género más abundante con una proporción mayor en sujetos con periodontitis, seguido de *Fusobacterium* y *Veillonella*; mientras que, en sujetos con gingivitis, además del género *Prevotella*, igualmente *Veillonella* y *Streptococcus* se presentaron en una abundancia mayor. En esta misma figura, se identifica la categoría de “otros”, donde se agrupan los géneros identificados en una proporción menor al 1%.

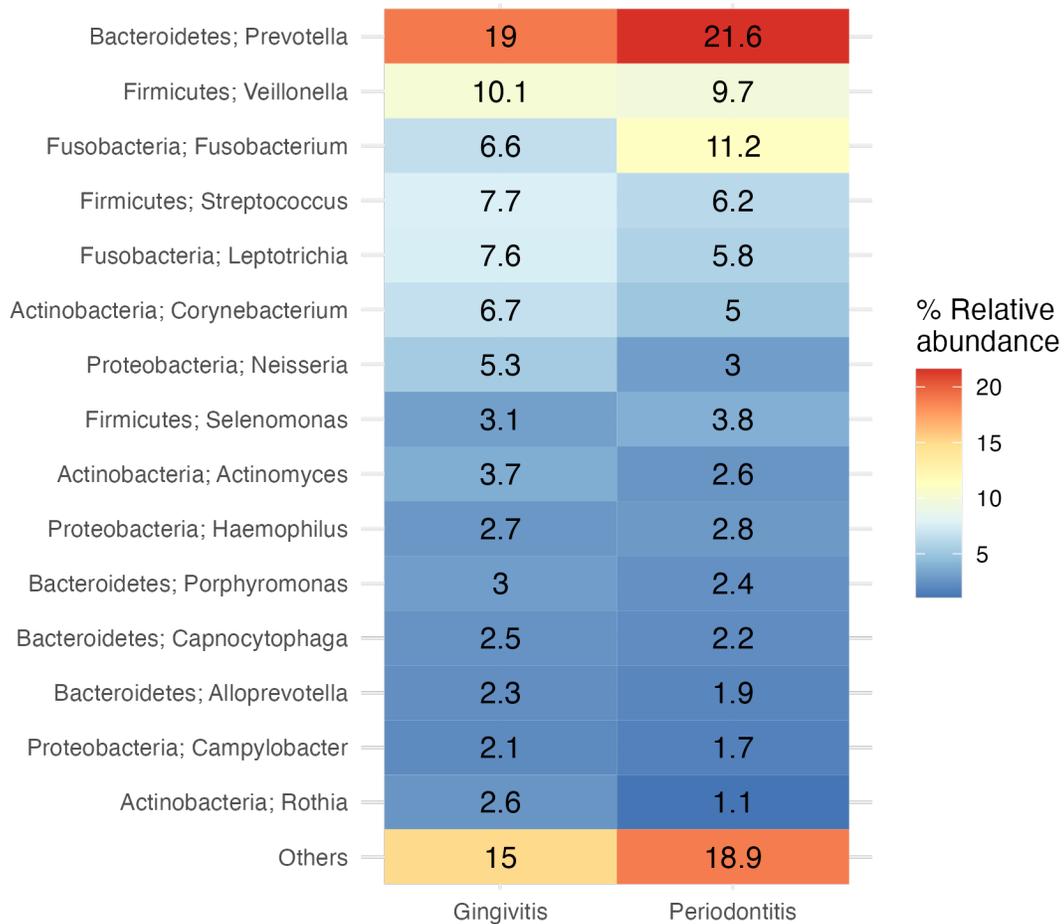


Figura 11. Abundancia relativa de los 15 géneros más frecuentes en la agrupación de los sujetos por enfermedad periodontal.

Con el objetivo de identificar taxas diferenciales entre los grupos con relación al grado de enfermedad periodontal, se realizó el análisis de discriminación lineal con efecto de tamaño (linear discriminant analysis effect size (LEfSe)); en dicho análisis, se determinó que géneros como *Fusobacterium* y *Atopobium* se encuentran asociados a sujetos con periodontitis; mientras que en sujetos con gingivitis se observó la asociación de géneros como *Lautropia* y *Neisseria* (LDA score 3.0, p=0.05) (figura 12).

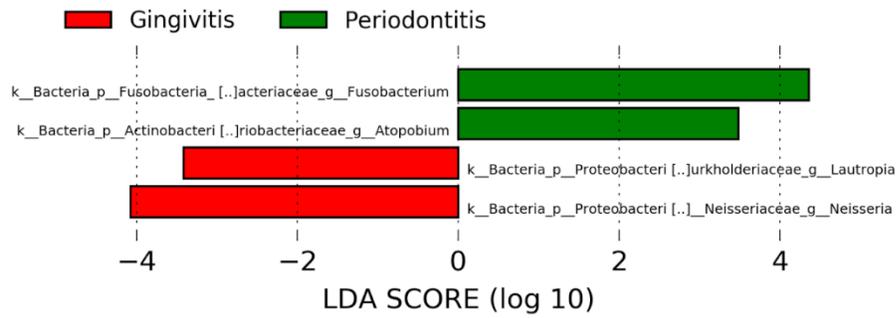
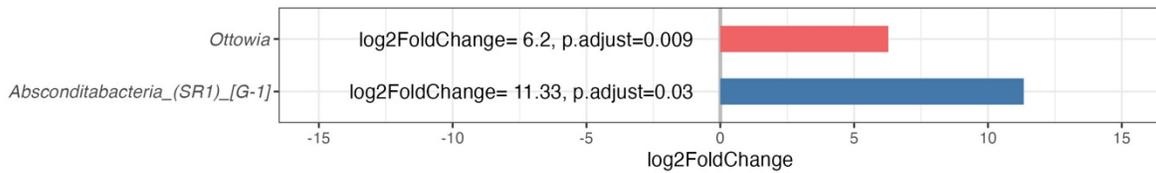
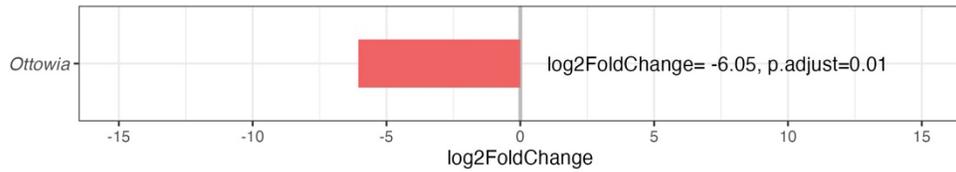


Figura 12. Análisis de discriminación lineal con efecto de tamaño. (LDA Effect Size “LEfSe”) relacionado al grado de enfermedad periodontal. LDA score 3.0, p=0.05

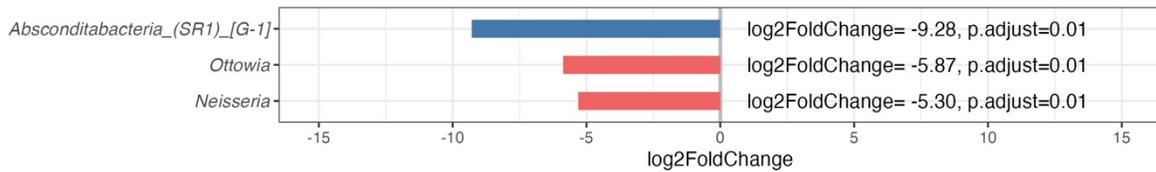
A) Sin riesgo con periodontitis



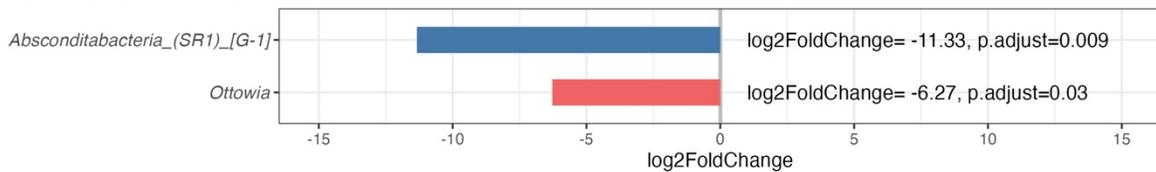
B) Riesgo leve con periodontitis



C) Riesgo moderado con periodontitis



D) Riesgo grave con periodontitis



Phylum ■ Proteobacteria ■ Absconditabacteria_(SR1)

Figura 13. Gráfico de barras que muestra los resultados del análisis comparativo a nivel de género con respecto a los sujetos categorizados por la escala clínica de riesgo basada en la inflamación sistémica y el grado de enfermedad periodontal. DESeq2(plataforma R), (log2FoldChange, p.adjustado).

Así mismo, se realizó el análisis comparativo a nivel de género bacteriano considerando el grado de enfermedad periodontal, sin obtener diferencias significativas. Sin embargo, este mismo análisis se aplicó en los sujetos categorizados en la escala clínica de riesgo en interacción con el grado de enfermedad periodontal; donde se identificaron diferencias significativas en géneros como *Otovia* y *Absconditabacteria_(SR1_[G-1])*, los cuales se encontraron en mayor abundancia en sujetos con riesgo leve y periodontitis; por el contrario, estos mismos géneros se presentaron con diferencias significativas y disminuidos en los sujetos con periodontitis y riesgo leve, moderado y grave (Figura 13).

La figura 14 muestra el análisis de significancia de diversidad alfa considerando como variable de agrupación el grado de enfermedad periodontal (Mann-Whitney) y la escala clínica de riesgo basado en la inflamación sistémica (Kruskall-Wallis); en este punto, no fue posible determinar diferencias significativas. Mediante el índice de Shannon se observó una mayor diversidad en sujetos con periodontitis clasificados con riesgo moderado y leve (mediana 7.4 y 7.36, IQR 0.2 y 0.52); mientras que el menor índice de diversidad, se presentó en sujetos con periodontitis categorizados con riesgo grave (mediana 6.57, IQR 0.55). Por otro lado, el análisis derivado del índice de Chao1 determinó que la mayor riqueza se identifica en sujetos con periodontitis y riesgo leve (mediana 596.11; IQR 129.9) y la menor riqueza se observó en sujetos con gingivitis y riesgo leve (mediana 486.25, IQR 122.28). Así mismo, se presenta el análisis determinado por el índice de Observed features, donde se determina que los sujetos diagnosticados con gingivitis con riesgo grave presentan una mayor riqueza; mientras que los sujetos con periodontitis presentan una menor riqueza en sujetos con riesgo grave.

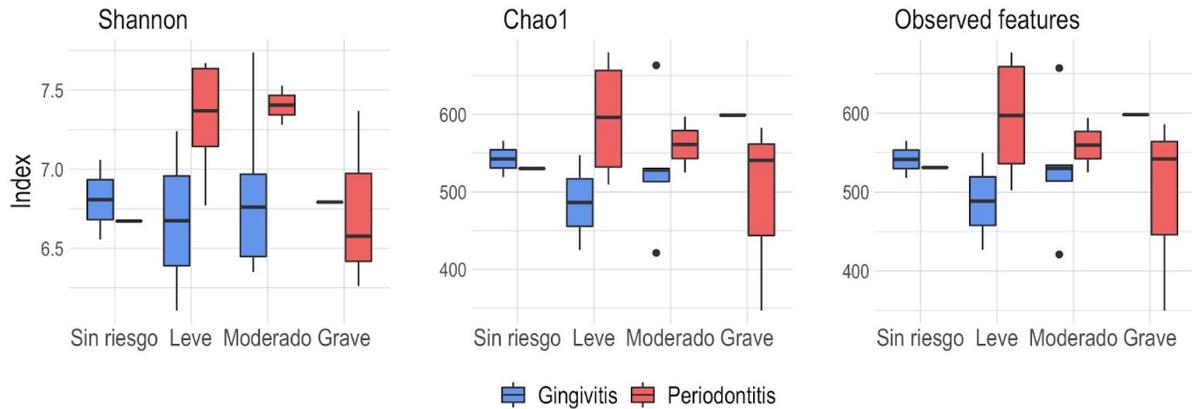


Figura 14. Análisis de diversidad Alpha mediante el índice de Shannon, Chao1 y Observed features categorizado por la escala de riesgo basado en la inflamación sistémica y el grado de enfermedad periodontal

Se estableció el análisis de la microbiota oral en los sujetos de esta cohorte, identificando la varianza de las muestras por medio de la diversidad beta de acuerdo a los distintos parámetros de estratificación de riesgo: la escala clínica de riesgo basado en la inflamación sistémica, clasificación Killip Kimball , el número de arterias coronarias afectadas, escala TIMI (término en inglés, Thrombolysis in myocardial infarction score), la escala GRACE, así como la presencia de algún evento cardiovascular mayor adverso (término en inglés, mayor adverse cardiovascular event “MACE”). El análisis de diversidad beta se aplicó para determinar la homogeneidad y la varianza de grupos bacterianos entre grupos por medio del índice de Bray Curtis mediante la prueba BETADISPER y PERMANOVA. El análisis de homogeneidad de la dispersión de grupos, fue asignado para la escala de riesgo basado en la inflamación sistémica y el grado de enfermedad periodontal, donde se demostró una homogeneidad entre los grupos ($p > 0.05$, BETADISPER).

La figura 15 presenta el análisis de coordenados principales donde determina la distribución de los sujetos de acuerdo a la escala clínica de riesgo basado en la inflamación sistémica, considerando que el 14% de la varianza de la muestra, se relaciona con esta variable ($R^2= 0.14$, $p=0.873$). Por otro lado, la clase Killip Kimball definida en esta cohorte, se aprecia que la mayoría de los sujetos fueron catalogados sin insuficiencia cardiaca y se determina que el 13% de la varianza se relaciona con el grado de insuficiencia cardiaca basada en la clase Killip-Kimball ($R^2=0.13$, $p=0.129$). El número de arterias afectadas se encuentra definido por las arterias coronarias: descendente anterior, circunfleja y coronaria derecha; de acuerdo a esta variable, se define que la varianza es del 7% ($R^2=0.07$, $p=0.84$). Por otro lado, la escala de TIMI ($R^2=0.44$, $p=0.122$) determina una varianza de 44% asociados a cada variable, mientras que el análisis con la escala GRACE definió una varianza del 20% con una diferencia significativa ($R^2=0.20$, $p=0.026$). Finalmente, se observa la distribución de los sujetos relacionado con la presencia de un evento mayor cardiovascular adverso, definiendo una varianza de 5% influenciada por esta variable ($R^2=0.05$, $p=0.18$).

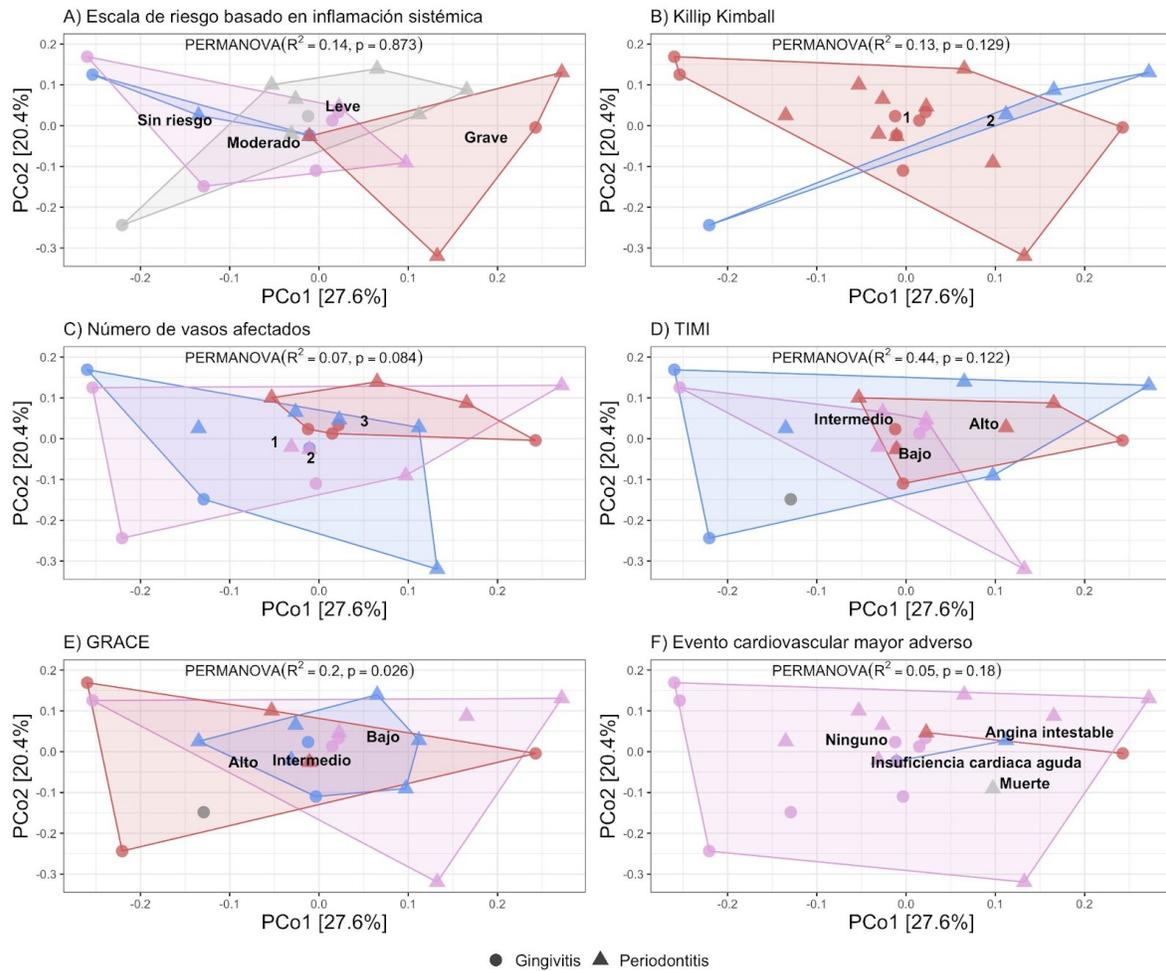


Figura 15. Análisis de coordenados principales de la diversidad Beta mediante el índice de Bray Curtis relacionado a la escala de riesgo basado en la inflamación sistémica y el grado de enfermedad periodontal (R^2 , PERMANOVA, valor de p). **A)** Escala de riesgo basado en la inflamación sistémica: Sin riesgo (azul), riesgo leve (gris), moderado (rosa), grave (rojo) ($R^2=0.14$, $p=0.873$). **B)** Killip-Kimball clase 1: sin signos clínicos o falla cardíaca (azul), clase 2: falla cardíaca moderada (rojo) ($R^2=0.13$, $p=0.129$). **C)** Número de arterias afectadas: una (azul), dos (rosa) y tres (rojo) ($R^2=0.07$, $p=0.084$). **D)** Escala TIMI: bajo (azul), intermedio (rosa) y alto (rojo) ($R^2=0.44$, $p=0.122$). **E)** Escala GRACE: bajo (azul), intermedio (rosa) y grave (rojo) ($R^2=0.20$, $p=0.026$). **F)** Evento cardiovascular mayor adverso: angina inestable (gris), insuficiencia cardíaca aguda (rojo), muerte (azul) y ningún evento (rosa) ($R^2=0.05$, $p=0.18$).

El análisis de diversidad Beta se aplicó para la variable del grado de enfermedad periodontal; se determinó que la varianza de la muestra de acuerdo a esta variable, es de 3.9% y no determinan diferencias significativas entre grupos (PERMANOVA, R^2 0.039, $p=0.455$) . La figura 16 muestra la representación del análisis de coordenados principales de acuerdo al grado de enfermedad periodontal. Con este análisis, se demostró que la diversidad de la microbiota oral es dependiente de cada sujeto.

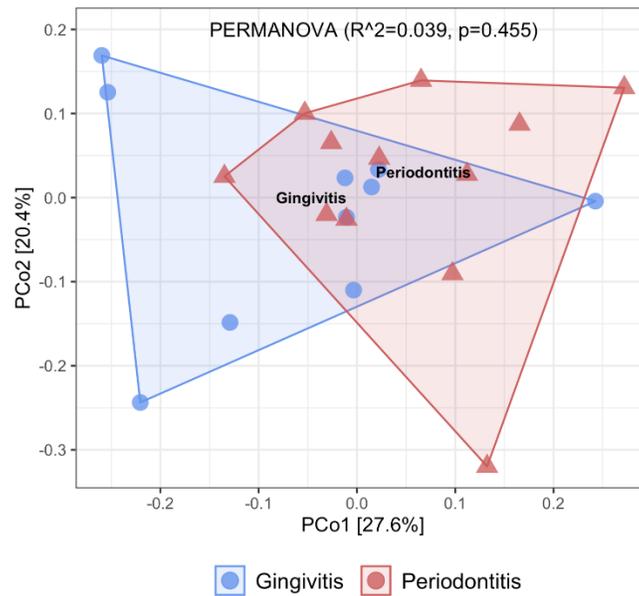


Figura 16. Análisis de coordenados principales de la diversidad Beta mediante el índice de Bray Curtis relacionado con el grado de enfermedad periodontal (R^2 , PERMANOVA, valor de p). ($R^2=0.039$, $p=0.455$).

4.3 Concentración de citocinas

El análisis de concentración de citocinas se muestra en la figura 17, agrupados con respecto a la escala de riesgo basado en inflamación sistémica y considerando la distribución de los sujetos clasificados mediante el grado de enfermedad periodontal; cabe mencionar que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las distintas comparaciones entre grupos. Con respecto al análisis de concentración de cada grupo dentro del escala de riesgo basado en inflamación sistémica, se observó que los sujetos categorizados sin riesgo, presentaron una mediana más elevada de la concentración de IL 1 β (mediana 24.19 pg/ml), TNF (mediana 84.65 pg/ml), IL 10 (mediana 25.01 pg/ml) y TGF β (mediana 245.31 pg/ml), así como una disminución en la concentración de IL 6 (mediana 146.73 pg/ml) con relación a los otros grupos de riesgo. Mientras que en sujetos con inflamación moderada se observó una concentración elevada con respecto a los otros grupos de IL 6 (median 267.83 pg/ml), IL 8 (median 21.67 pg/ml), IL 4 (mediana 382.31 pg/ml) e IL 17A (mediana 18.25 pg/ml) y finalmente, en sujetos con riesgo grave se determinó una mediana mayor de IFN γ (mediana 85.24 pg/ml). También es de importancia considerar que en sujetos con riesgo grave, se observó un decremento de la concentración de IL 1 β , TNF, IL 10, IL 4 e IL 17A; mientras que en sujetos con riesgo leve, se observó una menos concentración de IFN γ e IL 8 (Figura 17).

La tabla suplementaria 1 muestra la relación de la concentración de cada citocina de forma general en los sujetos, así como su agrupación mediante la escala de riesgo basado en inflamación sistémica; en dicha tabla, se puede definir que no existen diferencias estadísticamente significativas entre grupos de riesgo. Con relación al grado de enfermedad periodontal, no se encontraron diferencias significativas; sin embargo, la concentración más elevada del total de las citocinas corresponde a sujetos diagnosticados con periodontitis. De igual forma, se realizó un análisis de correlación Spearman para

determinar la relación de la concentración de las citocinas con la escala de riesgo basado en inflamación sistémica, encontrando una correlación positiva leve con la concentración de IL 6, IFN γ e IL 8; mientras que el grado de enfermedad periodontal, presentó una correlación negativa leve con la concentración de IL 6 y una correlación positiva con el resto de las citocinas.

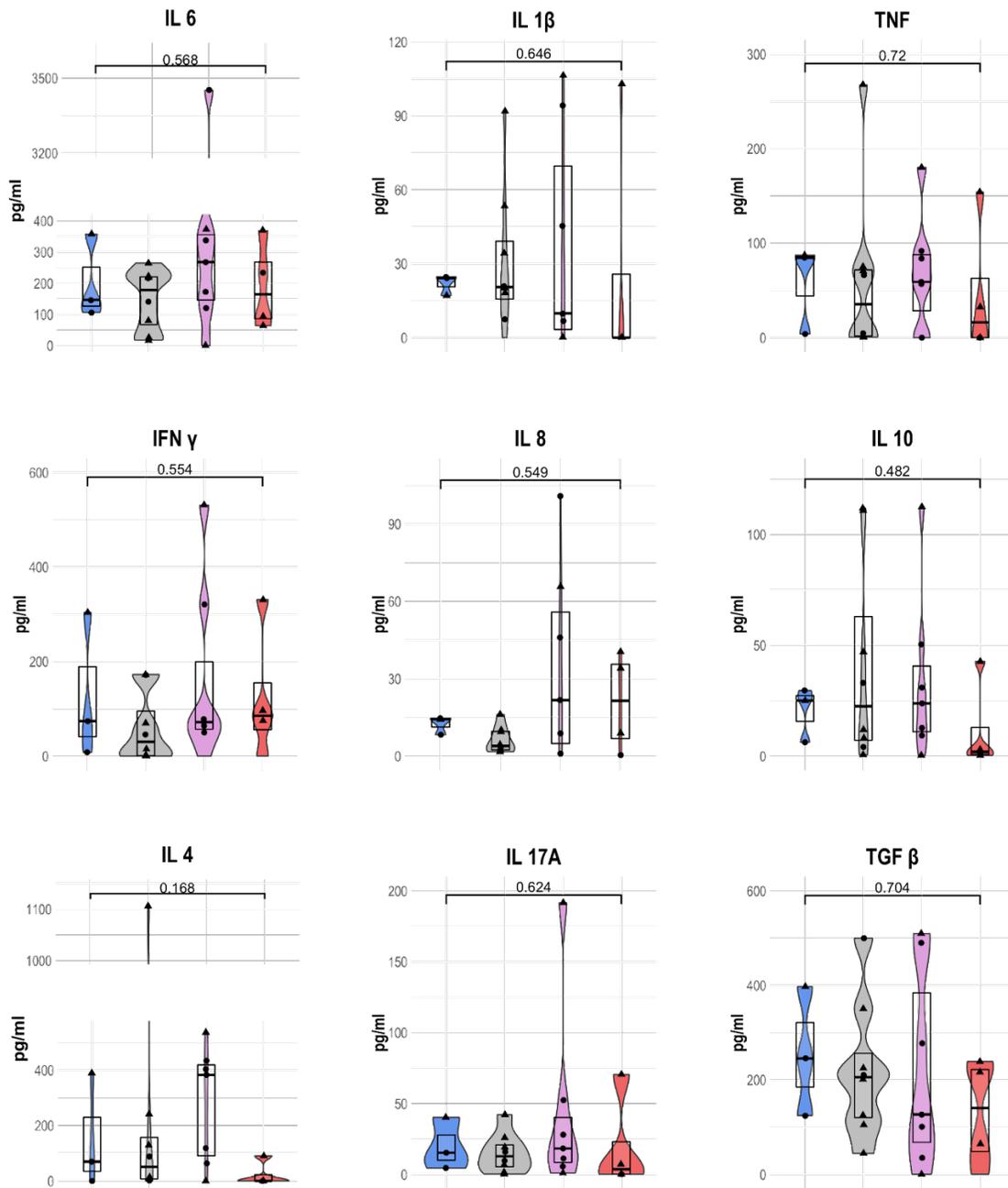


Figura 17. Concentración de citocinas en suero (pg/ml) de acuerdo a la escala de riesgo basado en la inflamación sistémica, se muestra el valor de la mediana y el cuartil 25 y 74, valor de p, Kruskal Wallis.

4.4 Concentración de N-óxido de trimetilamina

Se realizó la cuantificación de N-óxido de trimetilamina (TMAO) en plasma de 16 sujetos; de forma general, se determinó una concentración mínima de 0.3 nmol/ml y una concentración máxima de 6.6 nmol/ml (mediana 0.8 nmol/mL); únicamente se incluyó un sujeto de género femenino y el mínimo de edad fue de 36 años y el máximo de 78 años, sin presentar diferencias estadísticas en la comparación entre grupos (Tabla 5). La figura 18A presenta la concentración de TMAO con respecto a la categorización mediante la escala de riesgo basado en la inflamación sistémica, se observó que los sujetos con riesgo moderado, presentaron la mediana de la concentración mayor (2.36 nmol/ml) y la concentración menor con respecto a la mediana, se identificó en sujetos sin riesgo (0.59 nmol/ml). Por otro lado, se identificó que el 62.5% de los sujetos presentó al menos un factor de riesgo estándar, como hipertensión, diabetes, dislipidemia y/o tabaquismo activo, observando que los sujetos que no presentaron algún factor de riesgo, presentaron una concentración más elevada con respecto a la mediana que los sujetos con factores de riesgo presentes (Figura 18B).

Tabla 5. Cuantificación de N-óxido de trimetilamina

	<i>Total</i>	<i>Sin riesgo N=3</i>	<i>Leve N=6</i>	<i>Moderado N=3</i>	<i>Grave N=4</i>	<i>p value</i>
N-óxido de trimetilamina ^a	0.86(0.93)	0.59(0.31)	0.82 (0.26)	2.36(3.16)	0.85(1.09)	0.67
Masculino ^b	15/16	3/3	6/6	3/3	3/4	0.62
Edad ^a	61(36-78)	62(56-70)	58(48-69)	74(36-78)	62(55-75)	0.77
Factores de riesgo >1 ^b	10/16	3/3	3/3	2/3	2/2	0.67

N-óxido de trimetilamina (nmol/mL) en plasma distribuida por la escala de riesgo basado en la inflamación sistémica, mediana (IQR, calculado mediante bisagras de Tukey). Edad: mediana (mínimo-máximo). ^a valor p: Prueba exacta de Fisher. ^b Frecuencia, valor p: Kruskal-Wallis.

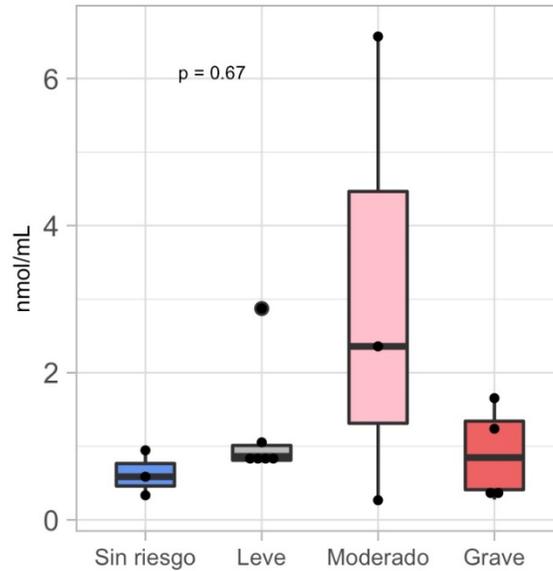


Figura 18. Cuantificación de N-óxido de trimetilamina (nmol/ml) en plasma distribuida por la escala de riesgo basado en la inflamación sistémica, valor de p: Kruskal-Wallis. p: Wilcoxon

4.5 Cuantificación de lipopolisacárido en plasma

Se realizó la cuantificación de 11 muestras de plasma de los sujetos de estudio; la figura 19 muestra las condiciones del ensayo realizado, donde se aprecia los sujetos categorizados por la escala de riesgo basado en la inflamación sistémica y el grado de enfermedad periodontal, así como la inclusión de un sujeto control, el cual corresponde a un sujeto de género masculino de 59 años de edad, así como un control positivo. Se observó que solo dos muestras correspondientes a sujetos categorizados con riesgo leve y periodontitis, se identificó una concentración de 0.0032 EU/ml y 0.1237 EU/ml.

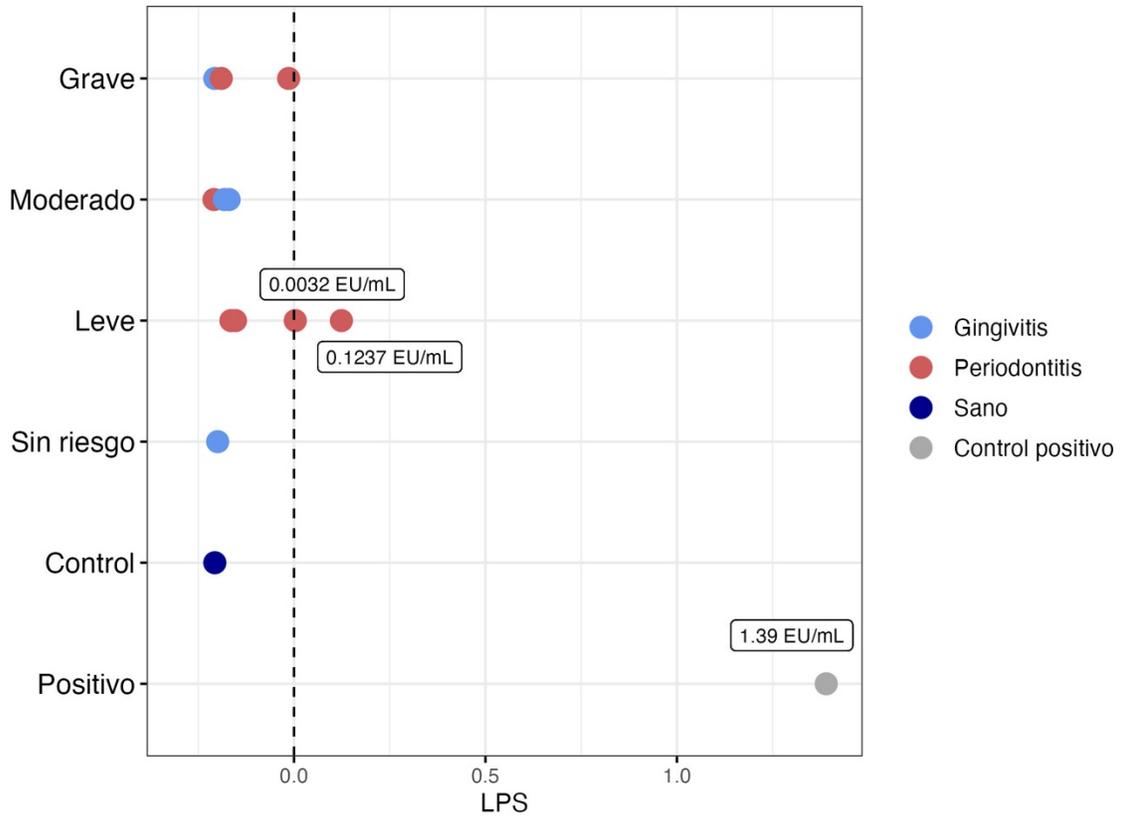


Figura 19. Cuantificación de lipopolisacárido en plasma distribuida por la escala de riesgo basado en la inflamación sistémica y el grado de enfermedad periodontal.

4.6 Análisis de correlación de la diversidad del microbioma oral y marcadores bioquímicos

4.6.1 Correlación entre géneros bacterianos y citocinas

Con el objetivo de identificar la correlación entre la diversidad del microbioma oral y el estado inflamatorio de los sujetos, se definieron matrices de correlación Spearman. La figura 20 describe los géneros con mayor abundancia, algunos de ellos se identificaron con diferencias estadísticamente significativas en la comparación realizada entre las variables, así mismo, se enlistan las diferentes citocinas pro y antiinflamatorias cuantificadas en suero. De primera instancia, considerando a todos los sujetos de esta cohorte de esta cohorte, se observó que el género *Prevotella* se correlaciona de forma positiva y significativa ($R=0.63$, $p=0.0001$) con una concentración elevada de IL 6. El género *Fusobacterium* presenta resultando una correlación positiva significativa con TGF β ($R=0.4174$, $p=0.04$). Es de importancia considerar correlación negativa significativa entre *Leptotrichia* con la concentración de IL 1 β ($R= -0.54$, $p=0.03$), TFN ($R= -0.54$, $p= 0.02$), INF γ ($R= -0.62$, $p= 0.01$), IL 10 ($R= -0.80$, $p=0.01$), IL 17A ($R= -0.54$, $p=0.04$) y TGF β ($R= -0.58$, $p=0.005$); mientras que *Corynebacterium* presentó una correlación positiva moderada y significativa con la concentración de INF γ ($R= -0.51$, $p=0.04$). Finalmente, *Capnocytophaga* presentó una correlación negativa significativa con la concentración de IFN γ ($R= -0.58$, $p=0.04$) y *Aggregatibacter* se correlaciona de forma positiva leve y significativa con IL 10 ($R= -0.18$, $p=0.004$) e IL 17A ($R= -0.16$, $p= 0.01$). Finalmente, esta misma figura permite identificar la interacción que guardan los géneros bacterianos más abundantes; por ejemplo, se definió una correlación inversa y significativa entre *Prevotella* y géneros como *Streptococcus* ($R= -0.44$, $p= 0.01$), *Neisseria* ($R= -0.56$, $p= 0.04$) y *Capnocytophaga* ($R= -0.48$, $p= 0.03$); así como una

correlación positiva y significativa entre géneros como *Leptotrichia* con *Corynebacterium* (R= 0.67, p= 0.002) y *Capnocytophaga* (R= 0.48, p=0.04); así como una correlación positiva moderada y significativa de *Capnocytophaga* con *Neisseria* (R= 0.65, p=0.001).

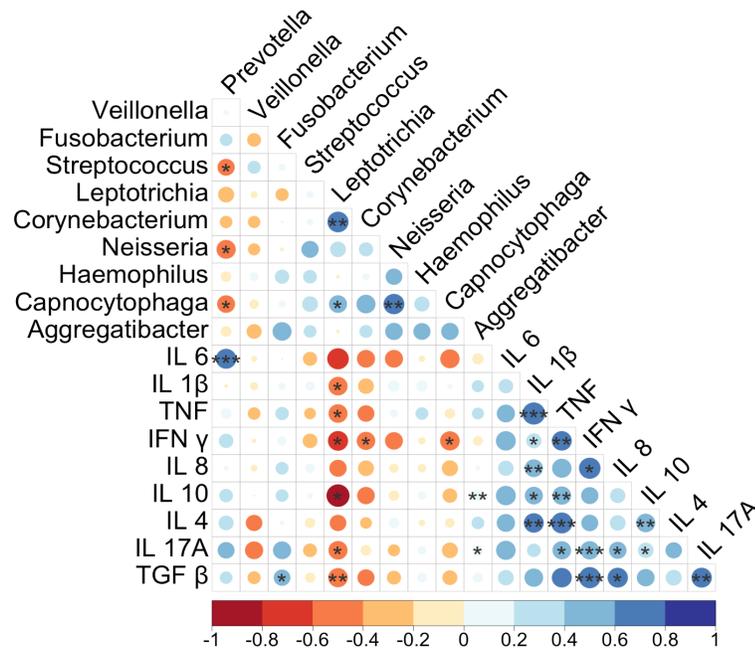


Figura 20. Análisis de correlación de la diversidad del microbioma oral y la cuantificación de citocinas en suero. Correlación de Spearman, p value (*<0.05, ** <0.01, ***<0.001).

4.6.2 Correlación entre el microbioma oral, marcadores bioquímicos y el N-óxido de trimetilamina

Con el objetivo de identificar la participación de los géneros bacterianos de cavidad oral y la disbiosis intestinal, definida en estos sujetos por la concentración (log) de N-óxido de trimetilamina (TMAO), se estableció un análisis de correlación Spearman de los principales géneros bacterianos de cavidad oral con la concentración de N-óxido de trimetilamina; los géneros incluidos en este análisis fueron seleccionados debido a la alta prevalencia identificada en estos sujetos. De este modo, se determinó una correlación positiva y significativa con *Porphyromonas* (R=0.56, p=0.02), así mismo, se identificó una correlación positiva de este género con *Aggregatibacter* (R=0.73, p=0.001). De igual forma, se determinó una correlación positiva moderada de TMAO con triglicéridos (R=0.51, p=0.04), así como una correlación negativa moderada con lipoproteína de baja densidad (R=-0.52, p=0.04) (Tabla 6). Con este hallazgo, podemos sugerir que la participación de la microbiota oral podría influir en un estado de disbiosis intestinal, promoviendo así, la presencia de TMAO

Tabla 6. Análisis de correlación de la concentración de N-óxido de trimetilamina, microbioma oral y parámetros bioquímicos

		Correlación	p value	95% IC	
				Mínimo	Máximo
TMAO(log)	<i>Porphyromonas</i>	0.56	0.02	0.071	0.834
	Triglicéridos	0.51	0.04	0.004	0.813
	Lipoproteína de alta densidad	-0.52	0.04	-0.816	-0.148
<i>Porphyromonas</i>	<i>Aggregatibacter</i>	0.73	0.001	0.383	0.903

Correlación Pearson. CI: intervalo de confianza.

4.6.3 Correlación de N-óxido de trimetilamina y lipopolisacárido con citocinas

Se estableció un análisis de correlación entre la cuantificación de N-óxido de trimetilamina en plasma y citocinas en suero; se observó una correlación positiva con la concentración de IL 1 β e IL 8 (R=0.3 y R=0.38, respectivamente), mientras que una correlación negativa fue identificada con la IL 6 e IL 17A (R= -0.41 y R= -0.28, respectivamente); dichas correlaciones no resultaron en diferencias significativas, mientras que el resto de las correlaciones no fueron relevantes. Por otro lado, la cuantificación de lipopolisacárido definida en un solo sujeto de la cohorte, se observó una correlación negativa no significativa con TGF β e IFN γ (R= -0.26 y R= -0.24, respectivamente) (Figura 21).

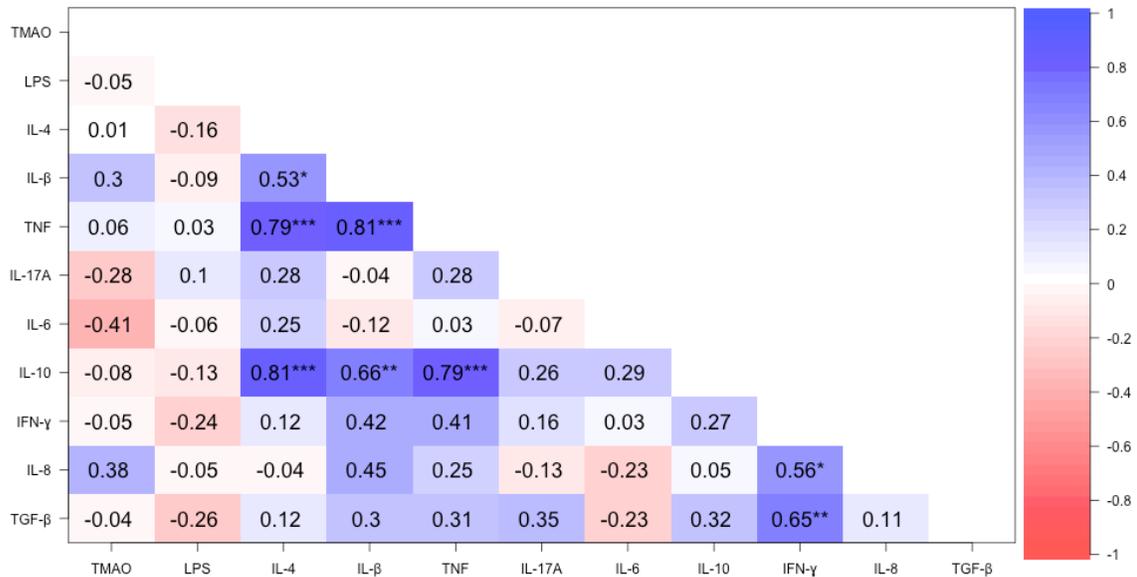


Figura 21. Coeficiente de correlación de la la cuantificación de N-óxido de trimetilamina en plasma y citocinas en suero (R, p value (*<0.05, ** <0.01, ***<0.001).

4.6.4 Correlación entre el N-óxido de trimetilamina y marcadores bioquímicos

En el análisis de correlación de la concentración de N-óxido de trimetilamina con los marcadores bioquímicos, se observó una correlación positiva y significativa con los triglicéridos, así como una correlación negativa y significativa con la lipoproteína de alta densidad. De igual forma, se identificó una correlación negativa moderada con la concentración de glucosa y la escala TIMI, así como una correlación positiva moderada no significativa con el índice aterogénico y el índice de masa corporal (Figura 22).



Figura 22. Coeficiente de correlación de la la cuantificación de N-óxido de trimetilamina en plasma y marcadores bioquímicos (R, p value (*<0.05, ** <0.01, ***<0.001). TIMI: Escala de trombolisis en infarto al miocardio, HDL: lipoproteína de alta densidad, LDL: Lipoproteína de alta densidad, cTnI: Troponina cardiaca I, BMI: índice de masa corporal.

5. Discusión

En el presente estudio, el análisis del microbioma oral determinó una relación del phylum *Bacteroidetes* en el desarrollo del IAMCEST, particularmente el género *Prevotella*, además de identificar una mayor abundancia en sujetos con riesgo grave. Por su parte, un análisis realizado en sujetos IAMCEST, determinó que en cavidad oral hubo un decremento significativo en el phylum *Firmicutes* y el género *Haemophilus*, así como un incremento en el phylum *Bacteroidetes* comparado con sujetos control; esta misma relación se pudo observar en la presente cohorte, al determinar al phylum *Bacteroidetes* como el más abundante, principalmente en sujetos con riesgo grave (70). Igualmente, el análisis realizado en distintas poblaciones con relación a los factores de riesgo de enfermedad cardiovascular, determinaron que *Prevotella*, *Veillonella* y *Streptococcus* se encuentran en una abundancia mayor en sujetos con un riesgo cardiovascular elevado, mientras que *Neisseria* se asocia a un riesgo menor de enfermedad cardiovascular (94). Algunos otros análisis realizados en sujetos IAM o aterosclerosis, han determinado una mayor abundancia del phylum *Firmicutes*; sin embargo, hay que recalcar que las muestras analizadas difieren con la toma de muestra del presente análisis (68,69,95).

La evaluación oral de los sujetos de esta cohorte, determinó que todos ellos presentaron algún grado de enfermedad periodontal, principalmente periodontitis en más de la mitad de la población, estos sujetos presentaron una mayor abundancia del género *Prevotella* y *Fusobacterium*. Esta aseveración coincide con los hallazgos de la literatura, donde *Fusobacterium* se identifica en sujetos con periodontitis en una relación positiva con respecto a un grado de enfermedad periodontal más agresivo; por su parte, en otra cohorte de sujetos con periodontitis, *Prevotella* fue identificado como el género más abundante (96-98). Por otro lado, el género *Fusobacterium* se ha identificado en muestras de heces y que incluso, especies como *Fusobacterium nucleatum* se ha

relacionado con el desarrollo de cáncer colorectal (99). Así mismo, en el presente análisis se determinó que el género *Neisseria* decrece en sujetos con periodontitis; comparando con otros análisis que detallan que este género, se asocia a estado de salud oral (100). Otros análisis han identificado los géneros *Veillonella* y *Streptococcus* con mayor abundancia en sujetos sanos; en la presente cohorte, ambos géneros fueron identificados de forma abundante en sujetos categorizados con gingivitis; en este punto, habrá que considerar que el diagnóstico de gingivitis se determinó principalmente por el eritema y sangrado gingival, probablemente asociado al impedimento de los pacientes de realizar su higiene bucodental, descartando signos de una enfermedad periodontal grave (96).

La comparación entre grupos, determinó la presencia de *Absconditabacteria*_(SR1)_[G-1] incrementada en sujetos sin riesgo de acuerdo a la escala de inflamación sistémica; la revisión de un análisis de microbiota salival en sujetos con apnea obstructiva crónica (101). De igual manera, este género ha sido identificado en una mayor abundancia muestras de saliva en sujetos con enfermedad inflamatoria intestinal y lo relaciona con citocinas inflamatorias (102).

Por otro lado, se identificó el género *Lautropia* como un biomarcador en sujetos con gingivitis en esta cohorte; mientras que este mismo género, se ha definido una mayor abundancia en sujetos con hipertensión (101); y particularmente la abundancia de la especie *Lautropia mirabilis* se ha relacionado con una sobrerregulación de IL 6 y TNF en sujetos que desarrollaron carcinoma oral de células escamosas (103). De igual manera, en el presente estudio se identificaron los géneros *Fusobacterium* y *Atopobium* como biomarcadores en sujetos con periodontitis, lo cual coincide con el hallazgo en sujetos hispanos con periodontitis moderada/grave, donde mediante el análisis LEfSe identificaron estos dos géneros con una mayor abundancia. De igual forma, habrá que

considerar que los sujetos con periodontitis y hábito de tabaquismo presente se identifica el género *Veillonella* en mayor abundancia (100).

Existe una relación antagónica entre géneros bacterianos; de forma general, en el presente estudio se determinó una correlación negativa de *Prevotella* con géneros como *Streptococcus*, *Neisseria* y *Capnocytophaga*; este hallazgo coincide con el análisis de sujetos con periodontitis, donde existe una correlación negativa de patobiontes con relación a géneros asociados a salud oral, como *Capnocytophaga*, *Rothia*, *Veillonella*, *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Corynebacterium*, *Leptotrichia* y *Actinomyces* (12,96, 104-106). Otro punto relevante es que el análisis realizado por otro grupo de estudio, sobre el perfil taxonómico en sujetos que recibieron un tratamiento odontológico periodontal, observaron una disminución de géneros patógenos como *Porphyromonas*, *Tanerella*, *Prevotella* y *Filifactor*, así como el aumento en la abundancia de especies asociadas a salud previamente mencionadas, sustentando que la microbiota se asocia de forma importante con el desarrollo de enfermedad periodontal y que esta puede ser modificable con la intervención odontológica (105). Incluso, en sujetos con antecedentes de enfermedades arteriales coronarias, incluyendo un IAM previo, lograron establecer una relación entre las terapias periodontales y un decremento en la concentración de biomarcadores asociados a dichas enfermedades (107). En ese sentido, una cohorte prospectiva determinó una relación inversa con los anticuerpos IgG asociados a la especie *Tanerella forsythia* y el riesgo de mortalidad en sujetos con IM (108).

Con respecto al análisis de diversidad alpha de esta cohorte de pacientes, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas comparando las variables de agrupación; sin embargo, se observó que la abundancia y la riqueza decrecen en sujetos con periodontitis y riesgo grave. En la comparación con otros análisis aplicados sobre sujetos sanos y periodontitis, han determinado que no existen diferencias significativas en

la abundancia de especies y coincide con una menor riqueza en sujetos con periodontitis. Existen estudios que detallan una mayor diversidad de especies en sujetos periodontitis, algunos otros reportan un decremento en la diversidad en la periodontitis progresiva, así como un incremento en la riqueza en sujetos con periodontitis analizado en muestras de saliva, además de una cohorte de sujetos hispanos, donde la riqueza incrementaba acorde al grado de periodontitis; esta discrepancia se puede relacionar con las diferencias con respecto al análisis de datos y la obtención de la muestra de cada estudio y de cada población (12, 96, 100, 109, 110).

Por otro lado, la diversidad alfa identificada en cavidad oral de sujetos IAM, determinó una diversidad mayor que en sujetos sanos (70). De igual forma, la comparación realizada en sujetos sanos y con enfermedad aterosclerótica cardiovascular, define que no existen diferencias significativas en el análisis de la diversidad alpha; sin embargo, se observa un decremento en sujetos con enfermedad cardíaca (111). El análisis de beta diversidad de esta cohorte determina que la varianza de la muestra no se encuentra influenciada por el estado de salud periodontal, tal como se menciona en una cohorte de sujetos con periodontitis, donde detallan una varianza menor al 1% asociada al estado periodontal (112). En el mismo punto, la escala TIMI considera en su predicción de riesgo, los hallazgos angiográficos relacionados con la extensión de la enfermedad arterial coronaria, la carga trombótica y el flujo sanguíneo; la varianza determinada en el análisis de diversidad beta con relación a esta escala, nos sugiere la relación de un mayor riesgo cardiovascular en los pacientes de esta población. Esta determinación concuerda con el análisis de una cohorte, donde relacionaron presencia de enfermedad periodontal con la medición de la dilatación mediada por flujo (FMD, por sus siglas en inglés), la rigidez arterial, cambios significativos en el grosor de la íntima media carotídea y presencia de calcificaciones en arterias(113).

En el presente análisis se determinó una varianza menor al 1% en relación con el desarrollo de un evento cardiovascular mayor adverso (MACE, por sus siglas en inglés); sin embargo, existe una relación de la disbiosis de cavidad oral con el desarrollo de estos eventos, analizado por la asociación de IgG e IgA contra patógenos periodontales como *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia* y *P. intermedia* (114). Además, se identificó en una población de origen coreano que la intervención periodontal, disminuye el riesgo de desarrollar un MACE (115).

En el presente análisis se identificó una correlación del perfil de citocinas pro-inflamatorias con géneros de la cavidad oral, tal como *Prevotella* y *Streptococcus*. A nivel de cavidad oral, se ha determinado una relación del microbioma con un estado inflamatorio local; en un análisis se identificó en sujetos con periodontitis, donde géneros como *Streptococcus*, *Selenomonas* y *Treponema* presentaron una correlación positiva con la concentración de citocinas y mediadores pro-inflamatorios (98).

Otro punto a considerar es el efecto de las estatinas sobre la microbiota oral, el cual se determinó en un estudio que la administración de estos medicamentos, provee una actividad bacteriostática sobre *Porphyromonas gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum*; si bien dicho efecto no fue analizado en nuestra población, es de importancia determinar esta evidencia en prospectiva (116).

Con relación a la concentración de IL 6 en sujetos con IAMCEST, se observó en nuestra cohorte una mediana de la concentración más elevada que los datos presentados por otros análisis; en este punto hay considerar, que la concentración elevada de IL 6, se relaciona con el desarrollo de evento cardiovascular mayor adverso (83, 117, 118). Por otro lado, el análisis de una cohorte de sujetos con enfermedades cardiovasculares severa detalló que la concentración de IL 4 e IL 17 en la enfermedad grave, decrece en comparación con sujetos con ECV leve y sin ECV; sugiriendo un efecto protector de

dichas citocinas (119). Esta misma relación se pudo observar en la presente cohorte de sujetos IAMCEST, donde se aprecia un decremento en la concentración de IL 4 y IL 17A en sujetos con riesgo grave. Existe una controversia sobre la participación de IL 17, ya que algunos reportes determinan que niveles <6.26 pg/ml en suero, se relacionan con un mayor riesgo de mortalidad post-infarto; en este punto, la única defunción registrada en la presente cohorte, coincide con la concentración sérica más elevada de IL 17A (120). Con respecto a la relación entre la concentración de IL 17 y otras de citocinas, en esta cohorte observamos una correlación positiva y significativa con TNF, IFN γ e IL 8; al igual que el análisis presentado en sujetos obesos con predisposición a enfermedad aterosclerótica (121).

Por otro lado, se observó una mayor concentración de TNF no significativa en sujetos sin riesgo en la escala de inflamación sistémica; lo cual se encuentra referenciado en un análisis de cohorte de sujetos IAM, donde determinaron una correlación positiva de esta citocina con el tiempo de inicio de lisis, así como el tiempo de lisis del trombo, los cuales son hallazgos definidos durante el análisis trombo dinámico de cada paciente (122).

De igual manera, se ha descrito la relación de la periodontitis grave en sujetos con IAM; en una cohorte de 100 sujetos se observó una disminución en la concentración plasmática de TGF β , así como una concentración ≥ 2 mg/L de la proteína c reactiva y, en consecuencia, niveles elevados de IL 6 (123). En el presente análisis, con relación a la concentración de TGF β , se observó un decremento en los sujetos categorizados con riesgo moderado, así como una elevación de la concentración con respecto a la mediana de IL 6 y proteína c reactiva y coincide con sujetos diagnosticados con periodontitis. Por otro lado, considerando la escala de riesgo basado en la inflamación sistémica, en sujetos sin riesgo, se observó que el género *Corynebacterium* se presentó en mayor abundancia en sujetos categorizados con gingivitis; esto guarda relación con los hallazgos de una

cohorte distinta, que determina una asociación negativa de *Corynebacterium matruchotti* con el diagnóstico de periodontitis agresiva, al igual que una relación inversa con marcadores de inflamación analizados, tales como IL 6, IL 1Ra y el conteo de leucocitos (109).

También se ha analizado la respuesta inflamatoria en sujetos con periodontitis; en esta cohorte se pudo observar que en general, la concentración de las citocinas analizadas es mayor en sujetos con periodontitis, sin diferencias estadísticamente significativas; tal es el caso, que hay análisis donde se determinó un decremento en la cuantificación de citocinas, post-tratamiento periodontal (124). Cabe mencionar que la media de la concentración de IL 10 de esta población, se encuentra por encima de la concentración basal reportada en sujetos con hipercolesterolemia (1.07 ± 0.55 pg/ml), además que demostraron una correlación negativa con los niveles de LDL, resaltando la participación de la IL 10 en un proceso anti-aterogénica (125). Así mismo, el análisis de una cohorte distinta, determinó una concentración de IL 10 significativamente mayor en sujetos con una escala TIMI de 0-1 en comparación de los sujetos categorizados con una escala mayor, lo que refiere un menor flujo sanguíneo de las arterias coronarias infartadas asociado con esta citocina, relacionada con la estabilidad del trombo (122).

En la literatura se ha descrito la disbiosis intestinal presente en sujetos IAMCEST; el presente análisis está dirigido a la asociación de la microbiota oral en dicho evento, sin embargo, se realizó la cuantificación de TMAO en estos sujetos. Al comparar nuestros resultados, se pudo observar que la media de la concentración de TMAO en nuestra población es menor, comparado con sujetos con un evento cerebrovascular (0.772 $\mu\text{mol/L}$ vs 1.91 $\mu\text{mol/L}$) (126). Particularmente, una cohorte de sujetos IAMCEST, identificó una media de 4.35 ± 2.19 μM , y se asoció con un mayor riesgo de un evento cardiovascular mayor adverso; en nuestra cohorte, no fue posible determinar esta asociación; sin

embargo, se observó que los sujetos considerados en el cuarto cuartil de la TMAO, corresponde a sujetos con riesgo grave, lo cual coincide con otro análisis que determina una relación de TMAO con sujetos con una escala de GRACE >119 (83). Es necesario recordar que el metabolismo de TMAO es dependiente de la dieta, tal como se menciona en una cohorte donde compararon la concentración de TMAO en sujetos con un régimen dietario vegetariano en comparación con sujetos diagnosticados con Síndrome metabólico, encontrando una menor concentración no significativa de TMAO en sujetos vegetarianos (2.08 $\mu\text{M/L}$ vs 3.7 $\mu\text{M/L}$) (127).

En el análisis exploratorio de los 16 pacientes IAMCEST, la concentración de TMAO se cuantificó entre 0.3- 6.6 nmol/mL (media 0.86 nmol/mL), lo cual representa un rango menor en comparación con otras poblaciones, donde se ha reportado el valor de la mediana de 5.63 y 2.18 μM (equivalente a nmol/mL) en pacientes IAMCEST de una población asiática (128, 129); además, lograron identificar un incremento significativo en los niveles de TMAO en pacientes post-IAMCEST en un periodo de 10 meses, independiente de las modificaciones en su dieta o la prescripción de medicamentos como ácido acetilsalicílico, estatinas, bloqueadores de β -receptores e inhibidores de los receptores de la angiotensina II (128). De igual forma, se ha analizado la concentración de TMAO en sujetos con angina inestable (4.31 \pm 2.8 μM), la cual no difiere en la comparación con pacientes IAMCEST de esa misma cohorte (83). Es importante mencionar, que por el momento el presente análisis no consideró el estudio de un grupo control; sin embargo, se observó que los valores de TMAO reportados en dos distintas cohortes de sujetos sanos en población asiática (2.15 \pm 0.9 μM y 1.23 μM [IQR:0.84-2.42]) son superiores a la concentración identificada en la presente cohorte (83, 129).

Otro punto a considerar es la comparación entre grupos, donde no se observaron diferencias significativas, lo cual sugiere que la presencia de los factores de riesgo estándar en esta cohorte, no influyen en el metabolismo de TMAO; sin embargo, se ha reportado en un análisis de sujetos mexicanos con diabetes, presentan un incremento de 48.2% comparado con sujetos sanos de la misma cohorte (130). En el presente análisis, los pacientes del grupo con factores de riesgo presentaron una mayor proporción de sujetos con dos o más arterias coronarias afectadas, que coincide con otro reporte donde encontraron un incremento estadísticamente significativo de la concentración de TMAO en sujetos con múltiples arterias afectadas, asociado también a una mayor proporción de sujetos con diabetes (129). Por otro lado, la mayor proporción de nuestros pacientes que presentaron un evento cardiovascular mayor adverso, corresponden del grupo con factores de riesgo, con una concentración de TMAO <1 nmol/mL, comparando con el seguimiento de pacientes con un evento cardiovascular mayor adverso de una cohorte distinta, que identificó una mediana de 5.0 μ M, relacionado con la presencia de factores de riesgo estándar como hipertensión, diabetes o un IM previo (80).

En diversos análisis se ha descrito la relación de periodontopatógenos anaerobios en la disbiosis de la microbiota intestinal en pacientes sanos o con periodontitis (74, 131), al igual que en sujetos diagnosticados con colitis ulcerativa (131). En el análisis de correlación de esta cohorte, se encontró una relación positiva con la concentración de TMAO y dos géneros de la microbiota oral *Porphyromonas* y *Aggregatibacter*, ambas especies relacionados con el desarrollo de enfermedad periodontal, inflamación local persistente, así como su capacidad de inducir la formación de péptidos citrulinados en artritis reumatoide (133) y de forma importante, se han identificado en pacientes con infarto agudo al miocardio (49).

En ese sentido, se ha descrito una mayor proporción (no significativa con sujetos sanos) de *Porphyromonas gingivalis* en cavidad oral de sujetos IAMCEST, relacionado con estado de disbiosis intestinal, identificado por una mayor abundancia de *Proteobacteria* y una menor abundancia de bacterias productoras de ácidos grasos de cadena corta (70). Igualmente, se demostró que la administración de *Porphyromonas gingivalis* en modelos murinos con periodontitis inducida, se ha relacionado con niveles elevados de TMAO (134); mientras que con relación a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, se ha reportado una asociación en sujetos con enfermedad hepática no alcohólica y se demostró en modelos murinos que esta especie participa en la alteración del metabolismo hepático (135).

6. Limitaciones

Finalmente, hay que considerar que una limitación del presente análisis se debe al número de pacientes incluidos y en perspectiva, se consideraría reclutar un número mayor de sujetos, así como el análisis de la microbiota intestinal, que permita el estudio del eje oral-intestinal en los sujetos que desarrollan un IAM.

7. Conclusión

La importancia en la atención de las enfermedades cardíacas isquémicas en nuestra población, implica el análisis de los distintos factores de riesgo que influyen en el desarrollo de estas enfermedades. En este análisis se infiere una asociación no causal entre el riesgo cardiovascular de los sujetos IAMCEST y los cambios en la microbiota oral que influyen en el desarrollo de enfermedad periodontal y su relación con la exacerbación de la respuesta inflamatoria sistémica. Es necesario realizar un análisis posterior, haciendo énfasis en los marcadores de riesgo cardiovascular presentes en estos sujetos, que permitan aclarar el mecanismo asociado entre la disbiosis y su influencia como factor de riesgo en el establecimiento del IAMCEST.

Con base a los hallazgos del presente análisis, se describe por primera vez la relación de dos especies particulares de cavidad oral con la concentración de TMAO en sujetos IAMCEST, con lo cual se aporta información sobre la relación entre el eje oral-intestinal-hepático, el cual se apoya en una disbiosis de la diversidad del microbioma oral , así como la presencia de dicho metabolito relacionado con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, lo cual sugiere una alteración en metabolismo intestinal y hepático presente en estos sujetos. De igual forma, se logró concluir que la presencia o ausencia de factores de riesgo estándar, no influyen en la concentración de TMAO en estos pacientes IAMCEST.

Bibliografía

1. WHO. Fact sheets. The top 10 causes of death. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
2. INEGI, 2021. Estadística de defunciones registradas de enero a junio de 2021. <https://www.inegi.org.mx/app/saladeprensa/noticia.html?id=7104>
3. Anuario de Morbilidad. SUIVE/DGE/Secretaría de Salud/Estados Unidos Mexicanos 2022. https://epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2022/morbilidad/nacional/veinte_principal_es_causas_enfermedad_nacional_grupo_edad.pdf
4. Fernández-Plata R, Martínez-Briseño D, García-Sancho C, et al. Prevalencia de enfermedad periodontal grave (EPG) y su asociación con enfermedades respiratorias en pacientes adultos hospitalizados en un centro de tercer nivel. *Gac Med Mex.* 2015;151:608-13
5. Thygesen K. Fourth universal definition of myocardial infarction. *Circulation* 2018; 138: e618-51.
6. Al-Ghutaimel H, Riba H, Al-Kahtani S, Al-Duhaimi S. Common periodontal diseases of children and adolescents. *Int J Dent.* 2014;2014:850674. doi: 10.1155/2014/850674. Epub 2014 Jun 26. PMID: 25053946; PMCID: PMC4098882.
7. Berg G, Köberl M, Rybakova D, Müller H, Grosch R, Smalla K. Plant microbial diversity is suggested as the key to future biocontrol and health trends. *FEMS Microbiol Ecol.* 2017;93:5
8. Berg G, Rybakova D, Fischer D, et al. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome.* 2020 Jun 30;8(1):103. doi: 10.1186/s40168-020-00875-0.
9. Wilson W.H. Gut microbiota in cardiovascular health and disease. *Circ Res* 2017; 120(7):1183-96.
10. Jonsson AL, Bäckhed F. Role of gut microbiota in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol.* 2017 Feb;14(2):79-87
11. Nagatomo Y. Intersections between microbiome and heart failure: revisiting the gut hypothesis. *J Card Fail* 2015; 21(12): 973-80.
12. Ai D, Huang R, Wen J, Li C, Zhu J, Xia LC. Integrated metagenomic data analysis demonstrates that a loss of diversity in oral microbiota is associated with periodontitis. *BMC Genomics.* 2017 Jan 25;18(Suppl 1):1041. doi: 10.1186/s12864-016-3254-5. PMID: 28198672; PMCID: PMC5310281.
13. Timmis A. Acute coronary syndromes. *BMJ* 2015; 351: h5153.
14. Crea, F. Libby P. Acute coronary syndromes, the way forward from mechanisms to precision treatment. *Circulation* 2017; 136: 1155-66
15. Vergallo R, Crea F. Atherosclerotic plaque healing. *N Engl J Med* 2020; 383(9): 846-57.
16. González Pacheco H. Derivation and validation of a simple inflammation- based risk score sistema for predicting in-hospital mortality in acute coronary syndrome patients. *J Cardiol* 2019; 73: 416-24
17. Ridker F, et al. Antiinflammatory therapy with Canakinumab for atherosclerotic disease. *N Engl J Med* 2017; 377:1119-1131
18. Tyrrel D. Ageing and atherosclerosis: vascular intrinsic and extrinsic factors and potential role of IL-6. *Nat Rev Cardiol* 2021;18(1):58-68.
19. Jaiswal S. Clonal Hematopoiesis and Risk of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *N Engl J Med* 2017 Jul 13;377(2):111-121.
20. Vernon ST, Coffey S, Bhindi R, Soo Hoo SY, Nelson GI, Ward MR, Hansen PS, Asrress KN, Chow CK, Celermajer DS, O'Sullivan JF, Figtree GA. Increasing proportion of ST elevation myocardial infarction patients with coronary atherosclerosis poorly explained by standard modifiable risk factors. *Eur J Prev Cardiol.* 2017;24(17):1824-1830. doi: 10.1177/2047487317720287.
21. Kong G, Chin YH, Chong B, Goh RSJ, Lim OZH, Ng CH, Muthiah M, Foo R, Vernon ST, Loh PH, Chan MY, Chew NWS, Figtree GA. Higher mortality in acute coronary syndrome

- patients without standard modifiable risk factors: Results from a global meta-analysis of 1,285,722 patients. *Int J Cardiol.* 2023;371:432-440. doi: 10.1016/j.ijcard.2022.09.062.
22. Choi AR, Jeong MH, Hong YJ, Sohn SJ, Kook HY, Sim DS, Ahn YK, Lee KH, Cho JY, Kim YJ, Cho MC, Kim CJ; other Korea Acute Myocardial Infarction Registry Investigators. Clinical characteristics and outcomes in acute myocardial infarction patients with versus without any cardiovascular risk factors. *Korean J Intern Med.* 2019;34(5):1040-1049. doi: 10.3904/kjim.2018.056
 23. de Carvalho LP, Gao F, Chen Q, Sim LL, Koh TH, Foo D, Ong HY, Tong KL, Tan HC, Yeo TC, Chow KY, Richards AM, Peterson ED, Chua T, Chan MY. Long-term prognosis and risk heterogeneity of heart failure complicating acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 2015 Apr 1;115(7):872-8. doi: 10.1016/j.amjcard.2015.01.010. Epub 2015 Jan 15. PMID: 25682439
 24. Fox KA, Fitzgerald G, Puymirat E, Huang W, Carruthers K, Simon T, Coste P, Monsegu J, Gabriel Steg P, Danchin N, Anderson F. Should patients with acute coronary disease be stratified for management according to their risk? Derivation, external validation and outcomes using the updated GRACE risk score. *BMJ Open.* 2014 Feb 21;4(2):e004425. doi: 10.1136/bmjopen-2013-004425. PMID: 24561498; PMCID: PMC3931985.
 25. Sarkar A, Grigg WS, Lee JJ. TIMI Grade Flow. 2023 Apr 24. In: *StatPearls [Internet].* Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. PMID: 29494019.
 26. Franzosa, E.A. Sequencing and beyond: integrating molecular 'omics' for microbial community profiling. *Nat.Rev.Microbiol.* 13,360–372. doi: 10.1038/nrmicro3451
 27. Moon, J. Probing the Diversity of Healthy Oral Microbiome With Bioinformatics Approaches. *BMB Rep.* 2016; 49(12): 662-670)
 28. Malla, M. Exploring the human microbiome: the potential future role of next-generation sequencing in disease diagnosis and treatment. *Front. Immunol* 2019; 9: 2868.
 29. Johnson, J. Evaluation of 16s rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature* 2019; 10:5029.
 30. Liu, Po-yu & Wu, Wei-Kai & Chen, Chieh-Chang & Panyod, Suraphan & Sheen, Lee-Yan & Wu, Ming-Shiang. (2020). Evaluation of Compatibility of 16S rRNA V3V4 and V4 Amplicon Libraries for Clinical Microbiome Profiling. 10.1101/2020.08.18.256818
 31. Beiko, R. Microbiome analysis. *Springer Protocols*; 2018: doi.org/10.1007/978-1-4939-8728-3.
 32. Magurran A, Measuring biological diversity. *Current Biology* 2021; 31(19): R1174-R1177. doi.org/10.1016/j.cub.2021.07.049.
 33. Semeniuk, V.; Cresswell, I.D. A Proposed Revision of Diversity Measures. *Diversity* 2013, 5, 613-626.
 34. Roswell, M., Dushoff, J. and Winfree, R. A conceptual guide to measuring species diversity. *Oikos* 2021; 130: 321-338. doi.org/10.1111/oik.07202
 35. Lozupone C, Knight R. Species divergence and the measurement of microbial diversity, *FEMS Microbiology Reviews* 2008; 34(4):557–578.
 36. Yamashita Y, Takeshita T. The oral microbiome and human health. *J Oral Sci.* 2017;59(2):201-206. doi: 10.2334/josnusd.16-0856. PMID: 28637979.
 37. Belstrøm D. The salivary microbiota in health and disease. *J Oral Microbiol.* 2020 Feb 4;12(1):1723975. doi: 10.1080/20002297.2020.1723975. PMID: 32128039; PMCID: PMC7034443.
 38. Takeshita T, Kageyama S, Furuta M, Tsuboi H, Takeuchi K, Shibata Y, Shimazaki Y, Akifusa S, Ninomiya T, Kiyohara Y, Yamashita Y. Bacterial diversity in saliva and oral health-related conditions: the Hisayama Study. *Sci Rep.* 2016 Feb 24;6:22164. doi: 10.1038/srep22164. PMID: 26907866; PMCID: PMC4764907.
 39. Mason MR, Chambers S, Dabdoub SM, Thikkurissy S, Kumar PS. Characterizing oral microbial communities across dentition states and colonization niches. *Microbiome.* 2018 Apr 10;6(1):67. doi: 10.1186/s40168-018-0443-2. PMID: 29631628; PMCID: PMC5891995.
 40. Espinoza JL, Harkins DM, Torralba M, Gomez A, Highlander SK, Jones MB, Leong P, Saffery R, Bockmann M, Kuelbs C, Inman JM, Hughes T, Craig JM, Nelson KE, Dupont CL. Supragingival Plaque Microbiome Ecology and Functional Potential in the Context of

- Health and Disease. *mBio*. 2018 Nov 27;9(6):e01631-18. doi: 10.1128/mBio.01631-18. PMID: 30482830; PMCID: PMC6282201.
41. Verma D, Garg PK, Dubey AK. Insights into the human oral microbiome. *Arch Microbiol*. 2018 May;200(4):525-540. doi: 10.1007/s00203-018-1505-3. Epub 2018 Mar 23. PMID: 29572583.
 42. Meuric V, Le Gall-David S, Boyer E, Acuña-Amador L, Martin B, Fong SB, Barloy-Hubler F, Bonnaure-Mallet M. Signature of Microbial Dysbiosis in Periodontitis. *Appl Environ Microbiol*. 2017 Jun 30;83(14):e00462-17. doi: 10.1128/AEM.00462-17. PMID: 28476771; PMCID: PMC5494626.
 43. Lundmark A, Hu YOO, Huss M, Johannsen G, Andersson AF, Yucel-Lindberg T. Identification of Salivary Microbiota and Its Association With Host Inflammatory Mediators in Periodontitis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019 Jun 21;9:216. doi: 10.3389/fcimb.2019.00216. PMID: 31281801; PMCID: PMC6598052.
 44. Damgaard C, Danielsen AK, Enevold C, Massarenti L, Nielsen CH, Holmstrup P, Belstrøm D. Porphyromonas gingivalis in saliva associates with chronic and aggressive periodontitis. *J Oral Microbiol*. 2019 Aug 9;11(1):1653123. doi: 10.1080/20002297.2019.1653123. PMID: 31489129; PMCID: PMC6713147.
 45. Choi YH, Kosaka T, Ojima M, Sekine S, Kokubo Y, Watanabe M, Miyamoto Y, Ono T, Amano A. Relationship between the burden of major periodontal bacteria and serum lipid profile in a cross-sectional Japanese study. *BMC Oral Health*. 2018 May 4;18(1):77. doi: 10.1186/s12903-018-0536-0. PMID: 29728099; PMCID: PMC5935931.
 46. Belstrøm D, Constancias F, Liu Y, Yang L, Drautz-Moses DI, Schuster SC, Kohli GS, Jakobsen TH, Holmstrup P, Givskov M. Metagenomic and metatranscriptomic analysis of saliva reveals disease-associated microbiota in patients with periodontitis and dental caries. *NPJ Biofilms Microbiomes*. 2017 Oct 2;3:23. doi: 10.1038/s41522-017-0031-4. PMID: 28979798; PMCID: PMC5624903.
 47. Kageyama S, Takeshita T, Asakawa M, Shibata Y, Takeuchi K, Yamanaka W, Yamashita Y. Relative abundance of total subgingival plaque-specific bacteria in salivary microbiota reflects the overall periodontal condition in patients with periodontitis. *PLoS One*. 2017 Apr 3;12(4):e0174782. doi: 10.1371/journal.pone.0174782. PMID: 28369125; PMCID: PMC5378373.
 48. Larsen JM. The immune response to Prevotella bacteria in chronic inflammatory disease. *Immunology*. 2017 Aug;151(4):363-374. doi: 10.1111/imm.12760. Epub 2017 Jun 20. PMID: 28542929; PMCID: PMC5506432.
 49. Liljestrand JM, Paju S, Pietiäinen M, Buhlin K, Persson GR, Nieminen MS, Sinisalo J, Mäntylä P, Pussinen PJ. Immunologic burden links periodontitis to acute coronary syndrome. *Atherosclerosis*. 2018 Jan;268:177-184. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2017.12.007. Epub 2017 Dec 6. PMID: 29232563.
 50. Ennibi OK, Claesson R, Akkaoui S, Reddahi S, Kwamin F, Haubek D, Johansson A. High salivary levels of JP2 genotype of Aggregatibacter actinomycetemcomitans is associated with clinical attachment loss in Moroccan adolescents. *Clin Exp Dent Res*. 2019 Jan 24;5(1):44-51. doi: 10.1002/cre2.156. PMID: 30847232; PMCID: PMC6392844.
 51. Chigasaki O, Takeuchi Y, Aoki A, Sasaki Y, Mizutani K, Aoyama N, Ikeda Y, Gokyu M, Umeda M, Ishikawa I, Izumi Y. A cross-sectional study on the periodontal status and prevalence of red complex periodontal pathogens in a Japanese population. *J Oral Sci*. 2018;60(2):293-303. doi: 10.2334/josnusd.17-0223. PMID: 29925714.
 52. Liljestrand JM, Paju S, Buhlin K, Persson GR, Sarna S, Nieminen MS, Sinisalo J, Mäntylä P, Pussinen PJ. Lipopolysaccharide, a possible molecular mediator between periodontitis and coronary artery disease. *J Clin Periodontol*. 2017 Aug;44(8):784-792. doi: 10.1111/jcpe.12751. Epub 2017 Jul 7. PMID: 28556187.
 53. Salminen A, Kopra KA, Hyvärinen K, Paju S, Mäntylä P, Buhlin K, Nieminen MS, Sinisalo J, Pussinen PJ. Quantitative PCR analysis of salivary pathogen burden in periodontitis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2015 Oct 1;5:69. doi: 10.3389/fcimb.2015.00069. PMID: 26484315; PMCID: PMC4589666.

54. Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2015 Jan;15(1):30-44. doi: 10.1038/nri3785. PMID: 25534621; PMCID: PMC4276050.
55. Lu A, Wu H. Structural mechanisms of inflammasome assembly. *FEBS J.* 2015 Feb;282(3):435-44. doi: 10.1111/febs.13133. Epub 2014 Nov 21. PMID: 25354325; PMCID: PMC6400279.
56. Melgar-Rodríguez S, Díaz-Zúñiga J, Alvarez C, Rojas L, Monasterio G, Carvajal P, Escobar A, Sanz M, Vernal R. Serotype b of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* increases osteoclast and memory T-lymphocyte activation. *Mol Oral Microbiol.* 2016 Apr;31(2):162-74. doi: 10.1111/omi.12112. Epub 2015 Aug 10. PMID: 26172400.
57. Alvarez C, Benítez A, Rojas L, Pujol M, Carvajal P, Díaz-Zúñiga J, Vernal R. Differential expression of CC chemokines (CCLs) and receptors (CCRs) by human T lymphocytes in response to different *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotypes. *J Appl Oral Sci.* 2015 Nov-Dec;23(6):580-90. doi: 10.1590/1678-775720150285. Retraction in: *J Appl Oral Sci.* 2016 Feb;24(1):105. PMID: 26814460; PMCID: PMC4716696.
58. Díaz-Zúñiga J, Monasterio G, Alvarez C, Melgar-Rodríguez S, Benítez A, Ciuchi P, García M, Arias J, Sanz M, Vernal R. Variability of the dendritic cell response triggered by different serotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* or *Porphyromonas gingivalis* is toll-like receptor 2 (TLR2) or TLR4 dependent. *J Periodontol.* 2015 Jan;86(1):108-19. doi: 10.1902/jop.2014.140326. PMID: 25224175.
59. Olsen I, Yilmaz Ö. Modulation of inflammasome activity by *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis and associated systemic diseases. *J Oral Microbiol.* 2016 Feb 4;8:30385. doi: 10.3402/jom.v8.30385. PMID: 26850450; PMCID: PMC4744328.
60. Holmstrup P, Damgaard C, Olsen I, Klinge B, Flyvbjerg A, Nielsen CH, Hansen PR. Comorbidity of periodontal disease: two sides of the same coin? An introduction for the clinician. *J Oral Microbiol.* 2017 Jun 14;9(1):1332710. doi: 10.1080/20002297.2017.1332710. PMID: 28748036; PMCID: PMC5508374.
61. Rydén L, Buhlin K, Ekstrand E, de Faire U, Gustafsson A, Holmer J, Kjellström B, Lindahl B, Norhammar A, Nygren Å, Näsmán P, Rathnayake N, Svenungsson E, Klinge B. Periodontitis Increases the Risk of a First Myocardial Infarction: A Report From the PAROKRANK Study. *Circulation.* 2016 Feb 9;133(6):576-83. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.020324. Epub 2016 Jan 13. PMID: 26762521.
62. Buhlin K, Holmer J, Gustafsson A, Hökkö S, Pockley AG, Johansson A, Paju S, Klinge B, Pussinen PJ. Association of periodontitis with persistent, pro-atherogenic antibody responses. *J Clin Periodontol.* 2015 Nov;42(11):1006-14. doi: 10.1111/jcpe.12456. Epub 2015 Nov 3. PMID: 26362847.
63. Libby P, Hansson GK. Inflammation and immunity in diseases of the arterial tree: players and layers. *Circ Res.* 2015 Jan 16;116(2):307-11. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.301313. PMID: 25593275; PMCID: PMC4299915.
64. Hernández-Ruiz P, González-Pacheco H, Amezcua-Guerra LM, Aguirre-García MM. Relación entre la disbiosis de la microbiota oral y la enfermedad cardiovascular aterosclerótica. *Arch Cardiol Mex.* 2022;92(3):371-376
65. Packard RR, Libby P. Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clin Chem.* 2008 Jan;54(1):24-38. doi: 10.1373/clinchem.2007.097360. PMID: 18160725.
66. Chistiakov DA, Bobryshev YV, Orekhov AN. Macrophage-mediated cholesterol handling in atherosclerosis. *J Cell Mol Med.* 2016 Jan;20(1):17-28. doi: 10.1111/jcmm.12689. Epub 2015 Oct 23. PMID: 26493158; PMCID: PMC4717859.
67. Kallio KA, Hyvärinen K, Kovanen PT, Jauhainen M, Pussinen PJ. Very low density lipoproteins derived from periodontitis patients facilitate macrophage activation via lipopolysaccharide function. *Metabolism.* 2013 May;62(5):661-8. doi: 10.1016/j.metabol.2012.09.015. Epub 2012 Dec 4. PMID: 23218923.
68. Koren O, Spor A, Felin J, Fåk F, Stombaugh J, Tremaroli V, Behre CJ, Knight R, Fagerberg B, Ley RE, Bäckhed F. Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Mar 15;108 Suppl 1(Suppl 1):4592-8. doi: 10.1073/pnas.1011383107. Epub 2010 Oct 11. PMID: 20937873; PMCID: PMC3063583.

69. Menon, T. Characterisation of the human oral microbiome in patients with coronary artery disease using next-generation sequencing of 16SrRNA amplicons. *Indian J Med Microbiol* 2017; 35:101-4
70. Kwun JS, Kang SH, Lee HJ, Park HK, Lee WJ, Yoon CH, Suh JW, Cho YS, Youn TJ, Chae IH. Comparison of thrombus, gut, and oral microbiomes in Korean patients with ST-elevation myocardial infarction: a case-control study. *Exp Mol Med*. 2020;52(12):2069-2079
71. Zhou X, Li J, Guo J, Geng B, Ji W, Zhao Q, Li J, Liu X, Liu J, Guo Z, Cai W, Ma Y, Ren D, Miao J, Chen S, Zhang Z, Chen J, Zhong J, Liu W, Zou M, Li Y, Cai J. Gut-dependent microbial translocation induces inflammation and cardiovascular events after ST-elevation myocardial infarction. *Microbiome*. 2018 Apr 3;6(1):66. doi: 10.1186/s40168-018-0441-4. PMID: 29615110; PMCID: PMC5883284.
72. Xu AA, Hoffman K, Gurwara S, White DL, Kanwal F, El-Serag HB, Petrosino JF, Jiao L. Oral health and the altered colonic mucosa-associated gut microbiota. *Dig Dis Sci*. 2021;66(9):2981-91
73. Sardu C, Consiglia Trotta M, Santella B, et al. Microbiota thrombus colonization may influence athero-thrombosis in hyperglycemic patients with ST segment elevation myocardial infarction (STEMI). *Marianella study*. *Diabetes Res Clin Pract*. 2021; 173:108670. doi: 10.1016/j.diabres.2021.108670.
74. Bao, J., Li, L., Zhang, Y. et al. Periodontitis may induce gut microbiota dysbiosis via salivary microbiota. *Int J Oral Sci* 2022; 14 (32).
75. Kitai T. Exploring the microbiome in heart failure. *Curr Heart Fail Rep* 2016; 13(2): 103-9.
76. Troseid M. Gut microbiota and acute coronary syndromes: ready for use in the emergency room?. *Eur Heart J* 2017; 38: 825-7.
77. Tran C. Gut permeability, its interaction with gut microflora and effects on metabolic health are mediated by the lymphatics system, liver and bile acid. *Future microbiol* 2015; 10(8): 1339-53
78. Ufnal M, Pham K. The gut-blood barrier permeability - A new marker in cardiovascular and metabolic diseases? *Med Hypotheses*. 2017 Jan;98:35-37. doi: 10.1016/j.mehy.2016.11.012. Epub 2016 Nov 24. PMID: 28012600.
79. Ussher JR, Lopaschuk GD, Arduini A. Gut microbiota metabolism of L-carnitine and cardiovascular risk. *Atherosclerosis*. 2013 Dec;231(2):456-61. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2013.10.013. Epub 2013 Oct 24. PMID: 24267266.
80. Tang WH, Wang Z, Levison BS, Koeth RA, Britt EB, Fu X, Wu Y, Hazen SL. Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. *N Engl J Med*. 2013 Apr 25;368(17):1575-84. doi: 10.1056/NEJMoa1109400. PMID: 23614584; PMCID: PMC3701945.
81. Koeth RA, Wang Z, Levison BS, Buffa JA, Org E, Sheehy BT, Britt EB, Fu X, Wu Y, Li L, Smith JD, DiDonato JA, Chen J, Li H, Wu GD, Lewis JD, Warrier M, Brown JM, Krauss RM, Tang WH, Bushman FD, Lusis AJ, Hazen SL. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med*. 2013 May;19(5):576-85. doi: 10.1038/nm.3145. Epub 2013 Apr 7. PMID: 23563705; PMCID: PMC3650111.
82. Li XS, Obeid S, Klingenberg R, Gencer B, Mach F, Räber L, Windecker S, Rodondi N, Nanchen D, Muller O, Miranda MX, Matter CM, Wu Y, Li L, Wang Z, Alamri HS, Gogonea V, Chung YM, Tang WH, Hazen SL, Lüscher TF. 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 Mar 14;38(11):814-824. doi: 10.1093/eurheartj/ehw582. PMID: 28077467; PMCID: PMC5837488.
83. Gao, J., Yan, KT., Wang, JX. et al. Gut microbial taxa as potential predictive biomarkers for acute coronary syndrome and post-STEMI cardiovascular events. *Sci Rep* 2020; 10: 2639
84. Kallio KA, Buhlin K, Jauhiainen M, Keva R, Tuomainen AM, Klinge B, Gustafsson A, Pussinen PJ. Lipopolysaccharide associates with pro-atherogenic lipoproteins in periodontitis patients. *Innate Immun*. 2008 Aug;14(4):247-53. doi: 10.1177/1753425908095130. PMID: 18669610.
85. Ljunggren S, Bengtsson T, Karlsson H, Starkhammar Johansson C, Palm E, Nayeri F, Ghafouri B, Davies J, Svensäter G, Lönn J. Modified lipoproteins in periodontitis: a link to

- cardiovascular disease? *Biosci Rep.* 2019 Mar 26;39(3):BSR20181665. doi: 10.1042/BSR20181665. PMID: 30842338; PMCID: PMC6434390.
86. Kallio KA, Hyvärinen K, Kovanen PT, Jauhiainen M, Pussinen PJ. Very low density lipoproteins derived from periodontitis patients facilitate macrophage activation via lipopolysaccharide function. *Metabolism.* 2013 May;62(5):661-8. doi: 10.1016/j.metabol.2012.09.015. Epub 2012 Dec 4. PMID: 23218923.
 87. Pussinen PJ, Tuomisto K, Jousilahti P, Havulinna AS, Sundvall J, Salomaa V. Endotoxemia, immune response to periodontal pathogens, and systemic inflammation associate with incident cardiovascular disease events. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 1433–1439
 88. Geraldino-Pardilla, L., Giles, J.T., Sokolove, J., Zartoshti, A., Robinson, W.H., Budoff, M., Detrano, R., Bokhari, S. and Bathon, J.M. (2017), Association of Anti–Citruillinated Peptide Antibodies With Coronary Artery Calcification in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Care & Research*, 69: 1276-1281. <https://doi.org/10.1002/acr.23106>
 89. Kongstad, J., Enevold, C., Christensen, L. B., Fiehn, N. E. & Holmstrup, P. Impact of periodontitis case criteria: a cross-sectional study of lifestyle. *J. Periodontol* 2017; 88: 602–609
 90. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJ, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods.* 2016 Jul;13(7):581-3
 91. Escapa, I. F., Chen, T., Huang, Y., Gajare, P., Dewhirst, F. E., and Lemon, K. P. New insights into human nostril microbiome from the expanded human oral microbiome database (eHOMD): a resource for the microbiome of the human aerodigestive tract. *mSystems*, 208; 3:e00187-18
 92. Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, Huttenhower C. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* 2011 Jun 24;12(6):R60
 93. Anders, S., Huber, W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol* 11, R106 (2010). <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-10-r106>
 94. Fei N, Bernabe´ BP, Lie L, Baghdan D, Bedu-Addo K, Plange-Rhule J, et al. The human microbiota is associated with cardiometabolic risk across the epidemiologic transition. *PLoS ONE* 2019; 14(7): e0215262
 95. Fåk F, Tremaroli V, Bergström G, Bäckhed F. Oral microbiota in patients with atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2015;243(2):573-8
 96. Cai Z, Lin S, Hu S and Zhao L (2021) Structure and Function of Oral Microbial Community in Periodontitis Based on Integrated Data. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11:663756.
 97. Belstrøm D, Sembler-Møller ML, Grande MA, Kirkby N, Cotton SL, Paster BJ, et al. Microbial profile comparisons of saliva, pooled and site-specific subgingival samples in periodontitis patients. *PLoS ONE* 2021; 12(8): e0182992
 98. Lundmark A, Hu YOO, Huss M, Johannsen G, Andersson AF, Yucel-Lindberg T. Identification of Salivary Microbiota and Its Association With Host Inflammatory Mediators in Periodontitis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019 Jun 21;9:216. doi: 10.3389/fcimb.2019.00216. PMID: 31281801; PMCID: PMC6598052.
 99. Flemer B, Warren Ryan D, Barrett MP, Cisek K, Das Anubhav, Jeffery Ian B, et al. Gut microbiota The oral microbiota in colorectal cancer is distinctive and predictive. *Gut.* 2018;67:1454–63).
 100. Ortiz AP, Acosta-Pagán KT, Oramas-Sepúlveda C, Castañeda-Avila MA, Vilanova-Cuevas B, Ramos-Cartagena JM, Vivaldi JA, Pérez-Santiago J, Pérez CM, Godoy-Vitorino F. Oral microbiota and periodontitis severity among Hispanic adults. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022 Nov 14;12:965159. doi: 10.3389/fcimb.2022.965159. PMID: 36452304; PMCID: PMC9703052
 101. Chen X, Chen Y, Feng M, Huang X, Li C, Han F, Zhang Q, Gao X. Altered Salivary Microbiota in Patients with Obstructive Sleep Apnea Comorbid Hypertension. *Nat Sci Sleep.* 2022 Apr 8;14:593-607. doi: 10.2147/NSS.S347630
 102. Qi Y, Zang SQ, Wei J, Yu HC, Yang Z, Wu HM, Kang Y, Tao H, Yang MF, Jin L, Zen K, Wang FY. High-throughput sequencing provides insights into oral microbiota

- dysbiosis in association with inflammatory bowel disease. *Genomics*. 2021 Jan;113(1 Pt 2):664-676. doi: 10.1016/j.ygeno.2020.09.063
103. Baraniya D, Jain V, Lucarelli R, et al. Screening of health-associated oral bacteria for anticancer properties in vitro. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10:575656. doi: 10.3389/fcimb.2020.575656
 104. Khocht A, Orlich M, Paster B, Bellinger D, Lenoir L, Irani C, Fraser G. Cross-sectional comparisons of subgingival microbiome and gingival fluid inflammatory cytokines in periodontally healthy vegetarians versus non-vegetarians. *J Periodontol Res*. 2021 Dec;56(6):1079-1090. doi: 10.1111/jre.12922
 105. Chen C, Hemme C, Beleno J, Shi ZJ, Ning D, Qin Y, Tu Q, Jorgensen M, He Z, Wu L, Zhou J. Oral microbiota of periodontal health and disease and their changes after nonsurgical periodontal therapy. *ISME J*. 2018;12(5):1210-24
 106. Marotz C, Molinsky R, Martino C, Bohn B, Roy S, Rosenbaum M, Desvarieux M, Yuzefpolskaya M, Paster BJ, Jacobs DR, Colombo PC, Papapanou PN, Knight R, Demmer RT. Early microbial markers of periodontal and cardiometabolic diseases in ORIGINS. *NPJ Biofilms Microbiomes*. 2022 Apr 20;8(1):30
 107. Saffi MA, Furtado MV, Montenegro MM, Ribeiro IW, Kampits C, Rabelo-Silva ER, Polanczyk CA, Rösing CK, Haas AN. The effect of periodontal therapy on C-reactive protein, endothelial function, lipids and proinflammatory biomarkers in patients with stable coronary artery disease: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*. 2013;14:283
 108. Lund Håheim L, Schwarze PE, Thelle DS, Nafstad P, Rønningen KS, Olsen I. Low levels of antibodies for the oral bacterium *Tannerella forsythia* predict cardiovascular disease mortality in men with myocardial infarction: A prospective cohort study. *Med Hypotheses*. 2020 May;138:109575. doi: 10.1016/j.mehy.2020.109575. Epub 2020 Jan 20. PMID: 32088522
 109. Plachokova, A.S.; Andreu-Sánchez, S.; Noz, M.P.; Fu, J.; Riksen, N.P. Oral Microbiome in Relation to Periodontitis Severity and Systemic Inflammation. *Int. J. Mol. Sci*. 2021, 22, 5876
 110. Kim H, Hong JS, Yun PY, Hwang KG, Kim KS, Lee HJ, Park KU. Exploration of the interplay between spatially distinct microbial habitats through comparative analysis. *J Oral Microbiol*. 2023 Jun 27;15(1):2229693. doi: 10.1080/20002297.2023.2229693. PMID: 37396300; PMCID: PMC10308874
 111. Kato-Kogoe N, Sakaguchi S, Kamiya K, Omori M, Gu YH, Ito Y, Nakamura S, Nakano T, Tamaki J, Ueno T, Hoshiga M. Characterization of Salivary Microbiota in Patients with Atherosclerotic Cardiovascular Disease: A Case-Control Study. *J Atheroscler Thromb*. 2022;29(3):403-421. doi: 10.5551/jat.60608
 112. Belstrøm, D., Constancias, F., Drautz-Moses, D. I., Schuster, S. C., Veleba, M., Mahé, F., & Givskov, M. Periodontitis associates with species-specific gene expression of the oral microbiota. *NPJ biofilms and microbiomes* 2021; 7(1): 76
 113. Sanz M, Marco Del Castillo A, Jepsen S, Gonzalez-Juanatey JR, D'Aiuto F, Bouchard P, Chapple I, Dietrich T, Gotsman I, Graziani F, Herrera D, Loos B, Madianos P, Michel JB, Perel P, Pieske B, Shapira L, Shechter M, Tonetti M, Vlachopoulos C, Wimmer G. Periodontitis and cardiovascular diseases: Consensus report. *J Clin Periodontol*. 2020 Mar;47(3):268-288. doi: 10.1111/jcpe.13189. Epub 2020 Feb 3. PMID: 32011025; PMCID: PMC7027895.
 114. de Boer SP, Cheng JM, Rangé H, Garcia-Garcia HM, Heo JH, Akkerhuis KM, Meilhac O, Cosler G, Pussinen PJ, van Geuns RJ, Serruys PW, Boersma E, Kardys I. Antibodies to periodontal pathogens are associated with coronary plaque remodeling but not with vulnerability or burden. *Atherosclerosis*. 2014 Nov;237(1):84-91. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.08.050. Epub 2014 Sep 6. PMID: 25233105.
 115. Park SY, Kim SH, Kang SH, Yoon CH, Lee HJ, Yun PY, Youn TJ, Chae IH. Improved oral hygiene care attenuates the cardiovascular risk of oral health disease: a population-based study from Korea. *Eur Heart J*. 2019 Apr 7;40(14):1138-1145. doi: 10.1093/eurheartj/ehy836. PMID: 30561631.

116. Kamińska M, Aliko A, Hellvard A, Bielecka E, Binder V, Marczyk A, Potempa J, Delaleu N, Kantyka T, Mydel P. Effects of statins on multispecies oral biofilm identify simvastatin as a drug candidate targeting *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol*. 2019 Jun;90(6):637-646. doi: 10.1002/JPER.18-0179. Epub 2018 Dec 26. PMID: 30506795; PMCID: PMC6545270.
117. Fanola CL, Morrow DA, Cannon CP, Jarolim P, Lukas MA, Bode C, Hochman JS, Goodrich EL, Braunwald E, O'Donoghue ML. Interleukin-6 and the Risk of Adverse Outcomes in Patients After an Acute Coronary Syndrome: Observations From the SOLID-TIMI 52 (Stabilization of Plaque Using Darapladib-Thrombolysis in Myocardial Infarction 52) Trial. *J Am Heart Assoc*. 2017 Oct 24;6(10):e005637
118. Ridker PM, MacFadyen JG, Glynn RJ, Bradwin G, Hasan AA, Rifai N. Comparison of interleukin-6, C-reactive protein, and low-density lipoprotein cholesterol as biomarkers of residual risk in contemporary practice: secondary analyses from the Cardiovascular Inflammation Reduction Trial. *Eur Heart J*. 2020 Aug 14;41(31):2952-2961
119. Liu S, Wang C, Guo J, Yang Y, Huang M, Li L, Wang Y, Qin Y and Zhang M. Serum Cytokine Predict the Severity of Coronary Artery Disease Without Acute Myocardial Infarction. *Front. Cardiovasc. Med.*2022; 9:896810.
120. Simon T, Taleb S, Danchin N, et al. Circulating levels of interleukin-17 and cardiovascular outcomes in patients with acute myocardial infarction. *European Heart Journal* 2013; 34(8): 570–57.
121. Tarantino, G., Costantini, S., Finelli, C. et al. Is serum Interleukin-17 associated with early atherosclerosis in obese patients?. *J Transl Med* 2014; 12: 21
122. Kalinskaya A, Dukhin O, Lebedeva A, Maryukhnich E, Rusakovich G, Vorobyeva D, Shpektor A, Margolis L, Vasilieva E. Circulating Cytokines in Myocardial Infarction Are Associated With Coronary Blood Flow. *Front Immunol*. 2022 Feb 15;13:837642. doi: 10.3389/fimmu.2022.837642. PMID: 35242141; PMCID: PMC8886043.
123. 100.Lira-Junior R,Boström EA, Gustafsson A, et al.Periodontitis is associated to increased systemic inflammation in postmyocardial infarction patients. *Open Heart* 2021;8:e001674
124. 101.Montenegro MM, Ribeiro IWJ, Kampits C, Saffi MAL, Furtado MV, Polanczyk CA, Haas AN, Rösing CK. Randomized controlled trial of the effect of periodontal treatment on cardiovascular risk biomarkers in patients with stable coronary artery disease: Preliminary findings of 3 months. *J Clin Periodontol*. 2019 Mar;46(3):321-3
125. 102.Barale C, Frascaroli C, Senkeev R, Cavalot F, Russo I. Simvastatin Effects on Inflammation and Platelet Activation Markers in Hypercholesterolemia. *Biomed Res Int*. 2018; ;2018:6508709
126. Yin J, Liao SX, He Y, Wang S, Xia GH, Liu FT, Zhu JJ, You C, Chen Q, Zhou L, Pan SY, Zhou HW. 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(11):e002699
127. Smits LP, Kootte RS, Levin E, Prodan A, Fuentes S, Zoetendal EG, Wang Z, Levison BS, Cleophas MCP, Kemper EM, Dallinga-Thie GM, Groen AK, Joosten LAB, Netea MG, Stroes ESG, de Vos WM, Hazen SL, Nieuwdorp M. 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(7):e00834
128. Matsuzawa, Y., Nakahashi, H., Konishi, M. et al. Microbiota-derived Trimethylamine N-oxide Predicts Cardiovascular Risk After STEMI. *Sci Rep* 2019; 9: 11647
129. Sheng Z, Tan Y, Liu C, Zhou P, Li J, Zhou J, Chen R, Chen Y, Song L, Zhao H, Yan H. Relation of Circulating Trimethylamine N-Oxide With Coronary Atherosclerotic Burden in Patients With ST-segment Elevation Myocardial Infarction. *Am J Cardiol*. 2019;123(6):894-898. doi: 10.1016/j.amjcard.2018.12.018.
130. Medina-Vera I, Sanchez-Tapia M, Noriega-López L, Granados-Portillo O, Guevara-Cruz M, Flores-López A, Avila-Nava A, Fernández ML, Tovar AR, Torres N. A dietary intervention with functional foods reduces metabolic endotoxaemia and attenuates

- biochemical abnormalities by modifying faecal microbiota in people with type 2 diabetes. *Diabetes Metab.* 2019;45(2):122-131. doi: 10.1016/j.diabet.2018.09.004
131. Xu AA, Hoffman K, Gurwara S, White DL, Kanwal F, El-Serag HB, Petrosino JF, Jiao L. Oral health and the altered colonic mucosa-associated gut microbiota. *Dig Dis Sci.* 2021;66(9):2981-91
132. Imai J, Ichikawa H, Kitamoto S, et. al. A potential pathogenic association between periodontal disease and Crohn's disease. *JCI Insight.* 2021;6(23):e148543. doi: 10.1172/jci.insight.148543
133. Möller B, Kollert F, Sculean A, Villiger PM. Infectious Triggers in Periodontitis and the Gut in Rheumatoid Arthritis (RA): A Complex Story About Association and Causality. *Front Immunol.* 2020;11:1108. doi: 10.3389/fimmu.2020.0110
134. Xiao L, Huang L, Zhou X, Zhao D, Wang Y, Min H, Song S, Sun W, Gao Q, Hu Q, Xie S. Experimental Periodontitis Deteriorated Atherosclerosis Associated With Trimethylamine N-Oxide Metabolism in Mice. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022;11:820535. doi: 10.3389/fcimb.2021.820535. Erratum in: *Front Cell Infect Microbiol.* 2022;12:919013.
135. Komazaki R, Katagiri S, Takahashi H, Maekawa S, Shiba T, Takeuchi Y, Kitajima Y, Ohtsu A, Udagawa S, Sasaki N, Watanabe K, Sato N, Miyasaka N, Eguchi Y, Anzai K, Izumi Y. Periodontal pathogenic bacteria, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* affect non-alcoholic fatty liver disease by altering gut microbiota and glucose metabolism. *Sci Rep.* 2017 Oct 24;7(1):13950. doi: 10.1038/s41598-017-14260-9.

Anexo A

Tabla suplementaria 1. Concentración de citocinas de acuerdo a la escala de riesgo basado en la inflamación sistémica y enfermedad periodontal; se muestra la media y el rango intercuartil calculado por la prueba de Tukey. P value, prueba de Man-Whitney o Kruskal Wallis. Análisis de correlación Spearman (Rho).

	Total	Sin riesgo	Leve	Moderado	Grave	p value	Correlación Rho Spearman	
							Escala de riesgo basado	Enfermedad periodontal
IL 6	193.56 (173.23)	146.73 (173.23)	178.16 (168.25)	267.83 (209.58)	164.40 (222.61)	0.568	0.130	-0.201
IL 1β	19.22 (45.22)	24.19 (45.22)	20.52 (30.92)	9.86 (66.26)	0.00 (51.52)	0.646	-0.241	0.073
TNF	57.91 (84.14)	84.65 (84.14)	35.40 (71.45)	58.98 (59.32)	16.18 (93.20)	0.720	-0.194	0.072
IFN γ	70.59 (163.36)	73.95 (163.36)	30.02 (119.83)	71.67 (142.54)	85.24 (176.15)	0.554	0.182	0.036
IL 8	9.12 (19.23)	14.23 (19.23)	3.87 (7.38)	21.67 (51.02)	21.43 (32.62)	0.549	0.158	0.058
IL 10	18.21 (38.57)	25.01 (38.57)	22.46 (72.75)	23.75 (29.67)	1.93 (22.16)	0.482	-0.198	0.029
IL 4	78.78 (380.89)	69.55 (380.89)	50.83 (177.67)	382.31 (327.89)	0.07 (45.20)	0.168	-0.130	0.014
IL 17A	13.26 (23.47)	15.31 (17.85)	12.77 (18.35)	18.25 (31.72)	3.66 (38.67)	0.624	-0.081	0.043
TGF β	205.59 (176.75)	245.31 (176.75)	205.59 (172.47)	126.73 (315.99)	140.39 (195.11)	0.704	-0.241	0.007

Anexo B

Título de publicación principal

Hernández-Ruiz P, Amezcua-Guerra LM, López-Vidal Y, González-Pacheco H, Pinto-Cardoso S, Amedei A, Aguirre-García MM. Comparative characterization of inflammatory profile and oral microbiome according to an inflammation-based risk score in ST-segment elevation myocardial infarction. *Front Cell Infect Microbiol.* 2023 Feb 13;13: 1095380. doi: 10.3389/fcimb.2023.1095380. PMID: 36860987; PMCID: PMC9968971.

Publicaciones

Relación entre la disbiosis de la microbiota oral y la enfermedad cardiovascular aterosclerótica. *Arch. Cardiol. Méx.* [online]. 2022, vol.92, n.3, pp.371-376. Epub 08-Ago-2022. ISSN 1665-1731.

Constantino-Jonapa LA, Espinoza-Palacios Y, Escalona-Montaño AR, Hernández-Ruiz P, Amezcua-Guerra LM, Amedei A, Aguirre-García MM. Contribution of Trimethylamine N-Oxide (TMAO) to Chronic Inflammatory and Degenerative Diseases. *Biomedicines.* 2023 Feb 2;11(2):431. doi: 10.3390/biomedicines11020431. PMID: 36830968; PMCID: PMC9952918.