

TESIS DOCTORAL



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA 
Facultat de Medicina i Odontologia

DEPARTAMENTO DE MEDICINA
Programa de doctorado 3139 en Medicina

ESTUDIO DEL MICROBIOMA EN LA TROMBOEMBOLIA PULMONAR AGUDA



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA

Alberto García Ortega

2024

TESIS DOCTORAL

Presentada por:
Alberto García Ortega

Dirigida por:
Dra. Remedios Otero Candelera
Dra. Raquel López Reyes

Tutor:
Dr. Juan José Soler Cataluña

Valencia, junio de 2024



DEPARTAMENTO DE MEDICINA

Programa de doctorado 3139 en Medicina

ESTUDIO DEL MICROBIOMA EN LA TROMBOEMBOLIA PULMONAR AGUDA

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Alberto García Ortega

Dirigida por:

Dra. Remedios Otero Candelera

Dra. Raquel López Reyes

Tutor:

Dr. Juan José Soler Cataluña

Valencia, junio de 2024

INFORME DIRECTORES/AS Y TUTOR/A PARA DEPÓSITO DE TESIS

Director (es) / Codirector (es):

1.- Apellidos y nombre: Remedios Otero Candelera N.I.F. 28859786-F, Departamento/Instituto: Neumología
Centro: Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla

2.- Apellidos y nombre: Raquel López Reyes N.I.F. 5335769-M, Departamento/Instituto: Neumología Centro:
Hospital Universitari i Politècnic La Fe de Valencia

Tutor o tutora (si procede)

Apellidos y nombre: Juan José Soler Cataluña N.I.F. 22686818-D, Departamento/Instituto: Medicina Centro:
Universidad de Valencia

Directores/as y tutor/a, respectivamente, de la tesis doctoral: "ESTUDIO DEL MICROBIOMA EN EL
TROMBOEMBOLISMO PULMONAR"

de D/Dña. Alberto García Ortega,

estudiante del Programa de Doctorado 3139 Medicina (RD99/2011) en Medicina de la Universitat de València,
emiten informe *favorable* para la realización del depósito y la defensa de la tesis doctoral.

Fecha: 29 de mayo de 2024

OTERO
CANDELERA
MARIA REMEDIOS
- 28859786F
Firmado digitalmente
por OTERO
CANDELERA MARIA
REMEDIOS - 28859786F
Fecha: 2024.05.31
01:50:38 +02'00'

Fdo.: Remedios Otero Candelera

Directora

RAQUEL
|LOPEZ|
REYES
Firmado
digitalmente por
RAQUEL|LOPEZ|
REYES
Fecha:
2024.05.31
19:25:11 +02'00'

Fdo.: Raquel López Reyes

Co-Directora

JUAN JOSE
SOLER
CATALUÑA -
NIF:22686818D
Firmado digitalmente
por JUAN JOSE SOLER
CATALUÑA -
NIF:22686818D
Fecha: 2024.05.31
16:32:37 +02'00'

Fdo.: Juan José Soler Cataluña

Tutor

ESCUELA DOCTORAL
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

A Elena. A Guille. A Julieta.

Agradecimientos:

“...Ten siempre a Itaca en tu mente. Llegar allí es tu destino... Itaca te brindó tan hermoso viaje...”.

(extracto del poema Ítaca de C. P. Kavafis en 1911).

A mi directora de tesis, Remedios, por enseñarme el camino, su docencia y por permitirme conocer a la extraordinaria persona que nutre a la investigadora de renombre internacional.

A la Dra. Rosa del Campo, por su imprescindible papel científico y personal en todo el proceso de adentrarme en este mundo del microbioma.

A mis tutores durante el doctorando, el Dr. Gustavo Juan y el Dr. Juan José Soler, por su valiosa colaboración y apoyo.

A los Servicios de Neumología del Hospital Virgen del Rocío de Sevilla y del Hospital Txagorritxu de Vitoria, y a sus pacientes, sin cuya participación este proyecto no habría sido posible.

Al Dr. Alfonso Muriel y al Dr. David Hervás, por su inestimable colaboración en el análisis estadístico.

Al Dr. David Jiménez Castro, ideólogo natural de este proyecto, por ser fuente de inspiración y de orgullo profesional.

A todas las personas del Servicio de Neumología del Hospital Universitari i Politècnic La Fe, a quienes debo en gran medida mi desarrollo personal y profesional en los últimos diez años. En especial, a mi compañero, y sin embargo amigo, Miguel Ángel, mi mentor, por darme tantas y tan buenas herramientas para integrar la investigación en mi día a día, por hacerme mejor profesional y también mejor persona.

Al Servicio de Neumología del Hospital Universitario Doctor Peset, por acogerme con tanto cariño y respeto profesional durante este último año, permitiéndome integrarme tan rápidamente, así como por aportarme tanto para seguir aprendiendo y desarrollándome en todos los ámbitos.

Al resto de mis queridos compañeros de trabajo, neumólogos, enfermeras, auxiliares y otros especialistas, que demuestran el sentido de una vocación sanitaria de calidad y de entrega al cuidado de los demás de forma incondicional.

A mis amigos del alma, porque son familia, y siempre serán mis cimientos y mi casa.

A mi madre, porque un día hablamos de Ítaca, y desde entonces no dejo de disfrutar el camino en su búsqueda.

A mi padre, por enseñarme desde pequeño el valor del trabajo en equipo.

A Ana y a Diego, por regalarme a mi sobrina Clara, a quien quiero de un modo muy especial, y hacerme con ello el tío más orgulloso.

A mis suegros, Javier y María Jesús, a quienes quiero y admiro profundamente, y que me hacen sentir un hijo más.

A mi cuñada Clara, una suerte de mi vida y siempre un refuerzo positivo para ser mejor.

A Guillermo, mi querido hijo.

A Julieta, mi querida hija.

Pero, especialmente, a mi mujer, Elena, que es mi vida.

Valencia, Diciembre de 2023

ÍNDICE

INDICE DE ABREVIATURAS POR ÓRDEN ALFABÉTICO:	11
1. INTRODUCCIÓN:	15
1.1. Epidemiología de la TEP	15
1.2. Factores de riesgo de la TEP	17
1.2.1. Papel de las infecciones:	21
1.3. Fisiopatología de la TEP	24
1.3.1. Afectación cardiocirculatoria	24
1.3.2. Afectación pulmonar	26
1.3.3. Inflamación e infección en la fisiopatogenia de la TEP	27
1.4. Papel fisiológico del microbioma humano	29
1.5. Papel del microbioma humano en condiciones de enfermedad	32
1.5.1. Importancia de los metabolitos derivados del microbioma en su evaluación funcional	34
1.5.2. Microbioma humano en la enfermedad cardiovascular	35
1.6. Justificación del estudio:	41
1.7. ¿Cuál es nuestra hipótesis de trabajo?	46
2. OBJETIVOS DEL ESTUDIO:	49
3. MATERIAL Y MÉTODOS:	53
3.1. Diseño del estudio	53
3.2. Población del estudio:	54
3.3. Variables del estudio	55
3.4. Definiciones	56
3.5. Recogida de datos	58
3.5.1. Registro RIETE	58
3.5.2. Extracción y conservación de las muestras de sangre	58
3.5.3. Recogida de datos del grupo control	59
3.5.4. Análisis del microbioma y otras determinaciones complementarias	59
3.6. Análisis estadístico	60
3.7. Aspectos éticos y confidencialidad:	62

4. RESULTADOS:	67
4.1. Análisis descriptivo de pacientes y controles	67
4.1.1. Pacientes del estudio	67
4.1.2. Controles del estudio	68
4.2. Resultados por Objetivos de la Tesis Doctoral:	78
4.2.1. Objetivo Principal: Comparación del microbioma en muestras de sangre entre pacientes con tromboembolia pulmonar y controles sanos	78
4.2.2. Objetivo secundario 1: Comparación de los niveles de metabolitos derivados del microbioma en muestras de sangre entre pacientes con tromboembolia pulmonar	81
4.2.3. Objetivo secundario 2: Biomarcadores de inflamación en sujetos sanos y pacientes con TEP86	
4.2.4. Objetivo secundario 3: Biomarcadores de coagulación en sujetos sanos y pacientes con TEP93	
4.2.5. Objetivo secundario 4: Correlación e Integración de los metabolitos derivados del microbioma con los parámetros inflamatorios y de la coagulación	98
5. DISCUSIÓN:	105
5.1. Valoración de los resultados del estudio	105
5.1.1. Pacientes con tromboembolia de pulmón vs. controles sanos	106
5.1.1.1. Papel de los metabolitos derivados del microbioma	106
5.1.1.2. Papel de los biomarcadores inflamatorios	111
5.1.1.3. Papel de los biomarcadores de la coagulación	114
5.1.2. Papel de los metabolitos del microbioma en la identificación de factores de riesgo subyacentes	114
5.1.3. Correlación del microbioma con los parámetros inflamatorios	117
5.2. Limitaciones del estudio y futuras líneas de investigación	117
5.3. Potencial aplicabilidad práctica de los resultados	119
6. CONCLUSIONES:	125
7. ANEXOS:	129
8. BIBLIOGRAFÍA:	139

INDICE DE ABREVIATURAS POR ÓRDEN ALFABÉTICO:

- **ADN**: ácido desoxirribonucleico
- **AGCC**: ácidos grasos de cadena corta
- **ARNr**: ácido ribonucleico ribosomal
- **AUC**: área bajo la curva
- **CEI**: Comité de Ética de Investigación
- **CMV**: citomegalovirus
- **CPAP**: presión positiva continua sobre la vía aérea
- **CRDe**: cuaderno electrónico de recogida de datos
- **CXCL10**: ligando 10 de quimiocina con motivo C-X-C
- **DS**: desviación estándar
- **EGGD**: electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización
- **ELISA**: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
- **ETV**: enfermedad tromboembólica venosa
- **GC-MS**: acoplada a cromatografía de gases
- **GLP-1**: glucagón-like péptido 1
- **GPR**: receptores acoplados a la proteína G
- **HPTEC**: hipertensión pulmonar tromboembólica crónica
- **HR**: hazard ratio
- **IAM**: infarto agudo de miocardio
- **IC95%**: intervalo de confianza al 95%
- **IL**: interleucina
- **IFN- γ** : interferon gamma
- **MCP-1**: proteína quimioatrayente de monocitos 1
- **MICTEP**: microbioma en la tromboembolia pulmonar aguda
- **MPE**: máxima probabilidad de efecto
- **MS**: espectrometría de masas
- **NETs**: trampas extracelulares de neutrófilos
- **OR**: odds ratio
- **PAI-1**, inhibidor del activador del plasminógeno-1
- **PII**: Proyecto de Investigación Integrado

- **ProBNP**: péptido natriurético cerebral tipo B
- **PSGL-1**: ligando-1 de glicoproteína p-selectina
- **Q-PCR**: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
- **RIETE**: registro informatizado de pacientes con enfermedad tromboembólica
- **RMN**: resonancia magnética nuclear
- **sCD40L**: ligando CD40 soluble plaquetario
- **SEPAR**: Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica
- **TAC**: tomografía axial computerizada
- **TAS**: tensión arterial sistólica
- **TEP**: tromboembolia de pulmón
- **TLR**: receptor Toll-like
- **TNF- α** : factor de necrosis tumoral alfa
- **TGF- β 1**: factor de crecimiento transformante beta 1
- **TMAO**: N-óxido trimetilamina
- **tPA**: activador tisular del plasminógeno
- **TVP**: trombosis venosa profunda
- **VIH**: virus de la inmunodeficiencia humana

INTRODUCCIÓN:

1. INTRODUCCIÓN:

La tromboembolia de pulmón (TEP), la forma más grave de presentación de la enfermedad tromboembólica venosa (ETV), es producida por el enclavamiento o embolización de un trombo en las arterias pulmonares, desprendido desde un territorio venoso que, en la mayoría de las ocasiones, proviene de las venas pélvicas o de las piernas.¹ Aproximadamente, la mitad de todas las trombosis venosas profundas (TVP) migran (embolizan) a las ramas arteriales pulmonares.²

El microbioma se refiere a la comunidad de microorganismos, como bacterias, virus, hongos y otros microbios, que viven en el cuerpo humano, principalmente en el tracto gastrointestinal.^{3,4} El microbioma humano ha emergido en los últimos años como un regulador principal de la inflamación sistémica y la respuesta inmune, con impacto en distintas condiciones de enfermedad, tanto infecciosas como no infecciosas.^{5,6}

Aunque se ha estudiado la relación del microbioma con otras enfermedades cardiovasculares como la arteriosclerosis,^{7,8} actualmente no disponemos de estudios publicados hasta la fecha que relacionen alteraciones en el microbioma con la ETV ni tampoco, más concretamente, con la TEP.

1.1. Epidemiología de la TEP

La TEP, como forma de presentación más grave de la ETV, se mantiene como la tercera causa más frecuente de muerte cardiovascular, únicamente superada en frecuencia por el infarto agudo de miocardio (IAM) y los accidentes cerebrovasculares,⁹ a pesar de ser potencialmente prevenible en pacientes con determinados factores de riesgo identificables y de los recientes avances en su

manejo. Además, se trata de la principal causa de muerte intrahospitalaria potencialmente prevenible.^{10,11}

Distintos estudios epidemiológicos han demostrado una incidencia anual global aproximada de 1 caso por cada 1.000 habitantes, elevándose hasta casi un 1% en los mayores de 75 años.¹²⁻¹⁵ La incidencia real podría ser incluso superior, ya que puede no ser reconocida en distintas ocasiones.¹⁶ Esta incidencia ha aumentado progresivamente en las últimas décadas, debido al envejecimiento de la población y a un aumento en la prevalencia de comorbilidades asociadas con la ETV (como la obesidad y el cáncer),¹⁷ y favorecido tanto por las mejoras en las herramientas de diagnóstico, que actualmente ofrecen una mayor sensibilidad diagnóstica, como por una mayor disponibilidad de la tomografía axial computerizada (TAC) para detectar la TEP, que también ha contribuido a aumentar el diagnóstico de casos de forma incidental, en una gran proporción también asintomática.¹⁸ Estos datos de incremento en la incidencia de la TEP son consistentes en España, donde se ha observado un aumento progresivo a lo largo de los años, de 20,4 a 32,7 casos por 100.000 habitantes/año desde 2002 a 2011.¹⁹

Paralelo a este incremento en las tasas de incidencia de la TEP, los análisis de tendencias temporales sugieren un descenso en la mortalidad relacionada a la propia TEP, lo que puede ser explicado tanto por el incremento en el diagnóstico de casos de embolia de pulmón más subclínicos, de localización más periférica (i.e., embolias pulmonares subsegmentarias) y de forma incidental, como por el desarrollo de intervenciones terapéuticas más efectivas.²⁰⁻²³ A pesar de estos progresos en el manejo de la TEP y de su impacto en la mortalidad, aún más del 15% de los pacientes fallecen durante los tres meses siguientes del diagnóstico.¹⁷ En cualquier caso, esta mortalidad no se puede explicar sólo por la propia TEP, sino que otras condiciones graves coexistentes (cáncer, sepsis, enfermedad que motiva el ingreso, cirugía, etc...) justifican la mayoría de estas muertes.¹ Además de la mortalidad, otras complicaciones relevantes relacionadas con la TEP son los sangrados asociados a la anticoagulación, las recurrencias tromboembólicas y la persistencia de síntomas respiratorios residuales persistentes; esta última complicación relacionada con la TEP está definida principalmente por dos

entidades, la hipertensión pulmonar tromboembólica crónica (HPTEC) y la enfermedad tromboembólica crónica pulmonar.^{24,25}

Por lo tanto, la TEP constituye actualmente un problema sanitario de primer orden, por su elevado impacto en términos de morbilidad, costes y consumo de recursos.^{9,26} Según datos del Ministerio de Sanidad, durante el año 2021 se diagnosticaron 35.005 casos nuevos de TEP (APR-GRD) en España, frente a los 22.250 casos del año 2010, con una estancia hospitalaria media de 8,17 días y un coste medio de 4.880 euros.

1.2. Factores de riesgo de la TEP

La TEP se desarrolla como consecuencia de la interacción de distintos factores de riesgo trombogénicos relacionados tanto con el paciente, que suelen ser permanentes (como las trombofilias o los cánceres sin posibilidad de tratamiento curativo), como con el entorno, que suelen ser transitorios o reversibles (como la cirugía, los viajes de larga distancia o la terapia hormonal sustitutiva). Aunque en ocasiones la TEP aguda se produce en individuos en los que no se identifican inicialmente ninguno de estos factores de riesgo, frecuentemente coexisten uno o varios factores predisponentes que favorecen su aparición.²⁷

Por lo tanto, son múltiples los factores de riesgo asociados con el desarrollo del tromboembolismo venoso (**tabla 1**), relacionados con uno o varios de los mecanismos etiopatogénicos clásicos de la enfermedad propuestos por Virchow en el año 1856: estasis venosa (o flujo sanguíneo anómalo), lesión del endotelio vascular e hipercoagulabilidad (**figura 1**).²⁸

Los estados de hipercoagulabilidad pueden ser tanto adquiridos como congénitos. La hipercoagulabilidad adquirida se relaciona con distintas situaciones clínicas asociadas fundamentalmente con el estilo de vida, las comorbilidades y los procedimientos médicos. Por su parte, la hipercoagulabilidad congénita está presente en un 5-15% de las embolias pulmonares.

Tabla 1: Factores de riesgo predisponentes para el desarrollo de enfermedad tromboembólica venosa.

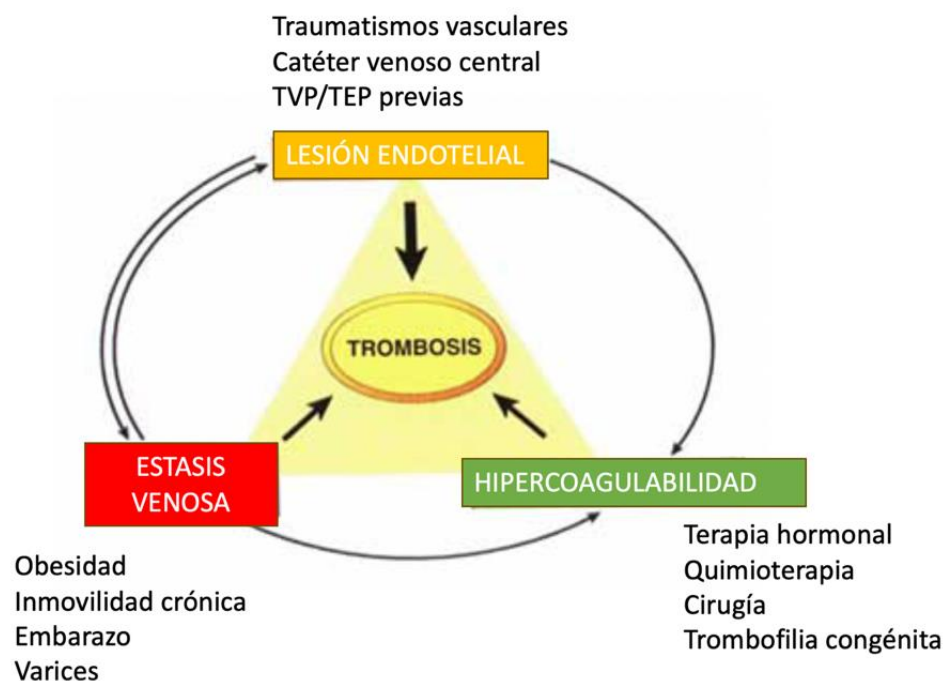
Riesgo fuerte (OR > 10)
Fractura de extremidades inferiores
Hospitalización por insuficiencia cardíaca o fibrilación auricular/flutter reciente
Cirugía de reemplazo de rodilla o de cadera
Traumatismo grave
Infarto de miocardio (en los 3 meses previos)
ETV previa
Lesión de columna vertebral
Riesgo moderado (OR 2-9)
Cirugía de rodilla artroscópica
Enfermedades autoinmunes
Transfusión de sangre
Catéteres venosos centrales
Quimioterapia
Insuficiencia cardíaca congestiva o insuficiencia respiratoria
Agentes estimulantes de la eritropoyesis
Terapia hormonal sustitutiva, terapia anticonceptiva (dependientes de la formulación) y fecundación <i>in-vitro</i>
Periodo postparto
Infección (neumonía, infección del tracto urinario y VIH)
Enfermedad inflamatoria intestinal
Cáncer (mayor riesgo en enfermedad metastásica)
Ictus paralítico
Trombosis venosa superficial
Trombofilia
Riesgo débil (OR < 2)
Reposo en cama > 3 días
Diabetes mellitus
Hipertensión arterial
Sedestación por viaje prolongado (e.g., viaje en coche o en avión de larga duración)
Edad avanzada
Cirugía laparoscópica
Obesidad
Embarazo
Varices

Abreviaturas: ETV, enfermedad tromboembólica venosa; OR, odds ratio; VIH, virus de la inmunodeficiencia humana.

Situaciones clínicas como la obesidad, el embarazo o la insuficiencia venosa periférica favorecen la estasis venosa. Más infrecuente es la agenesia de la vena cava inferior, una anomalía vascular congénita caracterizada por la ausencia del segmento infrarrenal, renal y/o suprarrenal de la vena cava inferior, y que llega a identificarse en casi el 5% de los pacientes menores de 30 años que presentan una TVP sin identificarse otros factores de riesgo.²⁹ Las situaciones de inmovilidad crónica también favorecen esta estasis venosa.

El tercer mecanismo de la tríada de Virchow es la lesión endotelial, que se produce en determinadas entidades que condicionan un traumatismo venoso; esta lesión endotelial puede ser más indirecta, como sucede en las fracturas o en determinados procedimientos quirúrgicos, o a partir de traumatismos más directos sobre el endotelio vascular, como sucede en portadores de catéteres venosos centrales.

Figura 1: Mecanismos etiopatogénicos de la enfermedad tromboembólica venosa: Tríada de Virchow.



Abreviaturas: TEP, tromboembolia de pulmón; TVP, trombosis venosa profunda.

En cualquier caso, a pesar de nuestro mejor conocimiento sobre los factores de riesgo, actualmente más de un tercio de los episodios tromboembólicos venosos se producen sin que seamos capaces de identificar un factor que lo provoque, por lo que sigue siendo crucial la identificación de nuevos factores de riesgo.¹⁵

Clásicamente, las guías de práctica clínica han clasificado las embolias pulmonares en “provocadas” por un factor de riesgo externo (o adquirido) o “idiopáticas” con un interés eminentemente práctico, dirigido a la toma de decisiones sobre la adecuada duración del tratamiento anticoagulante. De este modo, la TEP habitualmente se consideraba como provocada cuando se identificaba un factor de riesgo potencialmente reversible asociado al evento tromboembólico venosa en las últimas semanas previas al diagnóstico (esto es, cirugía, traumatismo mayor, inmovilización, embarazo, toma de anticonceptivos orales o terapia hormonal sustitutiva); en contraposición, la TEP se clasificaba como idiopática (esto es, no provocada o espontánea) en ausencia de estos criterios.^{30,31} Sin embargo, esta clasificación dicotómica en provocada e idiopática se considera confusa, presenta limitaciones relevantes y resulta poco práctica para la toma de decisiones individualizadas, debido a que frecuentemente los pacientes no se ajustan bien a estas categorías. Además, el término idiopático puede sugerir erróneamente que no existe una razón para el episodio tromboembólico venoso. Por todo lo anterior, las últimas guías europeas publicadas para el manejo de la embolia pulmonar evitan esta terminología etiológica dicotómica, esforzándose en ampliar la estratificación de manera más discriminativa.⁹

Por último, cabe destacar que la TEP puede ser integrada dentro de una continuidad de enfermedad cardiovascular.⁹ La cardiopatía isquémica reciente y la insuficiencia cardiaca incrementan el riesgo de desarrollar un episodio de ETV, y esta relación parece ser bidireccional.³² Actualmente conocemos que la ETV comparte algunos factores de riesgo con la trombosis arterial, como sucede con la arteriosclerosis: obesidad, hipertensión arterial y diabetes mellitus, entre otros.³³⁻³⁵ Así, esta asociación entre enfermedad arterial y venosa puede deberse a estos factores de riesgo comunes, pero también a otros aún no aclarados.

Por lo tanto, la mejor comprensión de los factores de riesgo de ETV resulta crítica para optimizar las medidas de prevención de esta enfermedad, en individuos o grupos de pacientes con mayor riesgo de desarrollarlo.^{27,36}

1.2.1. Papel de las infecciones:

La asociación entre infección y eventos cardiovasculares cardíacos y cerebrales ya ha sido reportada con anterioridad.^{37,38} En cuanto a la ETV, hay que tener en cuenta que cualquier asociación entre infección y ETV tiene una particular importancia clínica debido a la alta prevalencia y relevancia clínica de ambas condiciones clínicas. Así, entre los distintos factores de riesgo asociados con la ETV, el papel que tienen las infecciones en su desarrollo ha sido estudiado ampliamente en las últimas décadas.³⁹

La infección aguda y su correspondiente estado proinflamatorio podrían incrementar el riesgo de trombosis, explicado mediante cualquiera de los tres mecanismos etiopatogénicos clásicos de la triada de Virchow.⁴⁰ La infección podría afectar a la estasis venosa o predisponer a una situación de hipercoagulabilidad sanguínea. Sin embargo, probablemente el daño endotelial sea el mecanismo más implicado en el riesgo trombótico de la infección, tanto por daño directo sobre la pared del vaso como secundario a la inflamación acompañante. Esta teoría se sustenta en un estudio clásico realizado en una serie de voluntarios sanos a quienes se administraron citocinas proinflamatorias, que suelen elevarse ante estados de infección. Las citocinas produjeron una disfunción endotelial transitoria que condujo a un aumento de la actividad de la ciclooxigenasa, reversible mediante la acción de fármacos anti-inflamatorios como el ácido acetilsalicílico o la hidrocortisona.⁴¹ Así, las infecciones son consideradas actualmente un factor de riesgo moderado para la aparición de una TEP, particularmente la neumonía, la infección del tracto urinario y la infección por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).^{37,42}

En las últimas dos décadas se han publicado grandes estudios epidemiológicos que han aportado información muy relevante acerca del papel que ejercen las infecciones en el desarrollo de la ETV. Las dos primeras series poblacionales grandes que estudiaron esta relación fueron los estudios SIRIUS y MEDENOX. En el primero de ellos, un estudio caso-control realizado con 636 pacientes diagnosticados de una infección manejada ambulatoriamente, la infección incrementó el riesgo ajustado de ETV casi dos veces (*odds ratio* [OR] 1,95;

intervalo de confianza al 95% [IC95%] 1,31-2,92).⁴³ En la serie de MEDENOX, que en este caso incluyó pacientes hospitalizados por algún motivo infeccioso, también se observó un riesgo aumentado de ETV (OR 1,74; IC95% 1,12-2,75).⁴⁴

Smeeth *et al.* estudiaron a una cohorte poblacional de 11.033 pacientes con ETV que fueron registrados en la *Health Improvement Network* del Reino Unido. Los autores identificaron un incremento del riesgo de ETV en los pacientes con infecciones respiratorias o urinarias agudas, mostrando que la infección aguda podría ser un factor de riesgo transitorio para el desarrollo de ETV, principalmente en las dos semanas posteriores a la infección.⁴² Más recientemente, en otro estudio de casos-contróles, se evaluó la asociación de la infección respiratoria con la ETV, y se obtuvo que la infección respiratoria aumentaba el riesgo de presentar tanto una TVP a las 4 semanas (OR 2,64; IC95% 1,62-4,29) como una TEP a los 3 meses (OR 2,50; IC95% 1,33-4,72).³⁷ Por su parte, un estudio poblacional realizado en Estados Unidos, que incluyó a americanos de más de 50 años, observó que la infección durante los 3 meses previos fue el desencadenante más habitual de hospitalización por ETV, incrementando este riesgo casi 3 veces. Además, se encontró que este riesgo fue incluso superior en el caso de las infecciones respiratorias.⁴⁵

También debe ser tenido en consideración el estado de postración y reposo en cama que, en ocasiones, conlleva el propio proceso infeccioso, y que es otro factor de riesgo adicional bien establecido para el desarrollo de la ETV.⁹ En un análisis de los datos recogidos en el registro RIETE (Registro Informatizado de pacientes con Enfermedad TromboEmbólica) de 47.390 pacientes con ETV, Frasson *et al.* estudiaron el impacto de las inmobilizaciones motivadas por procesos infecciosos.⁴⁶ Excluyendo a los pacientes con trombosis asociada a una intervención quirúrgica reciente (≤ 2 meses), hasta el 3,9% de los pacientes incluidos en RIETE presentaban el antecedente reciente de una inmobilización por una infección aguda. Los datos de este estudio apoyan que la infección contribuye en la patogénesis de la ETV, suponiendo un factor de riesgo adicional a los propios efectos etiopatogénicos producidos por la inmobilización.

En cuanto a la etiología de la infección, se ha estudiado la contribución de diversos microorganismos en la génesis de la ETV, fundamentalmente bacterias (bacterioma) y virus (viroma). Los pacientes con infección aguda por citomegalovirus (CMV), evaluada mediante seropositividad IgM frente a CMV, presentan una incidencia de ETV del 6,9%. Esta trombosis asociada a CMV puede explicarse por el aumento en la actividad pro-coagulante endotelial producida por el daño endotelial directo, la adherencia plaquetaria y el estímulo para generar trombina y factor VIII, induciendo la producción de anticuerpos antifosfolípido y, por último, reduciendo la actividad fibrinolítica endógena.⁴⁷⁻⁵⁰ Emmerich *et al.* evaluaron la relación de la infección por *Chlamydia pneumoniae* (según diagnóstico serológico) con la ETV en un trabajo que incluyó a 176 pacientes diagnosticados de ETV y 197 controles; este estudio reportó que la mitad de los casos presentaban niveles elevados de IgG para *C. pneumoniae*, con una OR de 7,7 (IC95% 4,5-13,2). Este hallazgo ha sido confirmado en series posteriores.⁵¹ En otro estudio realizado con una gran cohorte danesa, se obtuvo que los pacientes hospitalizados por una bacteriemia adquirida en la comunidad presentan un mayor riesgo de desarrollar problemas trombóticos durante los 90 días siguientes en comparación con controles emparejados hospitalizados (OR 1,9; IC95% 1,4-2,7). Además, este riesgo fue superior en los pacientes con bacteriemia adquirida en la comunidad causada por microorganismos gram positivos (OR 2,5; IC95% 1,6-4,1) y, entre estas, las debidas a *Staphylococcus aureus* (OR 7,2; IC95% 2,7-19,2)⁵², resultados que son consistentes con otros trabajos anteriores.⁵³

La relación de las infecciones con el desarrollo de eventos trombóticos ha sido evaluada también desde una perspectiva terapéutica. Multitud de trabajos, incluidos ensayos clínicos aleatorizados, han evaluado el impacto de distintas estrategias terapéuticas de tromboprofilaxis en pacientes que presentan una infección aguda, fundamentalmente en pacientes hospitalizados.⁵⁴ Basado en los resultados de distintos ensayos clínicos realizados hasta la fecha, actualmente no se recomienda la tromboprofilaxis de forma general para los pacientes no-quirúrgicos que ingresan por una infección aguda.⁵⁵⁻⁶⁰ Así, se recomienda la tromboprofilaxis farmacológica en los pacientes con infección respiratoria aguda grave que precisan encamamiento, y se sugiere la tromboprofilaxis en pacientes

con infección aguda no encamados que presentan otros factores de riesgo adicionales.⁶¹

Según datos del registro RIETE, hasta en el 45% de los pacientes con ETV no se identifica ningún factor de riesgo predisponente, pero podría subyacer una infección no diagnosticada que predispondría de forma similar al desarrollo de la trombosis.⁶²

En resumen, de acuerdo con la literatura, que incluye varios estudios epidemiológicos con importantes tamaños muestrales, las infecciones agudas son un factor de riesgo de ETV, fundamentalmente en el caso de las infecciones respiratorias y urinarias. Además de la localización de la infección, otras características de la infección, como son el agente etiológico, o la de reposo en la cama, podrían ser determinantes en la caracterización del riesgo trombótico.

1.3. Fisiopatología de la TEP

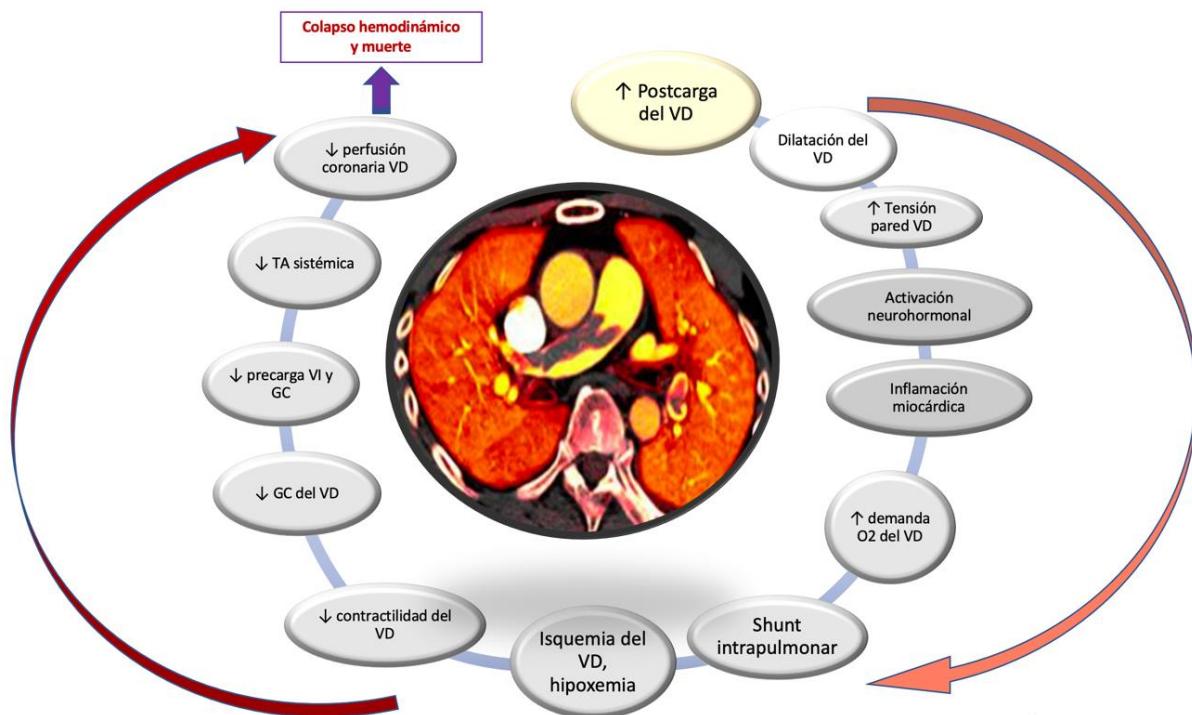
La TEP aguda impacta directamente sobre la circulación pulmonar y el intercambio gaseoso, y existe una evidencia creciente sobre el papel de la inflamación en la fisiopatología de la enfermedad.

1.3.1. Afectación cardiocirculatoria

Desde el punto de vista hemodinámico, inicialmente se puede producir un aumento brusco de las resistencias vasculares pulmonares que puede conllevar el desarrollo de una hipertensión pulmonar aguda y una sobrecarga aguda de presión sobre las cavidades cardíacas derechas.³⁹ La fisiopatología y las manifestaciones clínicas de la TEP dependen principalmente de tres factores principales que condicionan la respuesta hemodinámica: a) la extensión de la oclusión vascular pulmonar y el tamaño del coágulo; b) la reserva cardiopulmonar previa del paciente; c) el efecto neurohormonal. La embolia pulmonar impacta por lo tanto de forma variable tanto en la circulación sanguínea como en el intercambio gaseoso, y la descompensación hemodinámica no ocurre únicamente como

consecuencia de la obstrucción mecánica del flujo sanguíneo pulmonar, ya que también van a intervenir distintos mediadores liberados a la circulación sanguínea (figura 2).⁶³

Figura 2: Fisiopatología de la tromboembolia pulmonar aguda e impacto en la circulación pulmonar y sistémica.

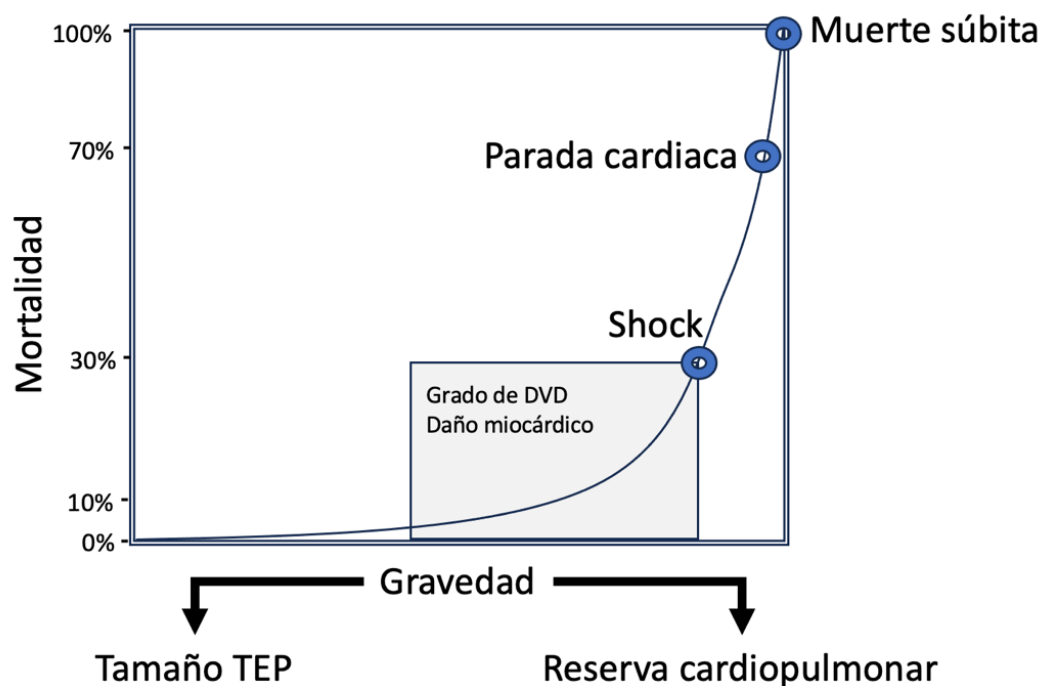


Abreviaturas: GC, gasto cardiaco; VD, ventrículo derecho; VI, ventrículo izquierdo.

En la TEP aguda, la disfunción del ventrículo derecho es un síndrome rápidamente progresivo caracterizado por la congestión sistémica resultante del trastorno producido en el llenado del ventrículo derecho y/o el descenso en la fracción de eyección del ventrículo derecho. Por lo tanto, la disfunción ventricular derecha es el signo principal del impacto pernicioso que acontece en la TEP aguda sobre las cavidades cardiacas, producida por el incremento agudo de la presión del ventrículo derecho, y que es causa principal de la muerte precoz por la TEP. De este modo, el colapso hemodinámico será la situación final y más grave que puede acontecer como consecuencia de esta disfunción ventricular derecha (figura 3).

Adicionalmente, la TEP aguda puede causar daño miocárdico por isquemia del ventrículo derecho, lo que se explica principalmente por el desequilibrio entre el aporte y la demanda de oxígeno a nivel de los cardiomiocitos expuestos a esta situación de incremento de la tensión parietal del ventrículo derecho; Además, también puede producirse una compresión de la arteria coronaria derecha que favorece la isquemia miocárdica. Este daño miocárdico implica también una disminución en la fuerza contráctil del ventrículo derecho.

Figura 3: Relación entre la gravedad de la tromboembolia pulmonar aguda y el pronóstico.



Abreviaturas: DVD, disfunción ventricular derecha; TEP, tromboembolia de pulmón.

1.3.2. Afectación pulmonar

En el seno de una TEP aguda, la oclusión mecánica de las arterias pulmonares causa primariamente una redistribución del flujo sanguíneo en los pulmones, reduciendo el lecho vascular pulmonar sobre el que se realizará el intercambio gaseoso. En consecuencia, se origina un trastorno en la relación ventilación/perfusión pulmonar, por el desarrollo de más zonas correctamente ventiladas, pero inadecuadamente perfundidas en las áreas del pulmón

embolizadas, que condicionan un incremento del espacio muerto. Paralelamente, pueden aparecer zonas perfundidas no ventiladas en áreas no afectadas por las oclusiones trombóticas, que condicionan un mayor *shunt*.^{64,65} En consecuencia, se produce una interferencia en el intercambio gaseoso que característicamente causa un descenso de la presión arterial de oxígeno con un incremento del gradiente alveolo-arterial de oxígeno. Todo lo anterior traduce, en definitiva, una situación de ineficiencia ventilatoria asociada a la TEP aguda.⁶³ Secundariamente, por la estimulación de los quimiorreceptores, se puede producir una hiperventilación alveolar. Por lo tanto, los pacientes con TEP pueden presentar una hipocapnia y una alcalosis respiratoria secundaria al incremento de la ventilación minuto total.

Además, en caso de existencia de un *foramen ovale*, cuando la situación hemodinámica aguda de la TEP condiciona una elevación en las presiones de las cavidades derechas, puede producirse un cortocircuito derecha-izquierda a nivel intracardiaco, por la inversión en el gradiente de presión existente entre la aurícula derecha y la aurícula izquierda. Este fenómeno, además de incrementar el riesgo de embolia paradójica e ictus, puede causar una hipoxemia más marcada, debiendo ser sospechado en pacientes con hipoxemias más graves.⁶⁶

Por último, en pacientes con trombos más periféricos, en las arterias pulmonares de pequeño tamaño pueden producirse zonas de hemorragia alveolar e infarto pulmonar, con pleuritis y derrame pleural, lo que disminuye la distensibilidad pulmonar y empeora la relación ventilación-perfusión, contribuyendo a esta hipoxemia asociada a la TEP.

1.3.3. Inflamación e infección en la fisiopatogenia de la TEP

La patogénesis de la TEP es compleja y la inflamación predispone al desarrollo de la enfermedad.⁶⁷ La inflamación activa a las células endoteliales, a las plaquetas y los leucocitos favoreciendo la activación de la coagulación. Pero la inflamación no sólo inicia la cascada de la coagulación, sino que también puede producir una coagulopatía de consumo y un incremento de las citocinas, quimiocinas y

leucocitos. La inflamación es por lo tanto un factor de riesgo importante de ETV.⁶⁸ Así, distintos estados proinflamatorios tales como las infecciones, las sepsis o las enfermedades inflamatorias intestinales se han asociado con la aparición de ETV.^{69,70} Además, la inflamación se ha asociado con estados de disbiosis, aumento de la permeabilidad intestinal y la producción de metabolitos específicos que podrían predisponer a un mayor riesgo de trombosis.⁶⁸

En la TEP aguda, la presencia de una respuesta inflamatoria aguda favorece la activación plaquetaria y el reclutamiento de neutrófilos, que ya se ha asociado a un peor pronóstico en los pacientes con TEP aguda.^{71,72} Por el contrario, se puede producir una disminución de los linfocitos en respuesta a la liberación de adrenalina y glucocorticoides durante la activación simpática.⁷³ Por lo tanto, la inflamación sistémica, producida o no por una infección subyacente, parece tener también un papel importante en la patogénesis de la enfermedad.

Algunos trabajos sustentan el papel de la respuesta inflamatoria asociada con la TEP aguda. Esta inflamación, tanto sistémica como más local a nivel del miocardio del ventrículo derecho, podría contribuir también al desarrollo de disfunción ventricular derecha.⁷⁴⁻⁷⁶

Así, algunos trabajos han observado un peor pronóstico en los pacientes con TEP con valores elevados de interleucina (IL) 6.⁷⁷ Similarmente, se ha investigado el papel pronóstico de algunos índices celulares, como la relación neutrófilo-linfocito (NLR) o la relación plaqueta-linfocito (PLR), que aportan una información integral del estado inflamatorio y de inmuno-trombosis de los pacientes con TEP.^{73,75,78,79} Un metaanálisis reciente que incluyó siete estudios retrospectivos de 2.323 pacientes encontró una mayor mortalidad global en aquellos pacientes con valores más elevados de NLR (OR 10,13; IC95% 6,57-15,64) y de PLR (OR 6,32; IC95% 4,52-8,84).⁸⁰

Con respecto al papel de las infecciones en la fisiopatogenia de la TEP, datos del registro RIETE muestran que, en pacientes inmovilizados debido a una infección, la ETV presenta unas características diferentes a las del resto de pacientes con antecedente de inmovilización por otros motivos.⁴⁶ Entre estas características, los

pacientes inmovilizados por una infección desarrollan más precozmente la ETV y, en el caso de infecciones respiratorias, se presentan más frecuentemente como TEP; además, la inmovilización por infección se asocia a una menor tasa de riesgo de sangrados fatales y de muerte por TEP a los 3 meses.⁴⁶

1.4. Papel fisiológico del microbioma humano

Aunque la era de las ómicas ha supuesto un avance muy significativo en todos los aspectos de la investigación científica, su impacto ha sido particularmente evidente en los estudios de las comunidades microbianas y el microbioma humano.⁸¹

El microbioma humano engloba los genomas colectivos de todas las bacterias, arqueas, virus eucarióticos, bacteriófagos, hongos y protozoos que colonizan el cuerpo, adquiridos tanto por transmisión vertical como por exposición al medio ambiente.⁸² El término microbioma se refiere al número total de microorganismos y su material genético, que se usa en contraposición al término microbiota, que es la población microbiana presente en los diferentes ecosistemas del cuerpo.⁴

Desde el 2008, año en el que se inició el proyecto *Human Microbiome*, se empezó a caracterizar el microbioma relacionado con salud, a través de su análisis pormenorizado en 300 voluntarios sanos.⁸³ Este hito ha sentado las bases del conocimiento sobre el microbioma, tanto de la diferente distribución por regiones corporales, como de su importante participación en las funciones fisiológicas del organismo de sujetos sanos, que incluyen la digestión, el metabolismo y la respuesta inmunológica.⁴

Este conocimiento ha sido desarrollado utilizando enfoques metagenómicos, metatranscriptómicos, metaproteómicos y metabolómicos. El desarrollo de las nuevas herramientas de secuenciación masiva permite realizar un análisis masivo de datos, capaces de analizar metagenomas completos en poco tiempo y menor coste; el perfeccionamiento de las técnicas meta-ómicas, particularmente las del gen que codifica la subunidad 16S del ácido ribonucleico ribosomal (ARNr),

solventan los problemas asociados a los métodos clásicos de diagnóstico basados en el cultivo. Esto ha favorecido la identificación y asignación taxonómica de la mayoría de los microorganismos sin necesidad de cultivarlos.⁸⁴ De esta manera se identifican los microorganismos que están presentes en los diferentes órganos del cuerpo humano y la función que desempeñan en su interacción con el huésped.⁸⁵

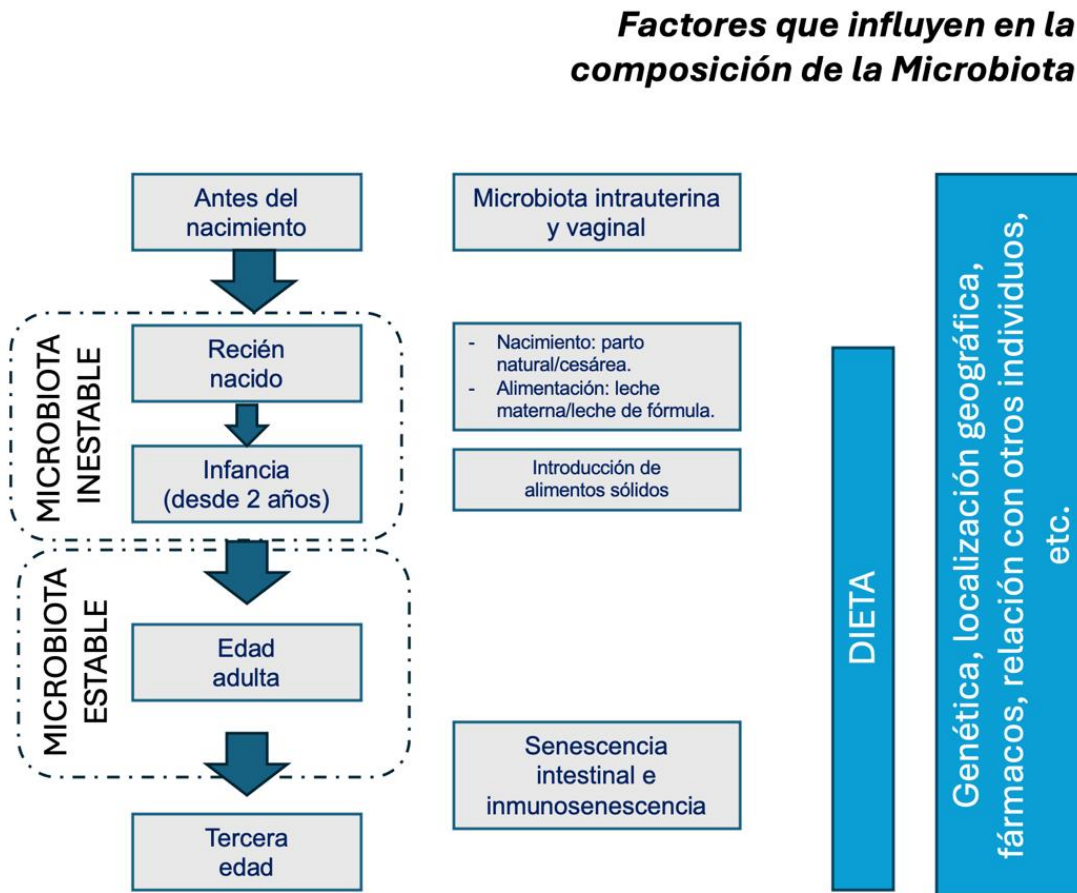
Los principales nichos de microorganismos en el cuerpo humano son el tracto gastrointestinal, la cavidad oral, el tracto urogenital, la piel y las vías aéreas superior e inferior.⁸⁶ Se estima que sólo el microbioma de localización intestinal contiene 150 genes más que el ser humano, existiendo una interacción constante entre ambos.⁸⁷ Múltiples estudios han demostrado que cada región corporal se caracteriza por determinadas comunidades de microbios y que cada persona se caracteriza por un microbioma diferente, único.⁸⁸ Esta variabilidad interpersonal se debe a diferencias en la carga genética, del origen geográfico, la edad, los estilos de vida, la dieta y de la exposición a determinados microbios, así como a antibióticos o probióticos.^{85,89} Además, se ha demostrado que la composición del microbioma también se ve afectada por eventos tempranos en la vida como el modo de parto, la edad gestacional, la hospitalización y el método de alimentación.⁹⁰ Sin embargo, la composición del microbioma es relativamente estable a lo largo de la vida, si bien puede verse alterada por determinados elementos exógenos.⁹¹ Finalmente, la abundancia relativa de unas especies frente a otras y la variabilidad entre individuos es explicada por diferencias genéticas y factores medioambientales, incluyendo la dieta y la utilización de antibióticos (figura 4).⁸⁸

Este complejo ecosistema y la interacción con el microbioma humano beneficia al hospedador, ya que algunas de las funciones del microbioma incluyen la conversión de nutrientes y la protección frente a microorganismos patogénicos.⁹² La microbiota, fundamentalmente la localizada en el tracto digestivo, ha emergido en los últimos años como un regulador fundamental en la respuesta inflamatoria sistémica e inmunológica.⁹³⁻⁹⁶

Hay una importante relación entre el microbioma intestinal, su barrera epitelial y el sistema inmune. Las células intestinales, además de actuar como barrera, detectan a los microorganismos mediante los receptores *Toll-like* (TLR) y otros patrones de reconocimiento, cuya activación desencadena la activación del sistema inmunológico.⁹⁷ Los TLRs también median en la interacción entre plaquetas y neutrófilos con la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs), que contribuye a la agregación plaquetaria. Por lo tanto, el microbioma puede afectar al sistema inmunológico y favorecer el fenómeno de inmunotrombosis.⁶⁸ Más allá de su actividad sobre el sistema inmune, el microbioma intestinal también se encarga de funciones metabólicas.⁹⁸

En resumen, actualmente conocemos que son numerosas las funciones fisiológicas del microbioma humano, así como sus interacciones con el hospedador, aunque aún no comprendemos bien muchos de los mecanismos implicados.⁹⁹⁻¹⁰¹

Figura 4: Evolución de la composición de la microbiota a lo largo de la vida y factores modificadores.



1.5. Papel del microbioma humano en condiciones de enfermedad

El microbioma, con sus funciones dentro del organismo humano, a nivel tanto local como sistémico, es considerado fundamental para la vida.³ Las diferencias en su composición ejercen una influencia contrastada en los estados de salud y enfermedad. Así, el desequilibrio en la composición del microbioma se denomina disbiosis.^{86,92} En los últimos años han ido apareciendo exponencialmente una gran cantidad de publicaciones científicas que vinculan las diferencias en la composición microbiana a estados de salud y de enfermedad en distintos órganos y tejidos. Más concretamente, la disbiosis se ha asociado con algunas situaciones de enfermedad.¹⁰²

Debe subrayarse que el impacto de la disbiosis va más allá de las enfermedades infecciosas. De hecho, los desequilibrios del microbioma también están relacionados con enfermedades consideradas no transmisibles.¹⁰³ De esta manera, se ha identificado la asociación de distintas alteraciones en el microbioma con determinadas condiciones clínicas y con el desarrollo de distintas enfermedades consideradas clásicamente como no transmisibles, tan distintas entre sí como la diabetes, el cáncer, el asma, el autismo o las enfermedades inflamatorias intestinales.^{99,104-113}

De hecho, en modelos animales de enfermedades no transmisibles, se ha demostrado que el trasplante de una microbiota disbiótica a animales sanos favorece el desarrollo de enfermedad.^{114,115} En este sentido, la inflamación favorece la disbiosis y una mayor permeabilidad intestinal, con mayor producción y la liberación de determinados metabolitos a la circulación sanguínea.⁶⁸ Además, también se han identificado mecanismos inmunológicos y microbiológicos que afectan directamente a la eficacia de los tratamientos en el manejo de enfermedades oncológicas y cardiovasculares, o bien que influyen en la supervivencia de la enfermedad injerto contra huésped.^{110,116-118}

Desde una perspectiva de la utilidad de estos conocimientos para la práctica clínica, y aplicado a la ETV, la mejor comprensión de la relación entre el microbioma, especialmente sus alteraciones en la composición, y los estados de enfermedad nos permitiría: 1) diferenciar a pacientes con esta enfermedad respecto a sujetos sanos, e incluso poder realizar diagnósticos más precoces; 2) predecir la evolución de la enfermedad, esto es su pronóstico, mediante biomarcadores derivados del microbioma con utilidad pronóstica; 3) obtener nuevas formas de tratamiento, e incluso de prevención, mediante la correcta intervención exógena, que permita modular el microbioma con el objetivo de restaurar un “microbioma sano” relacionado con el estado de salud. De hecho, ya se han probado distintas estrategias personalizadas de intervención sobre el microbioma humano para el manejo de distintas enfermedades; así, se modifica la microbiota de determinadas localizaciones de forma intencionada, mediante dietas, antibióticos, trasplante de microbiota, pero sobre todo la suplementación microbiana con probióticos;¹¹⁹⁻¹²¹ con ello, se busca inclinar el equilibrio

microbiano desde un estado relacionado con la enfermedad hacia un estado relacionado con salud.⁹⁹

1.5.1. Importancia de los metabolitos derivados del microbioma en su evaluación funcional

En cualquier caso, parece que los tipos de especies microbianas no son tan determinantes en el estado de salud, y que esta radica principalmente en la correcta funcionalidad del microbioma. El microbioma debe ser considerado prácticamente como un órgano endocrino, con capacidad para interactuar con moléculas de señalización circulantes dentro del huésped. El microbioma se encarga de la producción de cientos de moléculas con efectos biológicos a distintos niveles y actuando en distintas vías patogénicas, como ha sido demostrado en modelos tanto animales como humanos.¹²²

Por lo tanto, diferencias en la composición microbiana, pero sobre todo de su función, se han vinculado a estados de salud (i.e., eubiosis) y de enfermedad (i.e., disbiosis) en distintos órganos y tejidos.^{3,62,110} Por este motivo, además de la composición taxonómica, resulta de utilidad la evaluación de determinados metabolitos de producción exclusivamente bacteriana que informen sobre su impacto metabólico en el ecosistema.^{122,123}

El microbioma intestinal sano se encarga de procesar y digerir ácidos grasos de cadena corta (AGCC) mediante la fermentación de los carbohidratos y las proteínas que escapan a la absorción intestinal durante la digestión.¹¹⁰ Estos AGCC sí se pueden absorber con más facilidad en el intestino distal.^{124,125} Los AGCC comprenden a ácidos grasos volátiles con cadenas menores de 7 carbonos, que incluyen, entre otras a los siguientes metabolitos: ácido acético, ácido propiónico, ácido isobutírico, ácido butírico, ácido valérico y ácido isovalérico.

Estos son algunos de los principales metabolitos derivados del microbioma, que van a tener un papel más allá de la función energética. Estos AGCC actúan como

moléculas señalizadoras e inmunomoduladoras.⁶⁸ Así, los AGCC se encargan de señalar vías patogénicas mediante su unión a receptores acoplados a la proteína G (GPR), como los receptores GPR41 y GPR43, que se expresan en tejido adiposo, en intestino y en las células inmunes.^{126,127} Los GPR43 son fundamentales para el reclutamiento de los neutrófilos, y la interacción entre AGCC y GPR43 es determinante en la regulación de la respuesta inflamatoria.¹²⁸ De hecho, la ausencia de receptores GPR43 se asocia a una mayor producción de mediadores inflamatorios y, similarmente, los AGCC disminuyen la producción de citocinas inflamatorias mediante la inhibición del factor nuclear kappa B.^{129,130}

Además de los AGCC, entre las moléculas producidas por el microbioma se incluyen también, entre otras, la N-óxido de trimetilamina (TMAO), ácidos biliares, el péptido YY y el glucagón-like péptido 1 (GLP-1).¹²¹

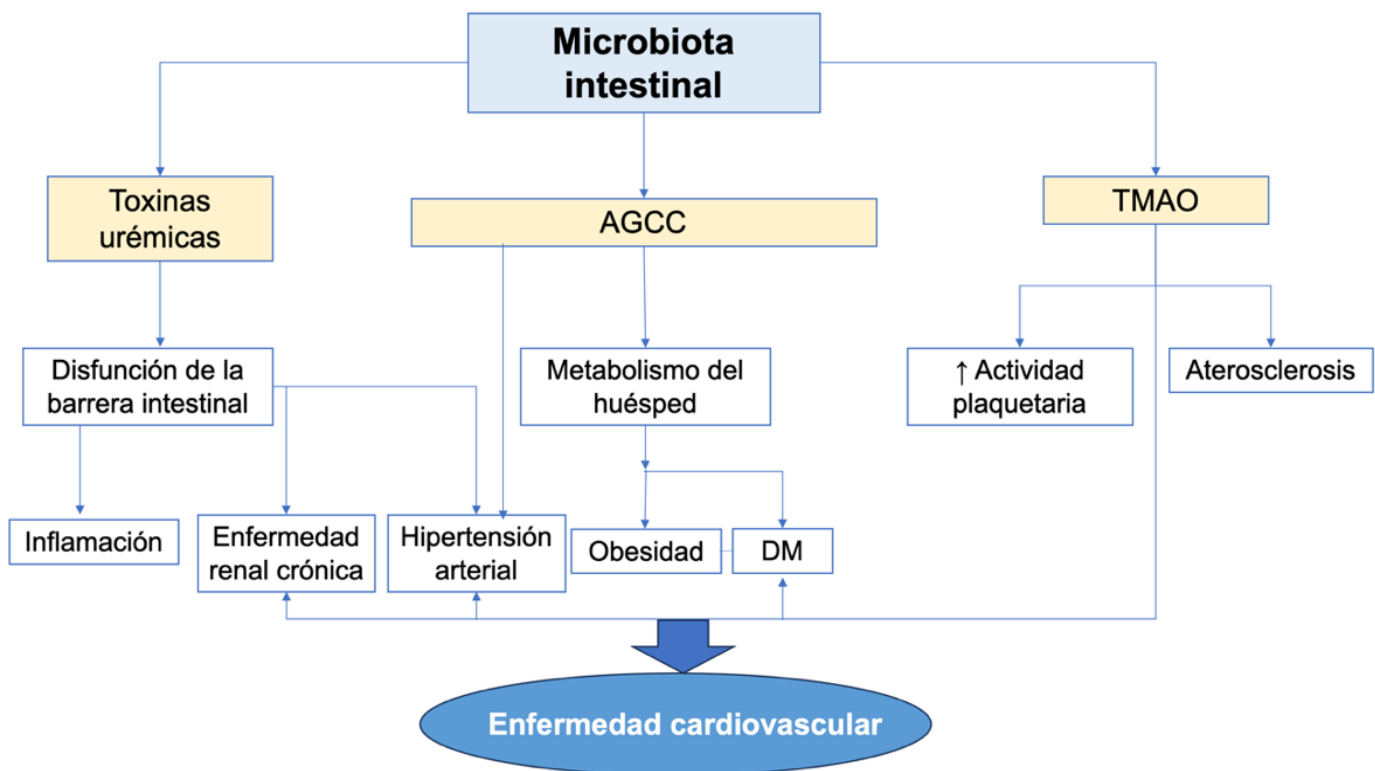
Estos metabolitos derivados del microbioma intestinal han emergido en los últimos años como elementos clave en la modulación de la inflamación y de otras funciones críticas del organismo, por lo que son dianas prometedoras para el estudio de distintas enfermedades.^{112,113} Así, cuando el microbioma se ve alterado, se produce una disbiosis intestinal con el crecimiento excesivo de ciertas bacterias que pueden dar lugar a alteraciones en la producción de estos metabolitos derivados del microbioma, destacando la sobreproducción de TMAO a partir del metabolismo de fosfatidilcolina, colina y carnitina.¹³¹

1.5.2. Microbioma humano en la enfermedad cardiovascular

Las enfermedades cardiovasculares constituyen en la actualidad la primera causa de morbilidad y mortalidad en los países desarrollados.¹³² El microbioma interactúa con el huésped a través de diversos mecanismos, incluido el sistema cardiovascular. En los últimos años, se han publicado varios trabajos que han aportado información relevante sobre el papel del microbioma, fundamentalmente de la microbiota intestinal, en la aparición y desarrollo de distintos trastornos metabólicos y enfermedades cardiovasculares.¹⁰⁷⁻¹⁰⁹ Además, distintas

enfermedades con riesgo de trombosis se han asociado con disbiosis.⁶⁸ Consecuentemente, se ha generado un enorme interés científico en conocer mejor las conexiones entre el intestino y el corazón (**figura 5**).¹⁰² En este sentido, los metabolitos derivados del microbioma intestinal han emergido como elementos clave en la modulación de la inflamación, relacionándose con distintos factores de riesgo implicados en la génesis de eventos cardiovasculares.^{112,113}

Figura 5: Esquema de los efectos de la microbiota intestinal y su microbioma en los factores de riesgo cardiovascular y el desarrollo de eventos cardiovasculares.

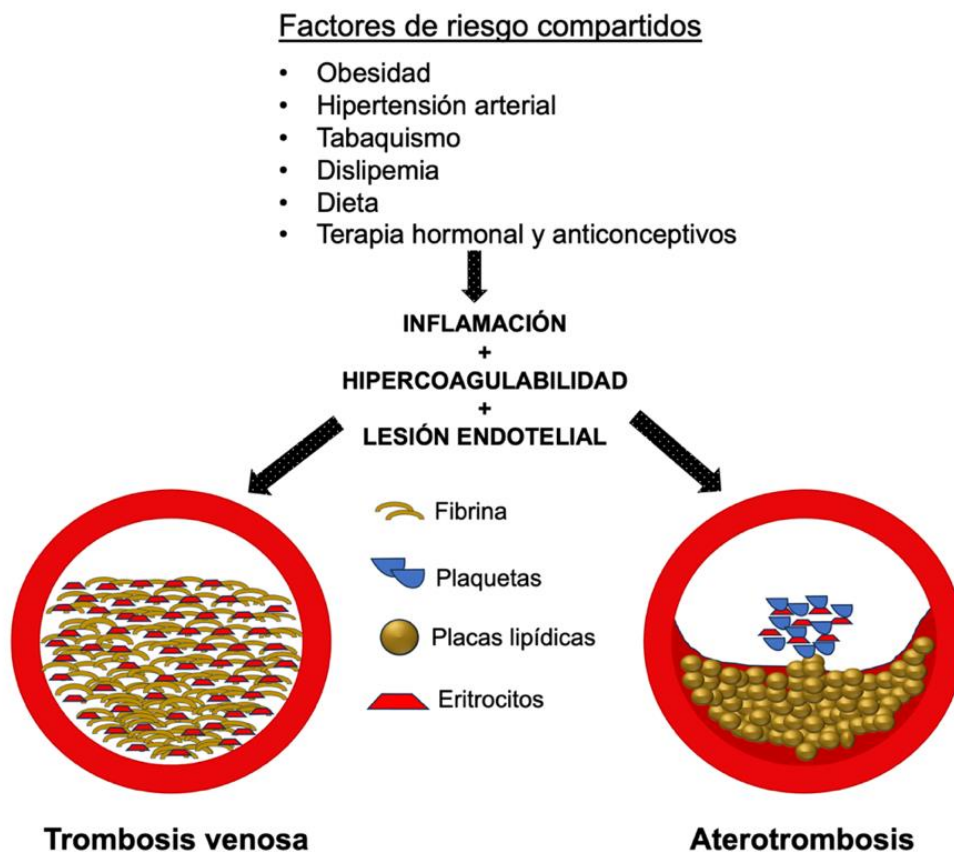


Abreviaturas: AGCC, ácidos grasos de cadena corta; DM, diabetes mellitus; TMAO, N-óxido de trimetilamina.

También ha sido ampliamente estudiado cómo influye el componente microbiológico (y, por lo tanto, del microbioma) en otros factores de riesgo cardiovasculares, como sucede en la obesidad o en el desarrollo de la diabetes tipo 2.^{115,133} La disbiosis se ha relacionado con enfermedades metabólicas, que son factores de riesgo para el desarrollo de trombosis arterial y venosa (**figura**

6).¹³¹ En un trabajo de casos-controles se identificó una asociación entre la mayor presencia de determinados microbios y el riesgo de enfermedad cardiovascular a lo largo de la vida.¹³⁴ Además, la obesidad, uno de los factores de riesgo de trombosis más reconocidos, se ha relacionado con alteraciones en el microbioma.¹³⁵ El succinato, un metabolito producido por el microbioma intestinal, se encuentra elevado en pacientes obesos y se ha demostrado su rol en la inflamación crónica y en distintas enfermedades cardiovasculares.¹³⁶ En la misma línea, modelos animales han demostrado que el trasplante fecal de microbiota de animales obesos a animales libres de gérmenes induce una ganancia de peso.¹¹⁵

Figura 6: Fisiopatología común de la trombosis venosa y arterial.



La hipertensión arterial, que es el principal factor de riesgo cardiovascular, y está influida tanto por factores genéticos como medioambientales, se ha asociado con determinados perfiles disbióticos del microbioma.¹³⁷ Son varias las publicaciones recientes que apoyan el papel del microbioma humano en la modulación de la presión arterial sistémica, mediado por diferentes vías patogénicas,

relacionándose con el desarrollo de la hipertensión arterial.¹¹⁶ Entre estos mecanismos patogénicos se incluyen modificaciones en la expresión genética inducida por el microbioma en el huésped, la activación de vías de señalización a través de receptores GPR, la activación directa de células inmunes, y la inflamación sistémica asociada al daño de la barrera epitelial intestinal, ocasionado por la disbiosis intestinal.¹³⁸ Estas alteraciones activan mecanismos tradicionalmente asociados a la regulación de la presión arterial, como son el sistema renina-angiotensina-aldosterona, el sistema nervioso autónomo y el sistema inmunológico.

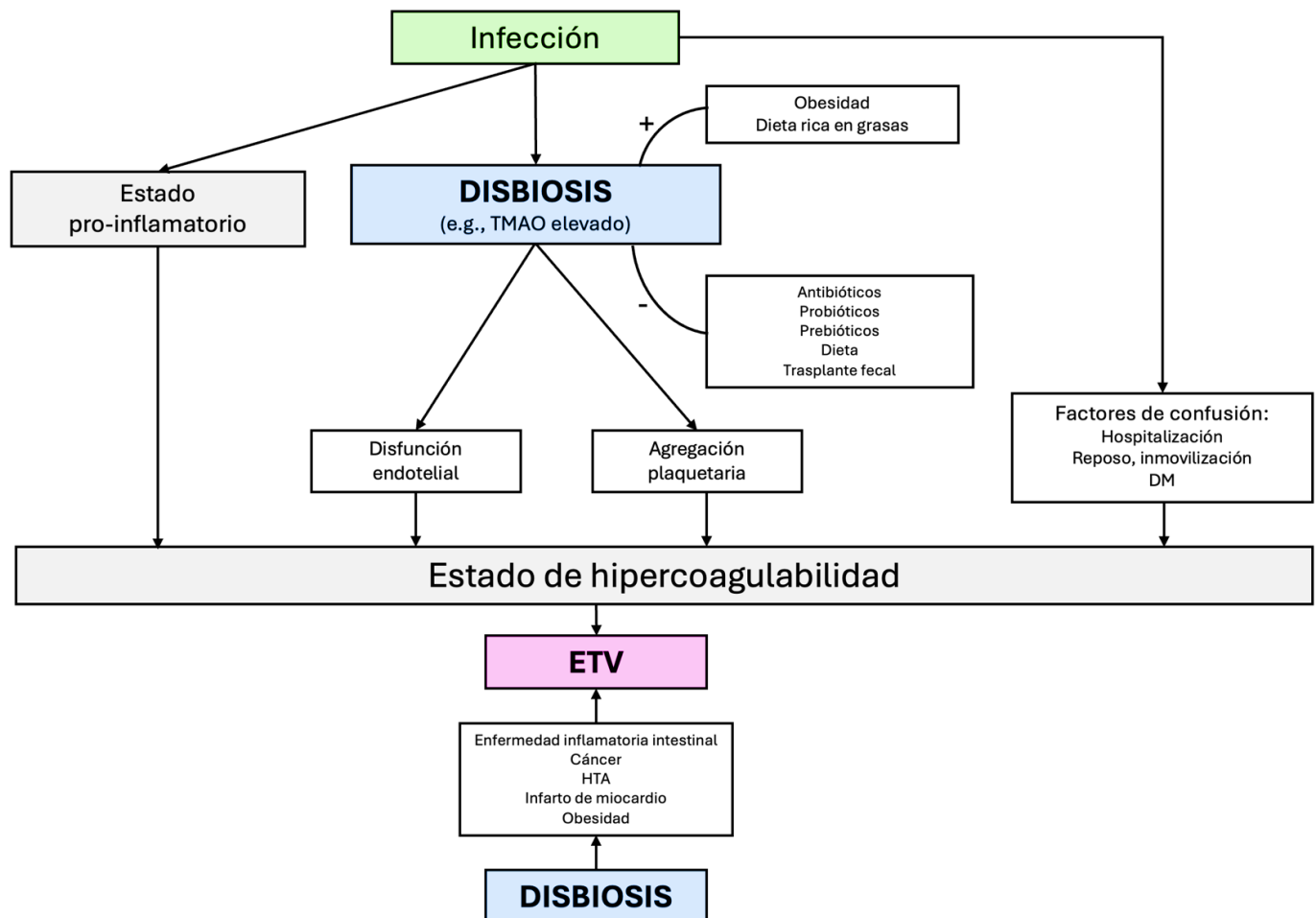
La TMAO, derivado del metabolismo de la fosfatidilcolina y la L-carnitina, es el biomarcador derivado del microbioma que más frecuentemente ha sido relacionado con la enfermedad cardiovascular.^{139,140} Valores más elevados de TMAO incrementan el riesgo de eventos cardiovasculares, fundamentalmente por un aumento del riesgo de desarrollo de infartos de miocardio e infartos cerebrales.¹⁰²

Estudios *in vitro* han observado el papel de la TMAO en la actividad plaquetaria; más concretamente, la TMAO parece modular la movilización plaquetaria dependiente de calcio, lo que incrementa la respuesta plaquetaria y la activación de monocitos y macrófagos; estos resultados apoyan y hacen plausible el potencial impacto de la TMAO en la fisiopatología de la trombosis arterial y de la aterosclerosis.^{141,142} Consecuentemente, valores más elevados de este metabolito derivado del microbioma podrían predisponer a un mayor riesgo de eventos cardiovasculares y, consecuentemente, a una mayor mortalidad.¹⁴³

Algunos trabajos han evidenciado cómo los AGCC modulan la presión arterial sistémica a nivel renal mediante la secreción de renina.¹⁴⁴ Además del papel de los metabolitos derivados del microbioma, en algunos trabajos se ha reportado que es la propia disbiosis microbiana la que se relaciona con la aparición de hipertensión arterial.^{145,146} Por último, se ha evaluado el papel de la inflamación crónica en la relación de la hipertensión arterial con el desequilibrio del microbioma intestinal; se ha observado que esta relación podría estar mediada por una neuro-

inflamación, un incremento en la actividad simpática y trastornos en el sistema inmunológico (también mediado por los AGCC), entre otros.¹⁴⁷⁻¹⁴⁹

Figura 7: Hipótesis fisiopatológica de las potenciales relaciones entre la disbiosis y un estado de hipercoagulabilidad:



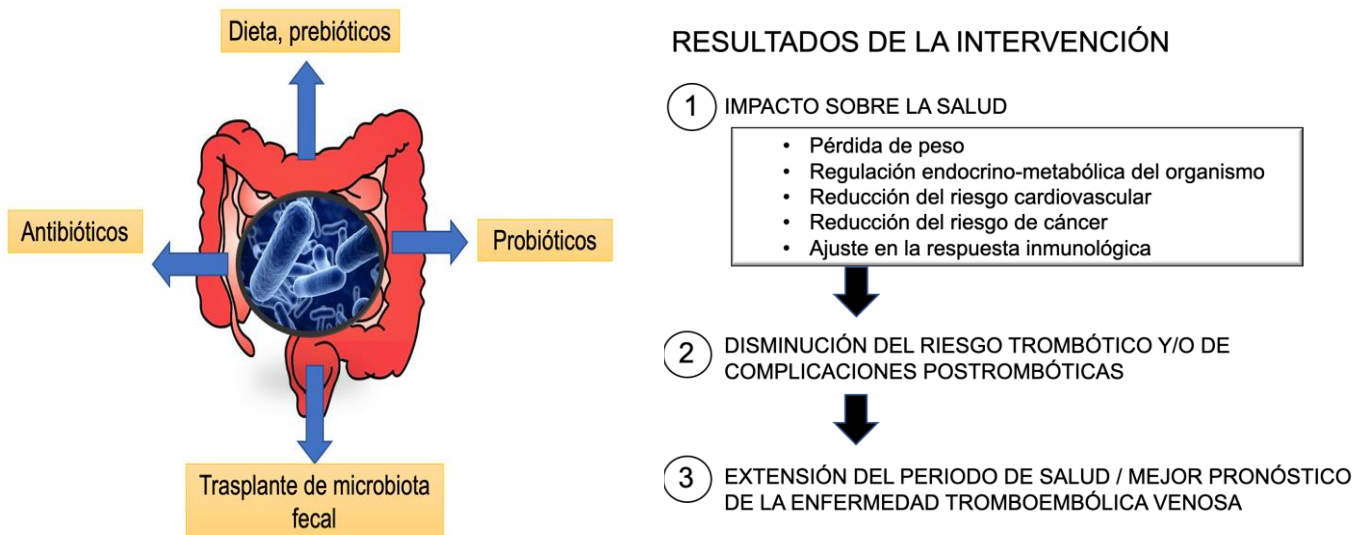
Abreviaturas: DM, diabetes mellitus; ETV, enfermedad tromboembólica venosa; HTA, hipertensión arterial; TMAO, N-óxido de trimetilamina.

La TMAO incrementa sus niveles plasmáticos a las 4-8 horas de la ingesta de alimentos con fosfatidilcolina o L-carnitina, por lo que los vegetarianos y los veganos (ambos con dietas libres de L-carnitina) producen menos TMAO en comparación con sujetos omnívoros, representando una nueva demostración de la importancia de la nutrición en la susceptibilidad a las enfermedades cardiovasculares.¹¹² Así, se ha demostrado el impacto exógeno sobre este mecanismo de la TMAO en distintos modelos animales, incluyendo dietas, antibióticos e incluso fármacos inhibidores de la TMAO.^{141,150-152} Generalmente, los tratamientos antibióticos reducen los niveles de TMAO.^{139,143}

A pesar de los numerosos trabajos existentes que apoyarían la existencia de relaciones entre el microbioma y distintas enfermedades cardiovasculares, sobre todo con la hipertensión arterial, la cardiopatía isquémica y los eventos cerebrovasculares, apenas existen estudios que relacionen al microbioma con el desarrollo y/o el pronóstico de la TEP, si bien esta potencial relación etiopatogénica es plausible biológicamente (**figura 7**).

Aunque aún no se comprendan completamente los mecanismos que explican la mayor incidencia de eventos cardiovasculares trombóticos relacionados con la TMAO, los estudios observacionales publicados sustentarían que esta sea una potencial diana terapéutica, atenuando el riesgo trombótico sin suponer un mayor riesgo de complicaciones hemorrágicas y, por lo tanto, aplicable para optimizar el manejo de la ETV.⁶⁸ Por lo tanto, el estudio de la relación entre el microbioma y la TEP nos podría permitir descubrir nuevos factores microbianos relacionados con el microbioma que pueden actuar como dianas diagnósticas y terapéuticas de la TEP (**figura 8**).

Figura 8: Estrategias de intervención sobre el microbioma y potencial impacto en la salud humana dirigida a la enfermedad tromboembólica venosa:



1.6. Justificación del estudio:

El manejo terapéutico de la TEP está fundamentalmente sustentado en la anticoagulación, desde que en 1960 Barritt *et al.* demostraron la eficacia de la heparina sódica y los antivitaminas K en un ensayo clínico controlado con placebo realizado en 73 pacientes con TEP; los autores observaron una reducción significativa, tanto de las muertes por la TEP como de las recurrencias trombóticas, en el grupo de pacientes tratados con anticoagulación.¹⁵³ Además, varias décadas antes, se habían reportado las primeras series de casos de humanos que habían recibido heparinas, publicadas por Murray y Best en 1936, a la sazón ya con resultados favorables tanto en profilaxis antitrombótica como en tratamiento de la TEP. Actualmente, cerca de un siglo después de estos hitos, la anticoagulación sigue siendo considerada la terapia de elección en la mayoría de los pacientes que sufren una embolia de pulmón con estabilidad hemodinámica y

que no presentan una contraindicación absoluta para el tratamiento anticoagulante.^{9,31,154,155}

En la compleja etiopatogenia de la TEP participan distintos factores de riesgo, genéticos y adquiridos, si bien en ocasiones no se llega a identificar ningún factor de riesgo subyacente.¹⁵⁶⁻¹⁵⁸ Así pues, resulta crítico identificar nuevos factores de riesgo modificables que nos permitan mejorar la prevención, tanto primaria como secundaria, de la enfermedad.^{36,159-161} Además, cada vez disponemos de más evidencia sobre la complejidad de la fisiopatología de la TEP aguda, que va más allá de la propia formación de los coágulos.^{1,12,16,49,73} Este mayor conocimiento está permitiendo ampliar las dianas farmacológicas (y no farmacológicas) en aras de la optimización del manejo de esta enfermedad. De hecho, actualmente se investiga sobre el impacto de otras terapias adicionales y complementarias, como son los antiinflamatorios no esteroideos, las estatinas, el oxígeno suplementario e incluso la presión positiva continua sobre la vía aérea (CPAP) en pacientes con apnea obstructiva del sueño concomitante. Queda por aclarar el potencial efecto beneficioso de estas intervenciones complementarias en distintas variables de resultados de eventos adversos cardiovasculares, así como en la prevención primaria y secundaria de la ETV.^{74,76,162-169}

De forma similar, en las últimas décadas se ha investigado y aumentado el conocimiento sobre el papel que juegan los distintos factores de riesgo etiológicos asociados al desarrollo de la propia TEP, y más concretamente sobre el relevante rol que juegan la inflamación y las infecciones, tanto clínicas como subclínicas, en el riesgo incrementado de presentar episodios tromboembólicos venosos; esto se ha explicado por su potencial actuación sobre los mecanismos etiopatogénicos clásicos de la tríada de Virchow (**figura 1**): la hipercoagulabilidad, la estasis venosa y, sobre todo, la disfunción endotelial.^{42,46,170,171}

Cada vez disponemos de más evidencia sobre el rol de la inflamación como mecanismo trombogénico y factor de riesgo en la TEP.¹⁷²⁻¹⁷⁴ Así, la TEP aguda se ha asociado con procesos inflamatorios sistémicos y con distintas alteraciones metabólicas.^{175,176} La inflamación produce una activación de las células endoteliales, de las plaquetas y de los leucocitos, lo que favorece el inicio de la

cascada de la coagulación. De hecho, los leucocitos activados son una fuente fundamental de liberación de moléculas procoagulantes, que puede estimular la formación de coágulos; así sucede con los NETs, que están compuestas de ADN, histonas y proteínas antimicrobianas, con capacidad para promover la trombosis.¹⁷⁷ Además, algunos trabajos apoyan que la inflamación, local y sistémica, asociada a un proceso infeccioso tiene también un papel determinante en el pronóstico de los pacientes con una TEP aguda.^{42,46,73-75,170,171,178} El microbioma podría influir en la salud del endotelio vascular, que es esencial para una correcta funcionalidad del sistema cardiovascular.

Al hilo de lo anterior, el mayor conocimiento del microbioma humano y la interacción entre los microbios y el huésped ha evidenciado la importancia crítica que tiene su adecuado equilibrio (o eubiosis) en el correcto funcionamiento del organismo y, consecuentemente, en el desarrollo de patologías que van más allá de las enfermedades puramente infecciosas.^{3,103,104,110} La disbiosis, es decir, un desequilibrio en la composición de las bacterias (e.g., intestinales o microbiota intestinal), contribuye a la inflamación crónica en el organismo, favoreciendo un aumento de la permeabilidad intestinal, permitiendo que el lipopolisacárido derivado del microbioma, una endotoxina bacteriana, ingrese a la circulación sanguínea, desencadenando respuestas inflamatorias.¹³¹ Además, estos lipopolisacáridos bacterianos intestinales pueden unirse a los TLRs y activar la cascada de la coagulación.⁶⁸ Esta interacción sería bidireccional, ya que el propio estado inflamatorio se asocia tanto con el desarrollo de disbiosis, como con un aumento de la permeabilidad intestinal y la producción de distintos metabolitos específicos.¹⁰⁰

Esta interacción entre los microbios y el huésped en cualquier situación patológica puede ayudarnos a descubrir posibles etiologías y vías patogénicas de la enfermedad. Distintos trabajos han reportado el relevante papel específico del microbioma intestinal en distintas entidades con sustrato inflamatorio (e.g., obesidad, enfermedad inflamatoria intestinal y distintas enfermedades autoinmunes). Consecuentemente, se ha planteado el interés en lograr modular este microbioma como una opción terapéutica.¹⁷⁹⁻¹⁸¹ Más allá de las enfermedades más característicamente inflamatorias, la inflamación se ha

relacionado también con distintas enfermedades cardiovasculares, como son la aterosclerosis, la hipertensión arterial y la cardiopatía isquémica.^{108,110} En esta misma línea, se han observado que determinados perfiles del microbioma alterados se relacionan con la presencia de determinadas enfermedades cardiovasculares.¹¹²

Este aumento progresivo en el conocimiento del microbioma humano y de su relevante rol en la génesis de distintas enfermedades cardiovasculares genera interés en cuanto a su aplicabilidad para la TEP aguda. Se plantea este interés fundamentalmente desde dos perspectivas. En primer lugar, conocer su potencial rol en la génesis de la ETV y de embolia de pulmón tendría utilidad en la prevención.⁸⁴ Así mismo, conocer su impacto en la fisiopatología de la TEP podría ser útil desde la perspectiva de optimizar el tratamiento.¹⁰⁷⁻¹⁰⁹ Consecuentemente, se plantea la hipótesis de su potencial utilidad como diana terapéutica en la TEP, mediante la modulación externa del microbioma, con objetivos tanto de prevención primaria, como de tratamiento del evento tromboembólico venoso. En cualquier caso, el papel del microbioma en la TEP apenas ha sido estudiado hasta la fecha, por lo que el presente estudio nace del interés en descifrar la variabilidad de la composición microbiana, y consecuentemente del microbioma, en los pacientes que padecen una TEP aguda.¹⁸² La mejor comprensión de la interacción entre los microbios y el huésped en cualquier situación patológica puede ayudarnos a descubrir posibles etiologías y vías patogénicas de la enfermedad. Esta relación apenas ha sido estudiada hasta la fecha en la ETV, y más concretamente en la TEP.^{84,183} Lograr descifrar las posibles variaciones interindividuales en la composición polimicrobiana específica, y del microbioma, durante el inicio de la TEP podría abrir un nuevo campo de investigación en el desarrollo de la medicina personalizada en la ETV dirigido por el microbioma.

Respecto a la plausibilidad biológica, en este trabajo de investigación nos planteamos que los pacientes con una TEP aguda podrían presentar diferencias en el microbioma respecto a los individuos sanos, como ya se conoce que sucede en otras enfermedades cardiovasculares.^{109,112,113} Además, estas diferencias podrían existir también entre pacientes con TEP dependiendo de la presencia o

no de determinados factores de riesgo trombóticos externos, e incluso ser predictores de una peor evolución.

En el análisis del microbioma, más allá de la composición taxonómica de la microbiota de un órgano concreto, es necesario descifrar el impacto metabólico del ecosistema. El microbioma puede producir metabolitos, que son moléculas pequeñas que tienen efectos en el cuerpo. Por ello, resulta pertinente la evaluación de los metabolitos finales, de producción exclusivamente bacteriana (e.g., TMAO, AGCC), dado que éstos son capaces de ejercer funciones remotas.^{122,123} Algunos de estos metabolitos podrían tener efectos beneficiosos o perjudiciales en el sistema cardiovascular.

Por otro lado, no es habitual la obtención de muestras orgánicas no sanguíneas para estudio microbiológico, como son las heces y muestras respiratorias, en los pacientes con una TEP aguda. Por el contrario, sí se considera práctica habitual de manejo de la TEP aguda la obtención de muestras de sangre venosa periférica, ya que aportan información de utilidad para su manejo. Por lo tanto, el análisis de los principales metabolitos bacterianos que circulan por la sangre periférica supone una aproximación muy práctica para evaluar las características del microbioma en los pacientes diagnosticados de una embolia de pulmón.

Por todo lo anterior, este estudio de evaluación del microbioma en la tromboembolia pulmonar aguda (estudio MICTEP) supone el primer acercamiento a las potenciales interrelaciones del microbioma con la TEP constituyendo el inicio de una nueva y estratégica línea de investigación del grupo de investigación del Proyecto de Investigación Integrado (PII) de Circulación Vascular Pulmonar de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR), en el abordaje del mejor conocimiento de la TEP; El estudio MICTEP se propone así como punto de partida y generador de nuevas hipótesis que permitan orientar y dirigir los objetivos de futuras investigaciones sobre el papel del microbioma en la TEP aguda para el grupo de trabajo.

1.7. ¿Cuál es nuestra *hipótesis de trabajo*?

Se considera plausible biológicamente que los pacientes que sufren una TEP aguda pueden presentar una alteración en la composición del microbioma (disbiosis), que podría actuar como mecanismo causal en el desarrollo del evento tromboembólico venoso, si bien también podría ser consecuencia del episodio de trombosis.

Por lo tanto, nuestra hipótesis es que el microbioma de sujetos sanos será diferente al de pacientes recién diagnosticados de una TEP. Además, en comparación con los pacientes que presentan una TEP provocada por un factor de riesgo identificado, los pacientes que presentan una TEP sin factores de riesgo identificados, los antes llamados no provocados o idiopáticos, presentarán un perfil del microbioma diferente, que explicaría el desarrollo del evento tromboembólico venoso a pesar del carácter “idiopático”. Por último, determinadas alteraciones del microbioma podrían ser predictores pronósticos.

La posible influencia del microbioma en el proceso tromboembólico puede estar en relación con los metabolitos bacterianos que son secretados en los diferentes ecosistemas del cuerpo humano, que pueden ser absorbidos y circular en sangre periférica. Así pues, nos proponemos encontrar estos hallazgos en los metabolitos derivados del microbioma obtenidos de muestras sanguíneas.

OBJETIVOS:

2. OBJETIVOS DEL ESTUDIO:

Objetivo principal:

- Comparar el perfil diferenciador del microbioma en pacientes diagnosticados de una TEP aguda con respecto a controles sanos.

Objetivos secundarios:

- 1. Identificar perfiles del microbioma según factores de riesgo para TEP.
- 2. Analizar los biomarcadores de inflamación en sujetos sanos y pacientes con TEP.
- 3. Analizar los biomarcadores de coagulación en sujetos sanos y pacientes con TEP.
- 4. Correlación e integración de los metabolitos derivados del microbioma con los parámetros inflamatorios y de la coagulación.

MATERIAL Y MÉTODOS:

3. MATERIAL Y MÉTODOS:

3.1. Diseño del estudio

Estudio observacional y multicéntrico de pacientes con tromboembolia aguda de pulmón incluidos prospectivamente en el registro RIETE y que donaron muestras sanguíneas a los Biobancos de sus respectivos hospitales durante el episodio agudo de la TEP.

Todos los pacientes incluidos proceden del proyecto de investigación OSIRIS, que es un estudio longitudinal en el que participaron 18 centros para la investigación de la incidencia y de los factores predictivos de HPTEC en pacientes diagnosticados de TEP incidental sintomática o asintomática, y que fueron incluidos en el registro RIETE.

El proyecto tiene la aceptación de los respectivos Comités de Ética de Investigación (CEI) de los hospitales participantes y todos los pacientes firmaron el consentimiento informado para participar en el estudio OSIRIS, así como para contribuir a la colección de las muestras sanguíneas en el biobanco, dando permiso para utilizar las muestras excedentes en la línea de investigación de TEP, con aplicación para el estudio MICTEP. Los pacientes incluidos en el estudio no precisaron de ninguna intervención añadida.

Adicionalmente, se dispone de una cohorte de sujetos sanos, sin historia previa de TEP y/o TVP, que se ha empleado como grupo control comparador. El grupo control fue recogido prospectivamente en la Unidad de Donación de Sangre del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid.

3.2. Población del estudio:

Pacientes con diagnóstico de TEP aguda que han donado muestras de sangre a los biobancos de sus respectivos hospitales. Los pacientes incluidos han sido recogidos en dos centros nacionales: Hospital Universitario Virgen del Rocío (Sevilla) y Hospital Universitario de Txagorritxu (Vitoria).

- Población de muestreo:

a) Pacientes con TEP:

- Criterios de inclusión:
 - 1) Diagnóstico de TEP agudo sintomática o asintomático, confirmado mediante métodos objetivos, ya sea por TC helicoidal torácica con contraste intravenoso y/o gammagrafía de ventilación/perfusión.^{184,185}
 - 2) Inclusión en el registro RIETE, que es la base de datos del estudio.
 - 3) Documento de *“Hoja de información y consentimiento para la utilización de datos clínicos y material biológico para conservación en un Biobanco”* firmado.
- Criterios de exclusión:
 - 1) Menores de 18 años.
 - 2) Ausencia de datos de seguimiento a los 3 meses, a excepción de los pacientes que hayan fallecido con anterioridad.
 - 3) Ausencia de muestra sanguínea para el Biobanco en la fase aguda de la TEP.
 - 4) Disposición de muestra insuficiente para la realización del análisis microbiológico.
 - 5) Pacientes con TVP sin TEP confirmada mediante prueba de imagen.
 - 6) Participación en un ensayo clínico terapéutico con una terapia ciega.

b) Sujetos sanos sin ETV (Grupo Control):

- Criterios de inclusión:

- 1) Documento de *“Hoja de información y consentimiento para la utilización de datos clínicos y material biológico para conservación en un Biobanco”* firmado.
- 2) Mayores de 40 años sin patologías infecciosas conocidas.
 - Criterios de exclusión:
 - 1) Sospecha y/o diagnóstico de TEP y/o TVP en el momento de su inclusión.
 - 2) Imposibilidad para obtener el consentimiento informado.
 - 3) Esperanza de vida inferior a 3 meses.
 - 4) Diagnóstico o antecedentes familiares de otras enfermedades cardiovasculares o autoinmunes relevantes tales como cardiopatías, hipertensión, trombofilia hereditaria o adquirida o lupus eritematoso sistémico o que requieran el uso de anticoagulantes.

3.3. Variables del estudio

Las características iniciales en el momento del diagnóstico de TEP incluyeron datos demográficos, comorbilidades coexistentes o subyacentes, trastornos médicos y terapias, factores de riesgo adicionales para ETV y la forma de presentación inicial de la TEP. También se registraron el tipo, la dosis y la duración del tratamiento anticoagulante tras el diagnóstico de TEP y los resultados durante el curso del tratamiento anticoagulante:

3.3.1. Datos demográficos/antropométricos: edad, sexo, peso, talla e índice de masa corporal.

3.3.2. Constantes vitales al diagnóstico: tensión arterial sistólica (TAS), frecuencia cardíaca y frecuencia respiratoria.

3.3.3. Comorbilidades: historia de tabaquismo, enfermedad pulmonar crónica, insuficiencia cardíaca, factores de riesgo para ETV identificados (i.e., historia previa de ETV, cirugía reciente, inmovilización reciente por causa médica, viaje largo reciente y cáncer, entre otros).

3.3.4. Síntomas de presentación: disnea, dolor torácico, síncope, síntomas de TVP.

3.3.5. Datos de imagen al diagnóstico: en la TAC (localización de las arterias pulmonares afectadas en la TEP en los pacientes diagnosticados mediante angiotomografía), en la ecografía doppler de miembros inferiores (presencia de TVP en miembros inferiores) y en la ecocardiografía transtorácica (con intención diagnóstica y/o pronóstica).^{9,184,186,187}

3.3.6. Parámetros analíticos de rutina y fácil acceso en el momento del diagnóstico del TEP (e.g., creatinina, hemoglobina, péptido natriurético cerebral tipo B [proBNP], etc).

3.3.7. Metabolitos derivados del microbioma: TMAO, acético, propiónico, butírico, isobutírico, valérico e isovalérico.

3.3.8. Marcadores de inflamación: IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-17A, ligando 10 de quimiocina con motivo C-X-C (CXCL10), interferón gamma (IFN- γ), proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1).

3.3.9. Marcadores de la coagulación: p-selectina, dímero D, ligando-1 de glicoproteína p-selectina (PSGL-1), activador tisular del plasminógeno (tPA), ligando CD40 soluble plaquetario (sCD40L), inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) y factor IX.

3.3.10. Tratamiento anticoagulante: tipo de terapia anticoagulante, dosis y duración.

3.3.11. Variables de resultados: mortalidad por todas las causas, recurrencia tromboembólica y hemorragias.

3.4. Definiciones

Se consideró la TEP como provocada cuando había alguno de los siguientes factores de riesgo de ETV: inmovilización reciente, cirugía reciente, cáncer activo, toma de fármacos estrogénicos, embarazo, postparto o viaje de larga duración. Por el contrario, se consideró la TEP no provocada (o idiopática) en ausencia de cáncer activo, inmovilización reciente, cirugía, uso de estrógenos, embarazo, postparto o viajes de larga duración.¹⁸⁸⁻¹⁹²

Los pacientes inmovilizados se definieron como pacientes no quirúrgicos que habían precisado recientemente reposo en cama, con o sin privilegios para ir al baño, durante al menos 4 días en el período de 2 meses anterior al diagnóstico de la TEP. Los pacientes quirúrgicos se definieron como aquellos que se habían sometido a una cirugía mayor (e.g., cirugía ortopédica) en los 2 meses previos al diagnóstico de la TEP. El cáncer activo se definió como cáncer diagnosticado recientemente o cuando estaba recibiendo tratamiento antineoplásico de cualquier tipo (es decir, cirugía, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, terapia soporte o terapias combinadas de éstas).

Se definió como sangrado reciente a los pacientes que habían sufrido una hemorragia grave en los 30 días previos al diagnóstico de la TEP. La hemorragia grave se definió de acuerdo con las guías internacionales, como el que ocurre en un sitio crítico (retroperitoneal, espinal o intracraneal), el sangrado que requiere transfusión de al menos dos unidades de sangre o el sangrado fatal.

La extensión y la carga trombótica de la TEP fue definida de acuerdo con los territorios de la arteria pulmonar afectados: se definió como TEP proximal, cuando los defectos de repleción se encontraban en la/s arteria/s pulmonar/es central/es, principal/es y/o lobar/es, indistintamente de si se observaba afectación simultánea de arterias pulmonares más periféricas; por el contrario, se definió como TEP periférica, cuando estos defectos de repleción se identificaron en localización de ramas arteriales segmentarias y/o subsegmentarias, sin afectación de arterias pulmonares más proximales.

La mortalidad por todas las causas se definió como la muerte por cualquier causa después del diagnóstico de TEP. La TVP recurrente, en pacientes con sospecha clínica, se definió como un nuevo segmento de vena no comprimible o un aumento del diámetro de la vena en al menos 4 mm en comparación con la última medición disponible en la ecografía venosa. La TEP recurrente se definió como la aparición de discordancias ventilación-perfusión en la gammagrafía pulmonar o un nuevo defecto de llenado intraluminal en la TAC helicoidal del tórax.

3.5. Recogida de datos

3.5.1. Registro RIETE

En el caso de los pacientes con TEP, todos los datos clínicos basales (e.g., edad, sexo, factores de riesgo, etc), las pruebas de imagen y los datos de laboratorio básicos al diagnóstico, y los datos durante el seguimiento se obtuvieron de la base de datos del registro RIETE, recogidos en un cuaderno electrónico de recogida de datos (CRDe). El registro RIETE es actualmente el mayor registro en marcha, observacional, multicéntrico e internacional de pacientes con ETV confirmada.^{193,194} RIETE se creó inicialmente en el año 2001 en España, con el objetivo de aprender la historia natural de la ETV, especialmente en pacientes con condiciones especiales, que normalmente son excluidos de los ensayos clínicos, para así aprender a prevenir y tratar mejor esta enfermedad de forma más efectiva (*ClinicalTrials.gov identifier: N¹¹³2832245*).¹⁹⁵ Actualmente, el registro RIETE es el principal registro observacional, multicéntrico e internacional de pacientes consecutivos con ETV aguda objetivamente confirmada, y ha contribuido enormemente al conocimiento científico de la ETV, incluida la TEP, con numerosas publicaciones sobre la epidemiología, los patrones terapéuticos y el pronóstico de los pacientes.¹⁹³

3.5.2. Extracción y conservación de las muestras de sangre

Por protocolo, se realizó la extracción de sangre mediante venopunción antecubital con mínima compresión, con una aguja de calibre 21. Para la realización del estudio, se extrajeron dos muestras de citrato, dos muestras de suero y un tubo para conservación de ARN (ácido ribonucleico) (*Paxgene Blood RNA kit*) y otro para conservación de ADN (ácido desoxirribonucleico) (*Paxgene Blood DNA*). Las muestras fueron procesadas entre 1 y 2 horas después de su extracción. Posteriormente, se sometieron a centrifugación seriada de 15 minutos a 2500 G, durante 15 minutos a 20°C. El sobrenadante se distribuyó en alícuotas de 250 µL. Todas las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su análisis.

En los pacientes con TEP aguda, la extracción de sangre se realizó durante el ingreso durante los 10 primeros días del diagnóstico ($2,25 \pm 2,18$ días desde el diagnóstico de la TEP).

3.5.3. Recogida de datos del grupo control

A los participantes en el reclutamiento del grupo control, se les recogió sangre fresca en tubos con citrato (BD Vacutainer®) de 4,5 mL. El procesamiento de la muestra se produjo dentro de primera hora desde la recolección. Las muestras se centrifugaron a 2500 g durante 15 minutos a 20°C. Luego se aisló el sobrenadante y se sometió a una nueva centrifugación durante 15 minutos a 2500 g y 20°C. El sobrenadante de plasma resultante se alicuotó en tubos de propileno y se congeló a -80°C hasta su utilización para la cuantificación de TMAO, AGCC, citocinas y otros marcadores inflamatorios y de la coagulación. Además, se recogieron datos clínicos básicos (edad, sexo, talla y peso).

3.5.4. Análisis del microbioma y otras determinaciones complementarias

Los distintos análisis complementarios se realizaron de forma centralizada a partir de las muestras de sangre obtenidas tanto de los pacientes con TEP durante la fase aguda, como de los controles sanos.

Inicialmente, se programó un análisis exploratorio preliminar de determinación del ADN circulante de gérmenes en las muestras de suero de los pacientes de TEP en el Hospital Universitario Ramón y Cajal (Madrid) por parte de la Dra. Rosa del Campo (Servicio de Microbiología y Parasitología) con el siguiente plan de trabajo:

- En primer lugar, determinar la presencia de ADN bacteriano en las muestras de sangre venosa mediante amplificación por PCR usando cebadores 16S ADN ribosómico (ADNr) universales de bacterias.
- En el caso de amplificación positiva, se protocolizó:
 1. Determinar la cantidad total de microorganismos mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (Q-PCR).

2. Identificar a las bacterias presentes mediante electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (EGGD) de los amplificadores 16S ADNr, posteriormente se recortarán las bandas que se observen y después se secuenciarán con la metodología de Sanger en un secuenciador *ABI Prism 3100*. En el supuesto de detectar la presencia de muchas especies de bacterias se procedería a secuenciación masiva de los amplificadores 16S ADNr mediante tecnología *MiSeq™* (Illumina).

Se realizó un análisis metabolómico completo en las muestras de sangre de todos los pacientes con TEP y los controles. Se decidió seleccionar una batería de metabolitos derivados del microbioma dirigidos al perfil relacionado con los AGCC y el TMAO, basado en la bibliografía actual, la experiencia del grupo de trabajo investigador y la recomendación y consenso de los expertos en microbioma consultados.^{110,196-198}

La caracterización del metaboloma se llevó a cabo mediante resonancia magnética nuclear (RMN), y espectrometría de masas (MS), acoplada a cromatografía de gases (GC-MS). El TMAO fue medido en suero siguiendo un protocolo ya descrito en una publicación previa,¹⁹⁹ mientras que para la determinación de los ácidos acético, butírico, isobutírico, valérico, isovalérico y propiónico se aplicó un protocolo distinto también publicado con anterioridad,²⁰⁰ utilizando la derivación de cloroformiato de alquilo automatizado en el laboratorio del Centro de Metabolómica y Bioanálisis (CEMBIO) (<https://cembio.uspceu.es/>).

3.6. Análisis estadístico

Las variables continuas se resumieron mediante la media (desviación estándar [DS]) y las variables categóricas mediante porcentajes. La comparación de medias entre dos grupos se realizó con la prueba de la *t* de Student para datos emparejados y no emparejados según la relación o no de dependencia entre las observaciones. La asociación entre variables categóricas se realizó mediante la prueba de *chi cuadrado*, o con la prueba exacta de Fisher en caso necesario. Se consideró como resultado estadísticamente significativo un valor bilateral de $p <$

0,05. La asociación entre los distintos biomarcadores se analizó mediante la estimación de la correlación de Spearman dos a dos entre todas las variables.

Para contrastar la asociación entre los distintos grupos de riesgo y los distintos biomarcadores derivados del microbioma se ajustaron modelos de regresión ordinales con cada uno de los metabolitos a estudiar como variable respuesta y la variable grupos de riesgo como variable predictora. La utilización de modelos de regresión ordinal nos permitió trabajar de forma natural con los valores por debajo del límite de detección, abundantes para algunos de los metabolitos analizados.²⁰¹

Adicionalmente a los modelos ordinales, se ajustó un modelo bayesiano multivariable con el objetivo de discriminar entre los tres grupos de riesgo en base a los distintos metabolitos. Para estimar la plausibilidad de la asociación entre cada uno de los metabolitos incluidos en el modelo y su capacidad de discriminación entre los tres grupos se estimó la máxima probabilidad de efecto (MPE) para cada uno de los parámetros del modelo siguiendo la metodología descrita por *Makowski et al.*²⁰²

Por último, se ajustó un modelo de regresión logística para determinar la capacidad de discriminar entre provocado y no provocado mediante los valores de “*AceticC*”. Para determinar la capacidad predictiva del modelo se estimó una curva ROC y su área bajo la curva (AUC).

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa SPSS (versión 20.0, SPSS Inc., Chicago, Illinois, EE. UU.) y el software R (versión 4.3.2) y los paquetes de R brms (versión 2.20.4), clickR (versión 0.9.42) e igraph (versión 2.0.1.1).

3.7. Aspectos éticos y confidencialidad:

Los datos registrados de los pacientes fueron monitorizados regularmente en el sitio confirmando la consistencia entre la información registrada y los registros de los pacientes.

Fue obligatorio obtener del sujeto su consentimiento para participar en el estudio de forma escrita mediante la cumplimentación y firma de la “Hoja de información al paciente y consentimiento informado”. Los investigadores del registro de cada centro fueron los responsables de informar en profundidad al sujeto de la naturaleza y objetivos del estudio, así como los posibles riesgos. El documento se firmó por duplicado entregándose una copia al paciente y quedando otra en poder del investigador. En el caso de pacientes incapacitados legalmente, o aquellos otros que no fueron capaces de tomar decisiones o su estado físico o psíquico no le permitiera hacerse cargo de su situación a criterio del médico responsable de la asistencia, el consentimiento fue firmado por su representante legal. Si el paciente carecía de representante legal, el consentimiento lo prestaron las personas vinculadas a él por razones familiares o de hecho.

El estudio se realizó de acuerdo con el protocolo del estudio OSIRIS,²⁰³ la guía de Buena Práctica Clínica, la declaración de Helsinki y los requerimientos de la Ley de investigación biomédica 14/2007, y el Real Decreto 1716/2011, por el que se establecen los requisitos básicos de autorización y funcionamiento de los biobancos con fines de investigación biomédica y del tratamiento de las muestras biológicas de origen humano, y se regula el funcionamiento y organización del Registro Nacional de biobancos para investigación biomédica. El estudio OSIRIS fue evaluado por el CEI Biomédico de Andalucía como comité de referencia para el resto de los centros participantes.

Las muestras de sangre donadas al biobanco no tenían carácter de propiedad permanente, y su donación estaba limitada a unos objetivos claros y concretos, entre los que se incluye el aumento de conocimiento en la patogenia de la TEP, y a un tiempo de estudio razonable (no superior a los 6 años). Transcurrido este tiempo, los datos de la información derivados del estudio han de ser públicos y/o

fácilmente consultables, y el material genético dejará de ser custodiado por el promotor y el destino de éste debe ser decidido y/o regulado por los Organismos Gubernamentales del país de procedencia de las muestras, o en su caso, ser destruido. Bajo ningún concepto y en ningún momento las muestras pueden ser motivo de lucro directo, bien sea por la venta del material o de los derechos para realizar estudios sobre los mismos.

Para este estudio se dispuso de un CRDe basado en el registro RIETE. Los datos registrados se obtuvieron directamente desde los documentos fuente. El investigador garantizó que todas las personas implicadas en el estudio han respetado la confidencialidad de cualquier información acerca de los pacientes incluidos en el mismo y que, a fin de proteger la confidencialidad de los pacientes, únicamente ha hecho constar el número de historia clínica y las iniciales de estos en los CRDe. Los registros originales rellenos en RIETE de los sujetos del estudio son propiedad exclusiva del promotor y no se permite ser puestos a disposición de terceros en ninguna circunstancia, excepto a los representantes autorizados del promotor o de las autoridades reguladoras competentes. Era responsabilidad del investigador principal de cada centro asegurar la correcta cumplimentación, revisión y aprobación de todos los datos registrados en RIETE mediante su firma digital. En todo momento, el investigador fue el responsable de la fidelidad y veracidad de todos los datos en él registrado. El investigador es el único responsable de la conservación de los registros de identificación de los sujetos participantes, hojas de consentimiento informado firmadas y copia de los registros en RIETE.

RESULTADOS:

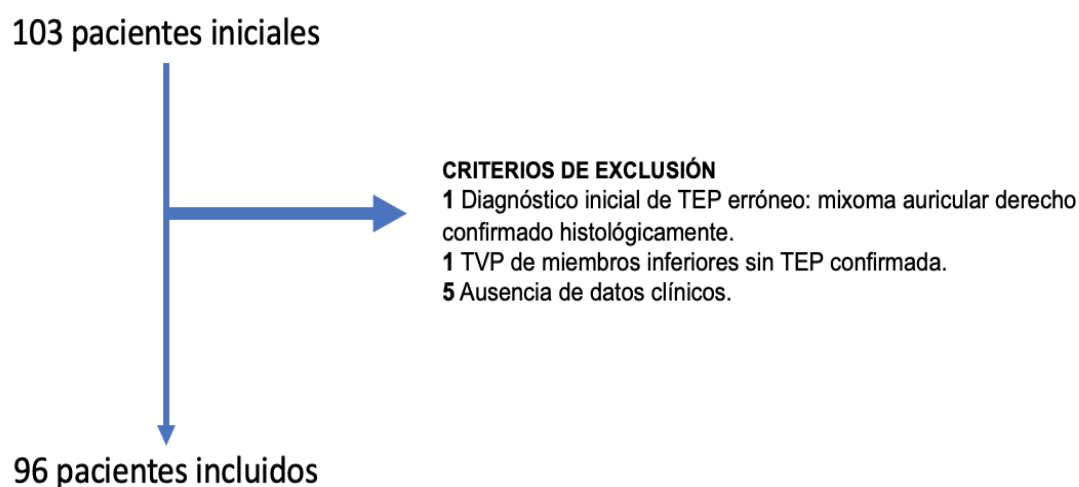
4. RESULTADOS:

4.1. Análisis descriptivo de pacientes y controles

4.1.1. Pacientes del estudio

Inicialmente se recogieron muestras de sangre de 103 pacientes con diagnóstico confirmado de TEP aguda sintomática, de los cuales 7 pacientes fueron excluidos de los análisis (**figura 9**). Por lo tanto, finalmente se incluyeron un total de 96 pacientes con TEP aguda sintomática de los que disponíamos de datos clínicos y de muestras de sangre para los análisis planteados en el trabajo. Estos pacientes fueron diagnosticados de TEP entre abril de 2014 y marzo de 2018.

Figura 9: Diagrama de flujo de pacientes con tromboembolia pulmonar seleccionados para el análisis del estudio.



Abreviaturas: TEP, tromboembolia de pulmón; TVP, trombosis venosa profunda.

4.1.2. Controles del estudio

Adicionalmente, se obtuvieron muestras de sangre de 30 controles sanos sin TEP, que se emplearon para comparar con los resultados de la cohorte de pacientes con TEP aguda.

Los controles del estudio no presentaban diferencias con la cohorte de pacientes por sexo (casos: 51,0% varones; controles: 50,0% varones; $p=0,910$) ni por peso (casos: $81,4 \pm 16,5$ kg; controles: $77,2 \pm 9,2$ kg; $p=0,194$). Sin embargo, los casos tenían una edad media superior respecto a los controles (casos: $63,6 \pm 16,5$ años; controles: $48,6 \pm 4,6$ años; $p<0,001$).

Tabla 2: Características demográficas y antropométricas de la cohorte de pacientes con tromboembolia pulmonar.

Variable	Resultados
Pacientes, N	96
Edad; media (DS)	63,61 (16,45)
Mujer; n (%)	47 (49)
Varón; n (%)	49 (51)
Peso, kg; media (DS)	81,36 (16,48)
Peso < 60 kg; n (%)	3 (3,1)
Peso > 100 kg; n (%)	9 (9,4)
Talla, cm; media (DS)	167,04 (9,88)
IMC, kg/m ² ; media (DS)	30,78 (5,75)

Abreviaturas: DS, desviación estándar; IMC, índice de masa corporal.

Características clínicas basales de la población estudiada

De los 96 pacientes incluidos en el estudio, la distribución por sexo fue similar, 47 mujeres (48,96%) y 49 varones (51,04%), con una edad media de $63,6 \pm 16,5$ años. En cuanto a la antropometría de la cohorte de estudio, observamos que el

peso medio fue de $81,4 \pm 16,5$ kg, con un 9,4% y un 3,1% de los pacientes con peso extremo (>100 kg) y un peso inferior a 60 kg, respectivamente. La altura media de los pacientes fue de 167 ± 10 cm, y un índice de masa corporal medio de $30,8 \pm 5,8$ kg/m² (tabla 2).

Tabla 3: Factores de riesgo de la cohorte de pacientes con tromboembolia pulmonar.

Variable	Resultados
Pacientes, N	96
Cáncer activo; n (%)	13 (13,5)
Con metástasis; n (%)	5 (38,5)
Cirugía reciente; n (%)	4 (4,2)
Inmovilizado ≥ 4 días; n (%)	8 (8,3)
Viaje largo ≥ 6 horas; n (%)	3 (3,2)
Terapia hormonal; n (%)	7 (7,3)
Embarazo/postparto; n (%)	1 (1,1)
ETV previa; n (%)	10 (10,4)
Varices en los miembros inferiores; n (%)	12 (12,5)
No provocada; n (%)*	67 (69,8)

Abreviaturas: ETV, enfermedad tromboembólica venosa.

* Se definió la TEP no provocada en ausencia de cáncer activo, inmovilidad reciente, cirugía, uso de estrógenos, embarazo, posparto o viajes de larga duración.

El 69,8% de los pacientes presentó el episodio tromboembólico venoso sin identificarse ningún factor de riesgo transitorio (TEP no provocada). El resto de los pacientes (30,2%) presentó una TEP provocada. Una paciente se encontraba en situación de postparto reciente (<2 meses del parto) en el momento del diagnóstico de la TEP. Trece pacientes (13,5%) presentaron la trombosis asociada a un cáncer activo, de los cuales 5 (38,5%) presentaban un cáncer avanzado con metástasis. Del resto de factores de riesgo asociados al desarrollo del episodio tromboembólico venoso destacan cuatro pacientes (4,2%) con historia de cirugía reciente, ocho pacientes (8,3%) con antecedente de una inmovilización reciente por causa médica no-quirúrgica, y tres pacientes (3,2%) habían realizado un viaje de larga distancia de al menos 6 horas en las semanas previas al diagnóstico de la TEP. Otros factores de riesgo de ETV identificados en la muestra fueron: terapia

hormonal en siete (7,3%) pacientes, varices en los miembros inferiores en 12 (12,5%) y antecedente de episodios previos de ETV en 10 (10,4%) (**tabla 3**).

Tabla 4: Comorbilidades de la cohorte de pacientes con tromboembolia pulmonar.

<i>Variable</i>	<i>Resultados</i>
Pacientes, N	96
Enfermedades concomitantes,	
Enfermedad concomitante conocida; n (%)	73 (76,0)
Insuficiencia cardíaca crónica; n (%)	13 (13,5)
Enfermedad pulmonar crónica; n (%)	19 (19,8)
Diabetes; n (%)	15 (15,8)
Hipertensión arterial; n (%)	51 (53,1)
Infarto de miocardio/angina; n (%)	2 (2,1)
Isquemia cerebral; n (%)	4 (4,2)
Arteriopatía periférica sintomática; n (%)	2 (2,1)
Hernia de hiato; n (%)	7 (7,3)
Enfermedad tiroidea; n (%)	5 (5,2)
Fumador activo; n (%)	19 (20,2)
Cáncer; n (%)	13 (13,5)
Tratamiento concomitante; n (%)	80 (83,3)
Tratamiento con corticoides; n (%)	9 (9,7)
Tratamiento antiagregante; n (%)	18 (18,8)
Tratamiento con psicofármacos; n (%)	21 (21,9)
Hemorragia grave reciente; n (%)	0

En cuanto a las comorbilidades detectadas en la población de estudio, algo más de tres de cada cuatro pacientes (76%) presentaban al menos una enfermedad concomitante ya conocida previa al diagnóstico de la TEP. Las principales comorbilidades de la muestra fueron, en orden de más a menos frecuentes, la hipertensión arterial sistémica (53,1%), la enfermedad pulmonar crónica (19,8%), la diabetes (15,8%) y la insuficiencia cardíaca crónica (13,5%). Otras comorbilidades menos frecuentes fueron la hernia de hiato (7,3%), el hipotiroidismo (5,2%), la isquemia cerebral (4,2%), la cardiopatía isquémica crónica (2,1%) y la arteriopatía periférica sintomática (2,1%). El 83,3% de los

pacientes estaban recibiendo algún tratamiento farmacológico en el momento del diagnóstico de la TEP, fundamentalmente psicofármacos (21,9%), antiagregantes (18,8%) y corticoides (9,7%). 19 pacientes (20,2%) eran fumadores activos al diagnóstico. Al diagnóstico de la TEP, ninguno de los pacientes presentaba un antecedente hemorrágico grave reciente ([tabla 4](#)).

Así mismo, evaluamos las características basales de los pacientes de la cohorte con TEP de acuerdo con su clasificación en subgrupos por los factores de riesgo de ETV subyacentes. Así, en comparación con los pacientes con TEP no provocada, en los pacientes con el episodio de TEP provocada por un factor de riesgo subyacente identificable (i.e., inmovilidad reciente, cirugía, cáncer, uso de estrógenos, embarazo, postparto o un viaje de larga duración reciente) observamos una edad media ligeramente inferior (60 vs. 65 años) y un peso menor (77 vs. 83 kg), sin ser estadísticamente significativas estas diferencias ($p=0,128$ y $p=0,081$, respectivamente). Respecto a las comorbilidades, observamos diferencias en la frecuencia de hipertensión arterial sistémica (HTA), siendo menos probable en los pacientes con una TEP provocada (34,5% vs. 61,2%; $p=0,016$) ([tabla 5](#)).

Tabla 5: Características basales de la cohorte de pacientes con tromboembolia pulmonar comparando por grupos según los factores de riesgo.

Variable	Casos totales	TEP no provocada	TEP provocada	p
Pacientes, N	96	67	29	
Características demográficas				
Edad; media (DS)	63,61 (16,45)	65,30 (15,56)	59,72 (18,01)	0,128
Mujer; n (%) Varón; n (%)	47 (49) 49 (51)	33 (49,3) 34 (50,7)	14 (48,3) 15 (51,7)	0,930
Peso, kg; media (DS)	81,36 (16,48)	83,29 (15,47)	76,89 (18,11)	0,081
Talla, cm; media (DS)	167,04 (9,88)	167,83 (10,28)	165,35 (9,05)	0,399
IMC, kg/m²; media (DS)	30,78 (5,75)	31,56 (5,40)	29,11 (6,28)	0,149
Disposición,				
Ingresado; n (%) Ambulatorio; n (%)	2 (2,1) 94 (97,9)	1 (1,5) 66 (98,5)	1 (3,5) 28 (96,5)	0,515
Enfermedades concomitantes,				
Enfermedad concomitante; n (%)	73 (76,0)	50 (74,6)	23 (79,3)	0,622
Insuficiencia cardíaca crónica; n (%)	13 (13,5)	10 (14,9)	3 (10,3)	0,403
Enfermedad pulmonar crónica; n (%)	19 (19,8)	12 (17,9)	7 (24,1)	0,482
Diabetes; n (%)	15 (15,8)	11 (16,4)	4 (13,9)	1,000
Hipertensión arterial; n (%)	51 (53,1)	41 (61,2)	10 (34,5)	0,016*
Infarto de miocardio/angina; n (%)	2 (2,1)	2 (3,0)	0 (0)	0,480
Isquemia cerebral; n (%)	4 (4,2)	4 (6,0)	0 (0)	0,310
Arteriopatía periférica sintomática; n (%)	2 (2,1)	2 (3,0)	0 (0)	0,480
Hernia de hiato; n (%)	7 (7,3)	4 (6,0)	3 (10,3)	0,355
Enfermedad tiroidea; n (%)	5 (5,2)	2 (3,0)	3 (10,3)	0,160
Fumador activo; n (%)	19 (20,2)	13 (19,4)	6 (20,7)	0,848
Cáncer; n (%)	13 (13,5)	0 (0)	13 (44,8)	<0,001‡
Tratamiento concomitante; n (%)	80 (83,3)	57 (85,1)	23 (79,3)	0,487
Corticoides; n (%)	9 (9,7)	7 (10,4)	2 (7,0)	0,541
Antiagregantes; n (%)	18 (18,8)	13 (19,4)	5 (17,2)	0,779
Psicofármacos; n (%)	21 (21,9)	16 (24,0)	5 (17,2)	0,428

Comparaciones entre pacientes con TEP no provocada y TEP provocada: *p <0.05; †p <0.01; ‡p <0.001.

Abreviaturas: DS, desviación estándar; IMC, índice de masa corporal.

Se definió la TEP no provocada en ausencia de cáncer activo, inmovilidad reciente, cirugía, uso de estrógenos, embarazo, posparto o viajes de larga duración; Se consideró TEP provocada en presencia de inmovilidad reciente, cirugía, cáncer, uso de estrógenos, embarazo, posparto o viajes de larga duración.

Forma de presentación de la tromboembolia de pulmón

El 97,9% de los pacientes fueron diagnosticados de TEP tras acudir a urgencias donde se realizó el diagnóstico de confirmación mediante prueba de imagen; en dos pacientes (2,1%) el diagnóstico se realizó durante un ingreso hospitalario por otro motivo distinto a la propia TEP ([tabla 6](#)).

La frecuencia cardiaca media fue de 88 ± 17 lpm, la TAS media fue de 135 ± 22 mmHg y la frecuencia respiratoria media de 21 ± 11 rpm. De los 96 pacientes, uno presentó una TEP de alto riesgo por criterios de inestabilidad hemodinámica al diagnóstico (TAS < 90 mmHg) ([tabla 6](#)).

Tabla 6: Presentación inicial de la tromboembolia pulmonar.

VARIABLE	Resultados
Pacientes, N	96
Ámbito de aparición de los síntomas de la TEP	
Ingresado; n (%)	2 (2,1)
Ambulatorio; n (%)	94 (97,9)
Constantes,	
Frecuencia cardíaca; lpm (DS)	88,8 (17,2)
Tensión arterial sistólica; mmHg (DS)	134,8 (22,3)
TAS <90 mmHg; n (%)	1 (1,0)
Frecuencia respiratoria; rpm (DS)	21,3 (11,5)
Síntomas presentación inicial; n (%)	
Asintomático	1 (1,0)
Síntomas de TVP aislada	8 (8,3)
TEP sintomático	87 (90,7)
Disnea	75 (78,1)
Dolor torácico	50 (52,1)
Tos	21 (21,9)
Hemoptisis	12 (12,5)
Tumefacción	36 (37,5)
Dolor extremidad	39 (40,6)
Fiebre	6 (6,3)

Abreviaturas: DS, desviación estándar; TAS, tensión arterial sistólica; TEP, tromboembolismo pulmonar; TVP, trombosis venosa profunda.

Entre los síntomas iniciales de presentación, el 90,7% de los pacientes consultó por sintomatología característica de TEP, fundamentalmente sensación disneica (78,1%), dolor torácico (52,1%), tos (21,9%) y sangrados hemoptoicos (12,5%). Seis pacientes (6,3%) presentaban fiebre termometrada ($>38^{\circ}\text{C}$) al diagnóstico. Además, se observó sintomatología en las piernas sugestiva de TVP: 39 pacientes (40,6%) asociaban clínica de dolor en las extremidades inferiores y 36 (37,5%) refirieron aumento del perímetro de al menos una de las piernas. Ocho (8,3%) pacientes consultaron únicamente por sintomatología compatible con TVP, y un paciente presentó la TEP sin síntomas de ETV asociados ([tabla 6](#)).

En cuanto a los datos de la analítica básica realizada al diagnóstico de la TEP, encontramos que los valores medios de las 3 series del hemograma (hemoglobina, leucocitos y plaquetas) fueron $13,5 \pm 1,9$ g/dL, $9,6 \pm 3,5 \times 100.000/\text{mm}^3$, y $249,1 \pm 94,9 \times 100.000/\text{mm}^3$, respectivamente. Presentaron criterios de anemia (Hemoglobina <12 g/dL) y trombopenia ($<100.000/\text{mm}^3$) el 24,0% y el 7,3%, respectivamente. En la bioquímica, la creatinina media fue de $0,97 \pm 0,32$ mg/dL, y los valores de transaminasas (GOT y GPT) medios fueron de $29,0 \pm 18,9$ UI/L y $33,5 \pm 26,9$ UI/L, respectivamente. El valor medio de colesterolemia fue de 189 ± 45 mg/dL. El proBNP fue medido en 17 de los 96 pacientes (17,7%) con un valor medio de 3.354 ng/L. En la hemostasia básica, se determinó el valor de dímero D con intención diagnóstica en el 84% de los pacientes, con un valor medio de 9.042 ng/mL ([tabla 7](#)).

En cuanto a las pruebas realizadas, el 95,8% de los pacientes disponían de una TAC torácica con contraste para el diagnóstico de la TEP, de los cuales el 65,2% presentaban defectos de repleción de localización proximal, mientras que el 34,8% restante presentaban afectación únicamente de ramas arteriales pulmonares periféricas. Uno de los pacientes fue diagnosticado mediante gammagrafía de ventilación-perfusión pulmonar. Se realizó una ecografía diagnóstica de los miembros inferiores en 71 de los pacientes, confirmándose la presencia de TVP en 44 (62,0%) de ellos.

Tabla 7: Características de resultados analíticos y de imagen al diagnóstico de la tromboembolia pulmonar.

VARIABLE	Resultados
Pacientes, N	96
Analítica sanguínea,	
Hemoglobina; g/dl (DS)	13,53 (1,92)
Hemoglobina < 12 g/dl; n (%)	23 (24,0)
Leucocitos x 100.000/mm ³ (DS)	9,62 (3,48)
Plaquetas x 100.000/mm ³ (DS)	249,12 (94,87)
Plaquetas < 100.000/mm ³ ; n (%)	7 (7,29)
Creatinina; mg/dL (DS)	0,97 (0,32)
GPT; UI/L (DS)	33,53 (26,89)
GOT; UI/L (DS)	29,03 (18,90)
proBNP; ng/L (DS) n=17	3.354,28 (9.563,87)
Colesterol total; mg/dl (DS)	188,98 (44,51)
Dímero D; ng/ml (DS) n=81	9.042,00 (11.136,51)

Abreviaturas: DS, desviación estándar; proBNP, péptido natriurético cerebral tipo B.

La ecocardiografía se realizó a 39 pacientes (41,5%). Además, se realizó un electrocardiograma a 70 (72,9%) pacientes, detectándose distintos signos de sobrecarga derecha: bloqueo de la rama derecha del haz de His en el 15%, un patrón S1Q3T3 en el 12% y ondas T negativas en derivaciones precordiales en el 17% de los casos. Además, 2 pacientes (2,9%) presentaban una fibrilación auricular confirmada en el electrocardiograma realizado al diagnóstico. Por último, la radiografía de tórax realizada al diagnóstico fue normal en algo más de la mitad de los pacientes en los que se realizó (58,5%), presentando alteraciones en el resto de los pacientes, entre las que destacan la presencia de imagen de infarto pulmonar en 7 (10,6%) y de cardiomegalia en 6 (9,1%) de éstos ([tabla 8](#)).

Tabla 8: Pruebas de diagnóstico por imagen de la tromboembolia pulmonar.

<i>VARIABLE</i>	<i>Resultados</i>
Pacientes, N	96
Pruebas diagnósticas de imagen,	
TAC pulmonar con contraste intravenoso; n (%)	92 (95,8)
Proximal (central/principal/lobar)	60 (65,2)
Periférico (S/SS)	32 (34,8)
Gammagrafía V/Q pulmonar; n (%)	1 (1,0)
Ecocardiografía; n (%)	39 (41,5)
ECG; n (%)	70 (72,9)
Fibrilación auricular; n (%)	2 (2,9)
Bloqueo de rama derecha; n (%)	10 (14,7)
Patrón S1Q3T3; n (%)	8 (11,6)
T negativas en precordiales; n (%)	12 (17,4)
Radiografía de tórax; n (%)	66 (69,5)
Radiografía torácica normal; n (%)	38 (58,5)
Ecografía de miembros inferiores; n (%)	71 (74,0)
Trombosis venosa profunda; n (%)	44 (62,0)

Abreviaturas: ECG, electrocardiograma; DS, desviación estándar; S, segmentario; SS, subsegmentario; TAC, tomografía axial computerizada; V/Q: ventilación/perfusión.

Complicaciones durante el seguimiento en la cohorte de pacientes con tromboembolia de pulmón.

Los pacientes fueron seguidos una media de 26 meses. Durante el seguimiento, fallecieron 7 (7,3%) pacientes. Además, 12 (12,5%) pacientes presentaron sangrados, dos de ellos (16,7%) graves, y 15 pacientes presentaron recurrencias trombóticas (15,6%). Del total de pacientes, se sospechó el desarrollo de HPTEC en 7 (7,3%) pacientes, confirmándose mediante prueba de imagen y cateterismo cardíaco derecho en uno de ellos (tabla 9).

Tabla 9: Complicaciones durante el seguimiento en la cohorte de pacientes con tromboembolia pulmonar.

<i>Variable</i>	Resultados
Pacientes, N	96
Tiempo de seguimiento; meses (DS)	26,1 (31,1)
Ingreso por complicación relacionada; n (%)	14 (15,6)
Muerte; n (%)	7 (7,3)
Hemorragia; n (%)	12 (12,5)
Hemorragia grave; n (%)	2 (16,7)
Recurrencias tromboembólicas; n (%)	15 (15,6)
HPTEC sospecha; n (%)	7 (7,3)
HPTEC confirmada; n (%)	1 (1,0)

Abreviaturas: DS, desviación estándar; HPTEC, hipertensión pulmonar tromboembólica crónica.

4.2. Resultados por Objetivos de la Tesis Doctoral:

4.2.1. *Objetivo Principal: Comparación del microbioma en muestras de sangre entre pacientes con tromboembolia pulmonar y controles sanos*

Determinación del ADN bacteriano

No se logró identificar ADN bacteriano en las muestras de sangre (sangre total, plasma o suero) en los pacientes con TEP. Consecuentemente, no procedimos a continuar con los pasos previstos para la identificación de ADN bacteriano en las muestras de sangre de la cohorte seleccionada.

Comparación de los niveles de metabolitos derivados del microbioma en muestras de sangre entre pacientes con tromboembolia de pulmón y controles sanos

En el análisis funcional del microbioma, mediante la medición de los metabolitos derivados del microbioma, de los 96 pacientes diagnosticados de TEP y de los 30 controles sanos, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre estos dos grupos para la mayoría de los metabolitos.

En comparación con los controles sanos, en los pacientes con TEP aguda sintomática se observaron valores más elevados de TMAO (11,51 μM vs. 6,69 μM ; $p=0,022$), acético (48,29 μM vs. 32,96 μM ; $p=0,044$) y butírico C (18 μM vs. 2; $p=0,055$), esta última sin significación estadística. Por el contrario, los pacientes con TEP aguda presentaron valores inferiores de propiónico (3,78 μM vs. 5,33 μM ; $p=0,007$), isobutírico (4,99 μM vs. 7,32 μM ; $p=0,002$), valérico (0,41 μM vs. 0,63 μM ; $p<0,001$) e isovalérico (1,97 μM vs. 2,51; $p=0,064$), este último sin significación estadística ([tabla 10 y figura 10](#)).

Tabla 10: Metabolitos derivados del microbioma comparando casos frente a controles.

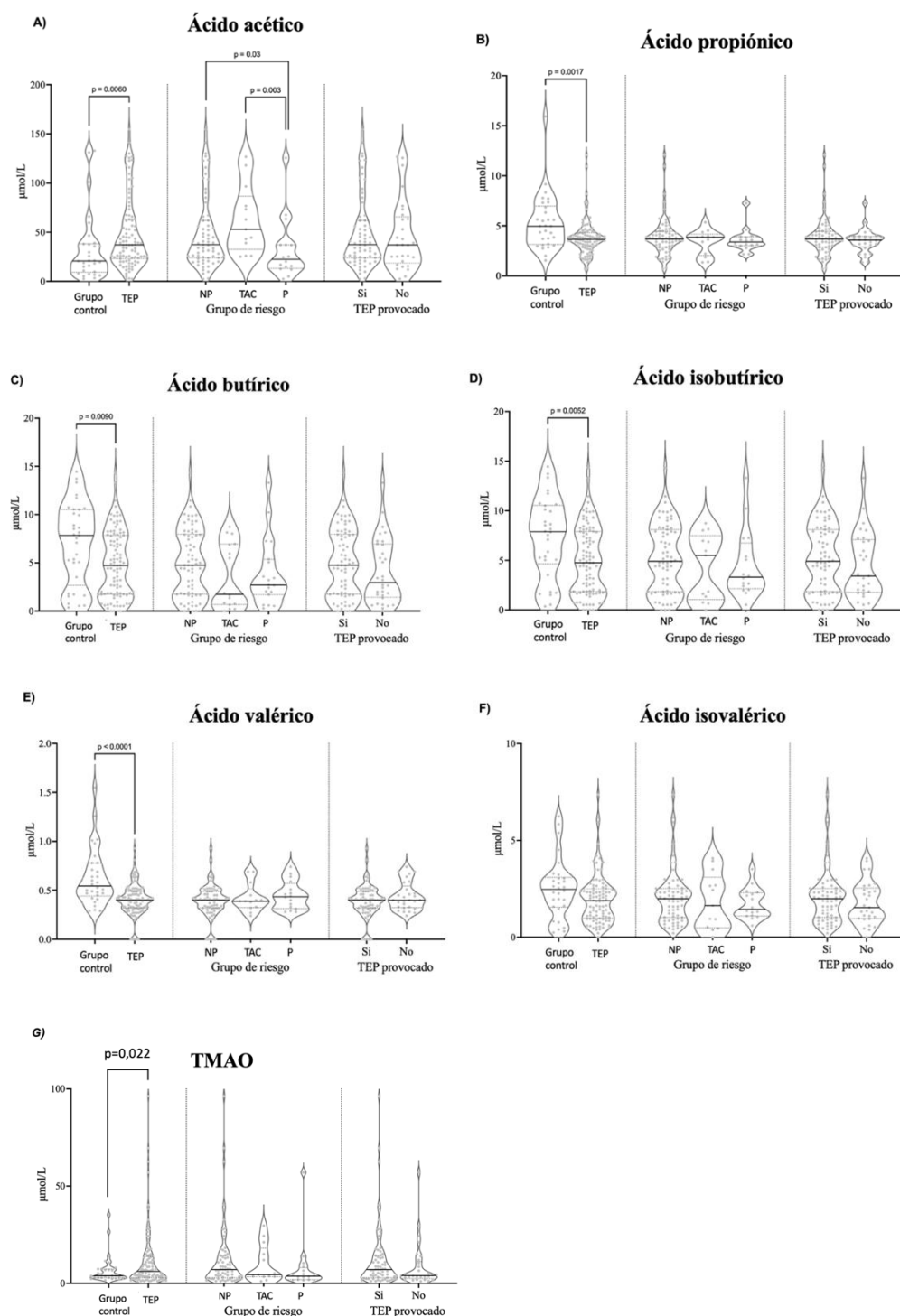
<i>Variable</i>	Casos	Controles	p
Pacientes, N	96	30	
Acético			
Valor medio; μM (DS)	48,29 (36,53)	32,96 (34,42)	0,044*
Propiónico; μM (DS)	3,78 (1,76)	5,33 (2,81)	0,007†
Butírico; μM (DS)			
No medible (< 0,2 μM); n (%)	18 (18,8)	2 (6,7)	0,092
Valor medio; μM (DS)	4,03 (9,90)	1,68 (2,38)	0,055
Isobutírico; μM (DS)	4,99 (3,42)	7,32 (4,07)	0,002†
Valérico; μM (DS)	0,41 (0,16)	0,63 (0,29)	<0,001‡
Isovalérico; μM (DS)	1,97 (1,32)	2,51 (1,55)	0,064
TMAO; μM (DS)	11,51 (15,53)	6,69 (7,33)	0,022*

Comparaciones entre casos (pacientes con TEP) y controles: *p <0.05; †p <0.01; ‡p <0.001.

Abreviaturas: DS, desviación estándar; TMAO, N-óxido trimetilamina.

Figura 10: Comparación de los valores de los metabolitos derivados del microbioma entre controles sanos y pacientes con tromboembolia pulmonar, y entre pacientes según los factores de riesgo.

Comparaciones entre controles sanos y pacientes con TEP, y entre pacientes con TEP según los factores de riesgo trombóticos, para los siguientes metabolitos: A) ácido acético; B) ácido propiónico; C) ácido butírico; D) ácido isobutírico; E) ácido valérico; F) ácido isovalérico; G) N-óxido trimetilamina.



Abreviaturas: NP, no provocada; TAC, trombosis asociada a cáncer; TEP, tromboembolia de pulmón; TMAO, N-óxido trimetilamina.

Capacidad predictiva para tromboembolia pulmonar de los distintos biomarcadores del microbioma

Entre todos los metabolitos derivados del microbioma, el mejor predictor de presentar una TEP aguda y, por lo tanto, la variable que mejor discrimina a los pacientes con TEP, en comparación con los controles sanos, fue el valor del valérico, con un AUC de 0,758 (IC95% 0,655 a 0,862) (**tabla 11**).

Tabla 11: Áreas bajo la curva de los metabolitos derivados del microbioma para predecir tromboembolia pulmonar.

	AUC	DS	IC95%
TMAO	0,5762	0,0539	0,47053 – 0,6819
Acético	0,6651	0,0607	0,54620 – 0,7840
Propiónico	0,6880	0,0616	0,56721 – 0,80883
Butírico	0,5790	0,0532	0,47476 – 0,68323
Isobutírico	0,6679	0,0617	0,54699 – 0,78878
Valérico	0,7585	0,0529	0,65477 – 0,86224
Isovalérico	0,6132	0,0639	0,48786 – 0,73853

Abreviaturas: AUC, área bajo la curva; DS, desviación estándar; IC, intervalo de confianza; TMAO, N-óxido trimetilamina

4.2.2. Objetivo secundario 1: Comparación de los niveles de metabolitos derivados del microbioma en muestras de sangre entre pacientes con tromboembolia pulmonar

En el análisis funcional del microbioma, comparando los valores de los niveles de los metabolitos medidos en sangre entre pacientes con TEP provocada, que incluye a los pacientes con trombosis asociada a cáncer (n=29), con los pacientes con TEP no provocada (n=67), no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre grupos para ninguna de las determinaciones de los metabolitos en sangre (**tabla 12 y figura 10**).

Sin embargo, al diferenciar y subclasificar a los pacientes con una trombosis asociada a cáncer (N=13) del resto de los pacientes con una TEP provocada por factores de riesgo distintos al cáncer (N=16) sí encontramos diferencias

estadísticamente significativas en algunos de los valores de estos metabolitos derivados del microbioma según grupos etiológicos (TEP no provocada, TEP asociada a cáncer y TEP provocada).

Tabla 12: Comparación de los metabolitos derivados del microbioma entre pacientes con TEP provocada frente a TEP no provocada.

<i>Variable</i>	Casos totales	TEP no-provocada	TEP provocada	p
Pacientes, N	96	67	29	
Acético ; μM (DS)	48,29 (36,53)	49,38 (37,23)	45,79 (35,37)	0,661
Propiónico ; μM (DS)	3,78 (1,76)	3,91 (1,94)	3,48 (1,20)	0,267
Butírico ; μM (DS)	4,03 (9,90)	3,27 (6,04)	5,95 (16,07)	0,286
Isobutírico ; μM (DS)	4,99 (3,42)	5,22 (3,45)	4,46 (3,33)	0,320
Valérico ; μM (DS)	0,41 (0,16)	0,39 (0,17)	0,44 (0,14)	0,190
Isovalérico ; μM (DS)	1,97 (1,32)	2,06 (1,39)	1,79 (1,10)	0,357
TMAO ; μM (DS)	11,51 (15,53)	12,68 (16,83)	8,80 (11,80)	0,263

Comparaciones entre pacientes con TEP provocada y TEP no provocada: *p <0.05; †p <0.01; ‡p <0.001.

Abreviaturas: DS, desviación estándar; TEP, tromboembolia pulmonar; TMAO, N-óxido trimetilamina.

Se consideró TEP no provocada en ausencia de cáncer activo, inmovilidad reciente, cirugía, uso de estrógenos, embarazo, posparto o viajes de larga duración; Se consideró TEP provocada en presencia de inmovilidad reciente, cirugía, cáncer, uso de estrógenos, embarazo, posparto o viajes de larga duración.

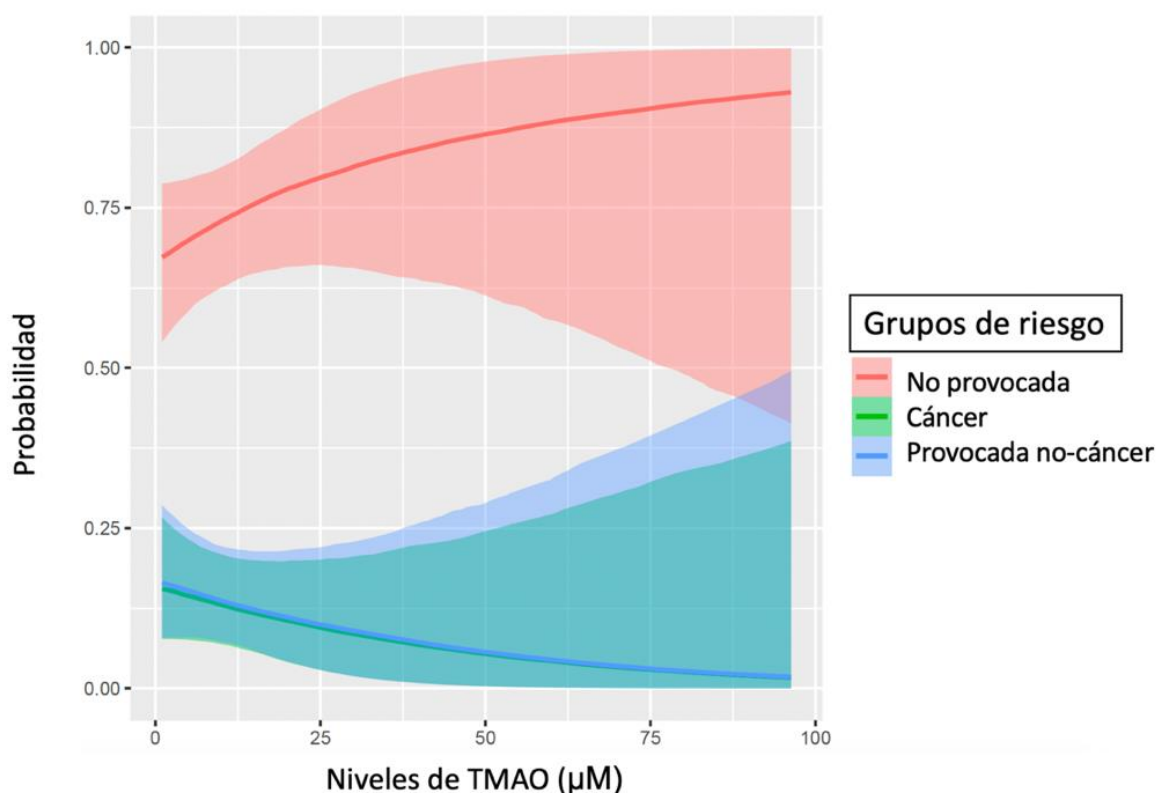
Concretamente, observamos valores más elevados de acético en el subgrupo de pacientes con trombosis asociada a cáncer ($62,36 \pm 34,25 \mu\text{M}$), respecto a los pacientes con TEP provocada por factores de riesgo distintos al cáncer ($32,33 \pm 31,07 \mu\text{M}$) (**figura 10**).

Así, en el análisis multinomial, observamos que valores de TMAO más elevados se asocian con una mayor probabilidad de TEP no provocada, frente a la TEP provocada tanto por cáncer como por otros factores de riesgo identificados (**tabla 13 y figura 11**). Así, valores inferiores de TMAO se asocian tanto a la presencia de cáncer (probabilidad del efecto del 87,1%) como de otros factores de riesgo trombóticos identificados (probabilidad del efecto de 85,1%). En el caso del

acético, aunque la TEP no provocada es la más frecuente a cualquier nivel de valor de acético, valores de acético más elevados se asocian con un aumento de la probabilidad de TEP asociada a cáncer (probabilidad del efecto del 89,4%), mientras que valores inferiores de acético se asocian a una mayor probabilidad de TEP provocada pero por un factor de riesgo distinto al cáncer (probabilidad del efecto del 96,6%) ([tabla 13](#) y [figura 12](#)).

Adicionalmente en el análisis multinomial observamos que, comparado con los pacientes que presentan una TEP provocada, los pacientes con TEP no provocada presentan niveles de acético más elevados ($p=0,04$). Los niveles de acético mostraron la capacidad para diferenciar a los pacientes con una TEP no provocada de los pacientes con TEP provocada por factores de riesgo distintos al cáncer (AUC 0,67; IC95% 0,52-0,86) ([figura 13](#)).

Figura 11: Probabilidad de los grupos de riesgo etiológicos según los niveles de TMAO.



Abreviaturas: TMAO, N-óxido trimetilamina.

Figura 12: Probabilidad de los grupos de riesgo etiológicos según los niveles de acético.

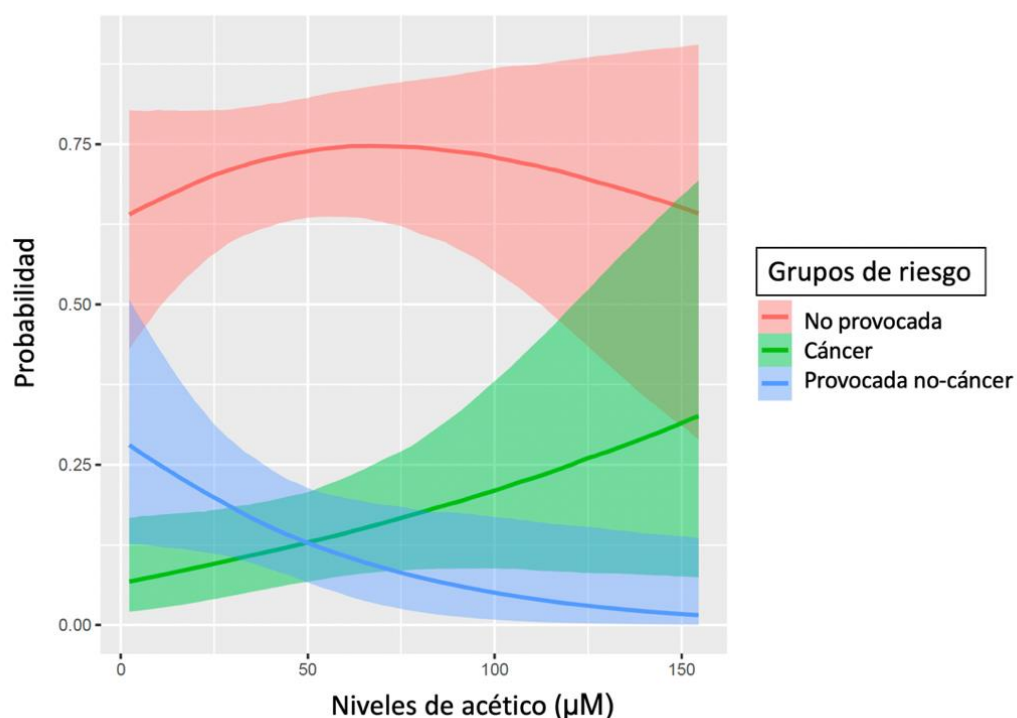


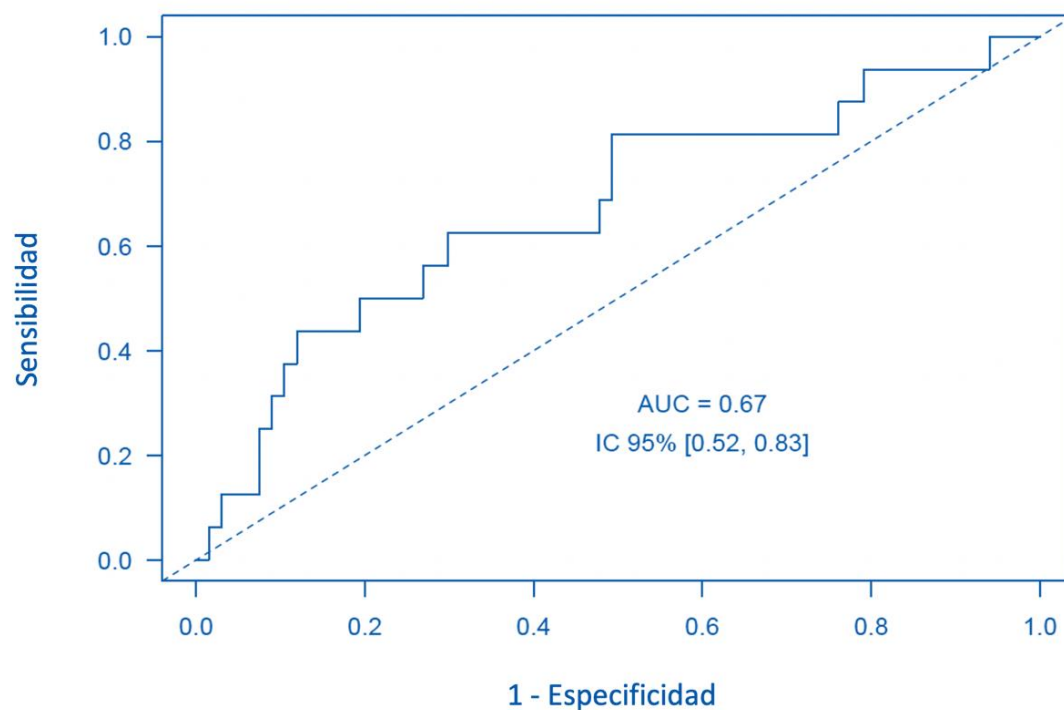
Tabla 13: Modelo multinomial para discriminar distintos grupos de riesgo etiológicos según valores de TMAO y acético.

Variables	Estimado	Error estándar	OR	IC 95%	Probabilidad efecto
Cáncer: (Intercept)	-1.934	0.578	0.145	[0.043, 0.415]	>0.999
Provocado FR no cáncer: (Intercept)	-0.447	0.521	0.64	[0.223, 1.757]	0.801
Cáncer: Acético	0.01	0.008	1.01	[0.994, 1.026]	0.894
Cáncer: TMAO	-0.029	0.027	0.971	[0.914, 1.016]	0.871
Provocado FR no cáncer: Acético	-0.02	0.012	0.981	[0.957, 1.001]	0.966
Provocado FR no cáncer: TMAO	-0.029	0.029	0.971	[0.911, 1.021]	0.851

Análisis bayesiano que estima probabilidad de relación. Los valores en positivo indican una probabilidad de la asociación del efecto es directamente proporcional entre las variables, mientras que los valores en negativo indican que ésta es inversamente proporcional.

Abreviaturas: FR, factor de riesgo; IC 95%, intervalo de credibilidad al 95%; OR, odds ratio.

Figura 13: Área bajo la curva ROC de los niveles de acético para diagnóstico de tromboembolia pulmonar no provocada.



Capacidad predictiva de una embolia pulmonar no provocada, respecto a una embolia pulmonar provocada por factores de riesgo distintos al cáncer.

Abreviaturas: AUC, área bajo la curva; IC 95%, intervalo de confianza al 95%.

4.2.3. Objetivo secundario 2: Biomarcadores de inflamación en sujetos sanos y pacientes con TEP

En el análisis de los marcadores inflamatorios, de una muestra de 66 pacientes diagnosticados de TEP y de 15 de los controles sanos, se observó que los pacientes con TEP presentaron valores inferiores en la mayoría de los marcadores inflamatorios (**tabla 14 y figura 14**).

Así, los pacientes con TEP aguda presentaron valores más elevados de IL-6 que los controles sanos (21,49 μ M vs. 7,70 μ M; $p=0,013$). Por el contrario, los pacientes con TEP aguda presentaron valores inferiores de IL-4 (6,58 μ M vs. 32,94 μ M; $p=0,041$), IL-2 (1,09 μ M vs. 5,23 μ M; $p=0,031$), IL-17A (1,67 μ M vs. 7,70 μ M; $p=0,020$), IL-8 (3,02 μ M vs. 23,56 μ M; $p=0,003$), TNF- α (2,14 μ M vs. 10,49 μ M; $p=0,024$), e IFN- γ (3,60 μ M vs. 19,03 μ M; $p=0,013$).

Tabla 14: Marcadores inflamatorios comparando casos frente a controles.

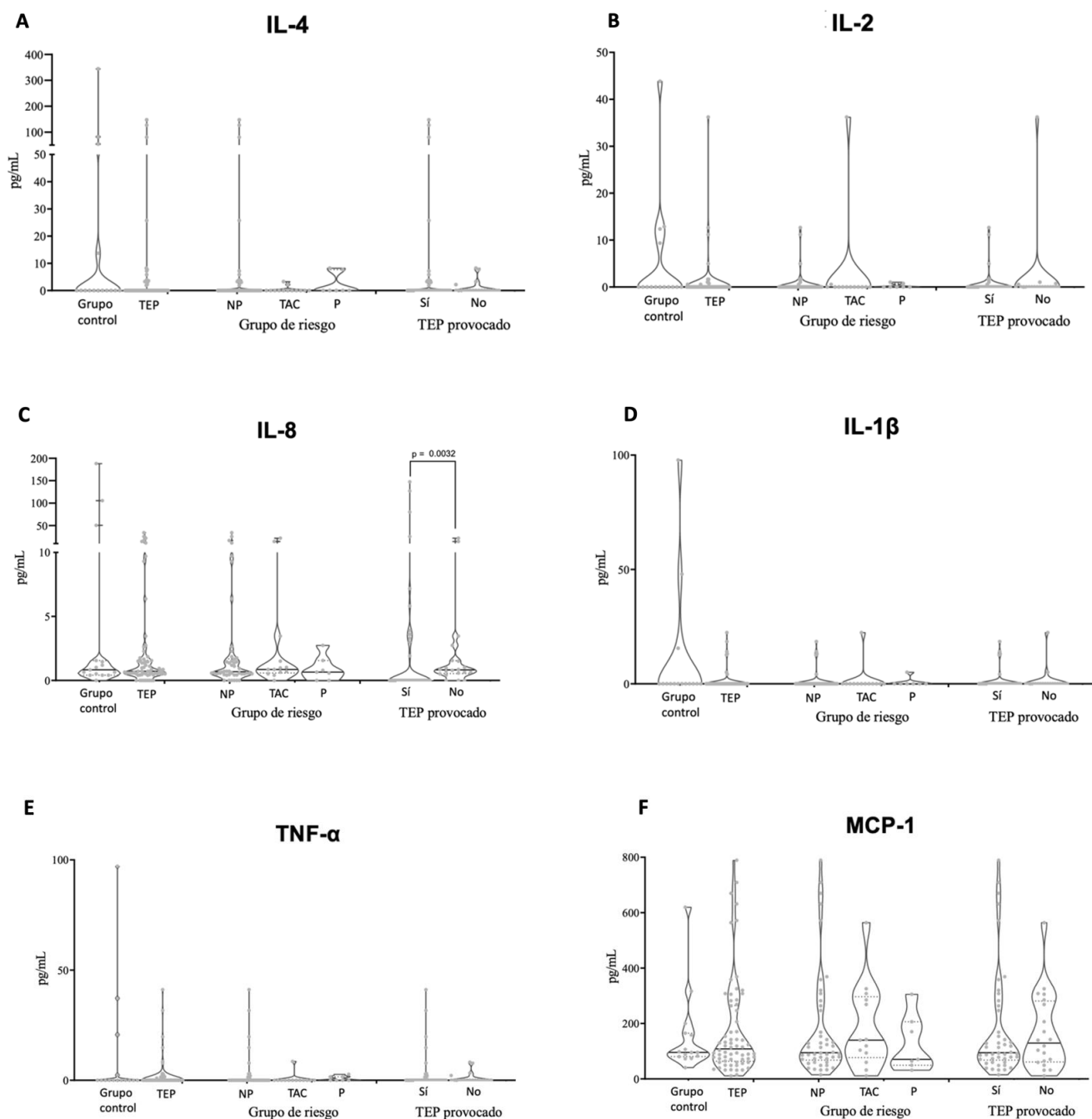
<i>Variable</i>	Casos	Controles	p
Pacientes, N	66	15	
IL-4 ; pg/ml (DS)	6,58 (25,54)	32,94 (89,56)	0,041*
IL-2 ; pg/ml (DS)	1,09 (4,88)	5,23 (11,70)	0,031*
IP-10 ; pg/ml (DS)	114,81 (115,43)	73,24 (97,81)	0,200
IL-1β ; pg/ml (DS)	1,36 (4,46)	10,76 (27,22)	0,204
TNF-α ; pg/ml (DS)	2,14 (6,99)	10,49 (26,18)	0,024*
MCP-1 ; pg/ml (DS)	178,04 (179,79)	152,98 (145,96)	0,617
IL-17A ; pg/ml (DS)	1,67 (4,65)	7,70 (18,55)	0,020*
IL-6 ; pg/ml (DS)	21,49 (33,91)	7,70 (16,03)	0,013*
IL-10 ; pg/ml (DS)	1,75 (8,36)	1,49 (3,31)	0,906
IFN- γ ; pg/ml (DS)	3,60 (14,36)	19,03 (39,98)	0,013*
IL-12p70 ; pg/ml (DS)	1,37 (8,04)	9,22 (27,49)	0,048*
IL-8 ; pg/ml (DS)	3,02 (6,38)	23,56 (53,98)	0,003†
TGF-β1 ; pg/ml (DS)	85,15 (199,51)	55,65 (114,43)	0,583

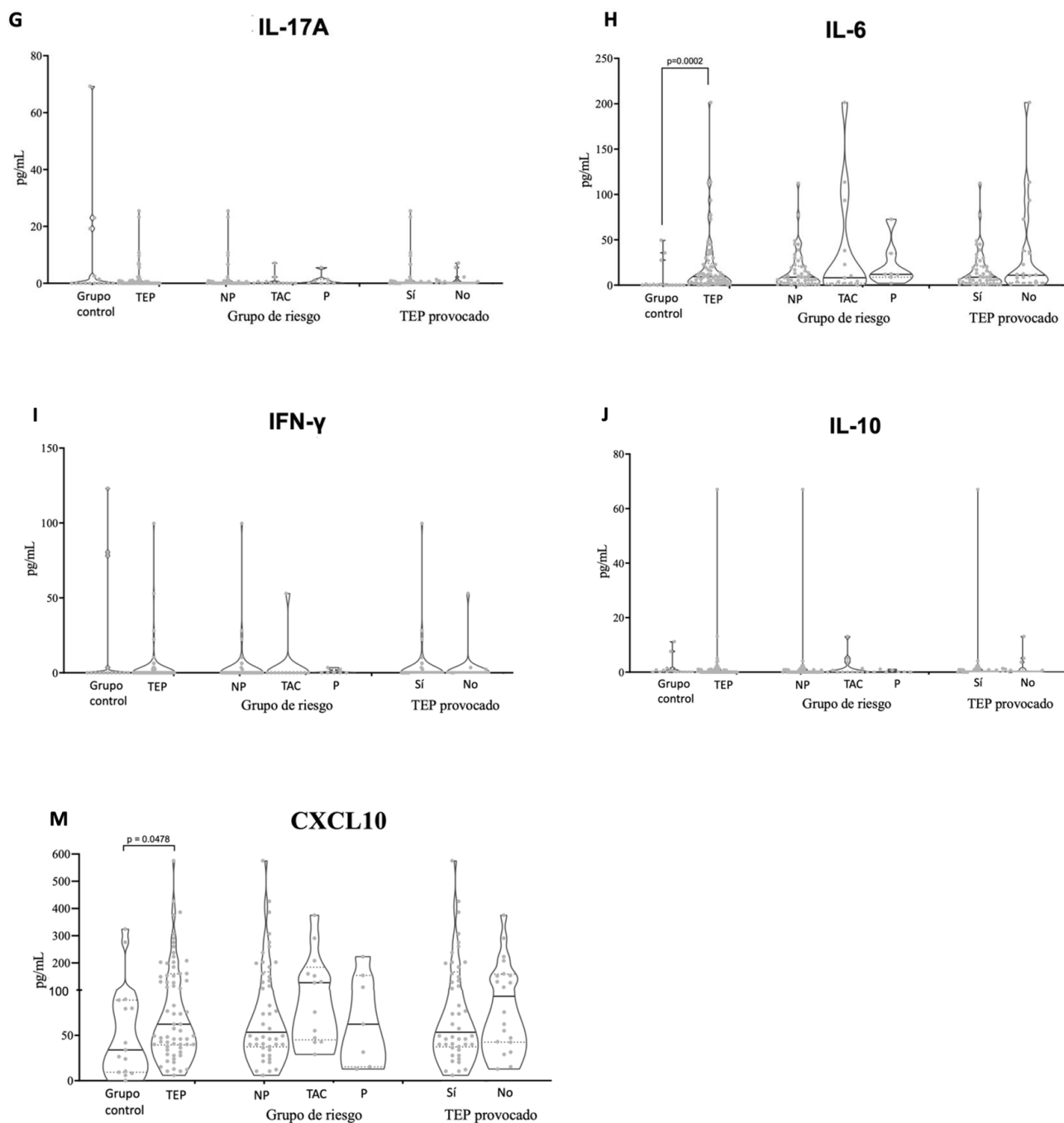
Comparaciones entre casos (pacientes con TEP) y controles: *p <0.05; †p <0.01; ‡p <0.001.

Abreviaturas: DS, desviación estándar; IFN, interferón; IL, interleucina; MCP, proteína quimioatrayente de monocitos; TGF, factor de crecimiento transformante; TNF, factor de necrosis tumoral.

Figura 14: Comparación de los valores de los marcadores inflamatorios entre controles sanos y pacientes con tromboembolia pulmonar, y entre pacientes con tromboembolia pulmonar según los factores de riesgo.

Comparaciones entre controles sanos y pacientes con TEP, y entre pacientes con TEP según los factores de riesgo trombóticos, para los siguientes marcadores inflamatorios: A) Interleucina (IL)-4; B) IL-2; C) IL-8; D) IL-1 β ; E) Factor de necrosis tumoral (TNF)- α ; F) proteína quimioatrayente de monocitos (MCP)-1; G) IL-17A; H) IL-6; I) IL-10; J) interferón (IFN)- γ ; K) IL-12p70; L) factor de crecimiento transformante (TGF)- β 1; M) ligando 10 de quimiocina con motivo C-X-C (CXCL)10.





Abreviaturas: CXCL10, ligando 10 de quimiocina con motivo C-X-C; IFN, interferón; IL, interleucina; MCP, proteína quimioatrayente de monocitos; NP, no provocada; TAC, trombosis asociada a cáncer; TEP, tromboembolia de pulmón; TGF, factor de crecimiento transformante; TNF, factor de necrosis tumoral.

Comparación de los niveles de marcadores inflamatorios en muestras de sangre entre pacientes con tromboembolia de pulmón según factores de riesgo de tromboembolismo venoso.

En el análisis de los marcadores inflamatorios en sangre, comparando los valores de los distintos biomarcadores entre los pacientes con TEP provocada (n=20) y pacientes con TEP no provocada (n=46), no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre grupos para ninguna de las determinaciones en sangre (**tabla 15 y figura 14**).

En cualquier caso, observamos sin diferencias estadísticamente significativas, pero clínicamente relevantes que: los pacientes con TEP no provocada presentaban valores más elevados de IL-4 (8,97 μ M vs 1,07 μ M; p=0,086) y de TNF- α (2,76 μ M vs. 0,72 μ M; p=0,120), pero inferiores de IL-6 (16,58 μ M vs. 32,79 μ M; p=0,187).

Además, al diferenciar a los pacientes con TEP asociada a cáncer, no encontramos diferencias estadísticamente significativas en los biomarcadores inflamatorios entre los tres grupos (TEP no provocada [n=46], TEP asociada a cáncer [n=13] y TEP provocada por factores de riesgo distintos al cáncer [n=7]) (**tabla 16 y figura 14**). En cualquier caso, nuevamente encontramos que los pacientes con trombosis asociada a cáncer presentaban valores superiores, si bien no estadísticamente significativos, de IL-6 (38,56 $\pm$ 61,27 μ M), en comparación con los pacientes con TEP no provocada (16,58 $\pm$ 21,68 μ M) y con los pacientes con TEP provocada por un factor de riesgo distinto al cáncer (22,07 $\pm$ 24,56 μ M).

Tabla 15: Marcadores inflamatorios comparando pacientes con tromboembolia pulmonar provocada frente a no provocada.

<i>Variable</i>	Casos totales	TEP no provocada	TEP provocada	p
Pacientes, N	66	46	20	
IL-4 ; pg/ml (DS)	6,58 (25,54)	8,97 (30,34)	1,07 (2,51)	0,086
IL-2 ; pg/ml (DS)	1,09 (4,88)	0,73 (2,54)	1,93 (8,08)	0,365
CXCL10 ; pg/ml (DS)	114,81 (115,43)	113,74 (123,28)	117,29 (97,85)	0,910
IL-1β ; pg/ml (DS)	1,36 (4,46)	1,36 (4,22)	1,37 (5,07)	0,991
TNF-α ; pg/ml (DS)	2,14 (6,99)	2,76 (8,22)	0,72 (1,99)	0,120
MCP-1 ; pg/ml (DS)	178,04 (179,79)	182,59 (196,14)	167,56 (138,91)	0,758
IL-17A ; pg/ml (DS)	1,67 (4,65)	2,01 (5,40)	0,91 (1,96)	0,381
IL-6 ; pg/ml (DS)	21,49 (33,91)	16,58 (21,68)	32,79 (51,25)	0,187
IL-10 ; pg/ml (DS)	1,75 (8,36)	1,96 (9,84)	1,28 (3,10)	0,767
IFN- γ ; pg/ml (DS)	3,60 (14,36)	3,89 (15,45)	2,94 (11,81)	0,807
IL-12p70 ; pg/ml (DS)	1,37 (8,04)	1,74 (9,56)	0,53 (1,92)	0,579
IL-8 ; pg/ml (DS)	3,02 (6,38)	3,16 (6,76)	2,70 (5,54)	0,787
TGF-β1 ; pg/ml (DS)	85,15 (199,51)	89,47 (225,19)	75,22 (126,19)	0,792

Comparaciones entre pacientes con TEP provocada y TEP no provocada: *p <0.05;

†p <0.01; ‡p <0.001.

Abreviaturas: CXCL10, ligando 10 de quimiocina con motivo C-X-C; DS, desviación estándar; IFN, interferón; IL, interleucina; MCP, proteína quimioatrayente de monocitos; TEP, tromboembolia de pulmón; TGF, factor de crecimiento transformante; TNF, factor de necrosis tumoral.

Se consideró TEP no provocada en ausencia de cáncer activo, inmovilidad reciente, cirugía, uso de estrógenos, embarazo, posparto o viajes de larga duración; Se consideró TEP provocada en presencia de inmovilidad reciente, cirugía, cáncer, uso de estrógenos, embarazo, posparto o viajes de larga duración.

Tabla 16: Marcadores inflamatorios en pacientes con tromboembolia pulmonar comparando por grupos según factores de riesgo (no provocada, asociada a cáncer, provocada).

Variable	Casos totales	TEP no provocada	TEP asociada a cáncer	TEP provocada	p
Pacientes, N	66	46	13	7	
IL-4; pg/ml (DS)	6,58 (25,54)	8,97 (30,34)	0,42 (1,05)	2,27 (3,89)	0,514
IL-2; pg/ml (DS)	1,09 (4,88)	0,73 (2,54)	2,83 (10,03)	0,25 (0,44)	0,356
CXCL10; pg/ml (DS)	114,81 (115,43)	113,74 (123,28)	133,57 (105,77)	87,06 (79,41)	0,693
IL-1 β ; pg/ml (DS)	1,36 (4,46)	1,36 (4,22)	1,72 (6,21)	0,72 (1,92)	0,895
TNF- α ; pg/ml (DS)	2,14 (6,99)	2,76 (8,22)	0,66 (2,38)	0,84 (1,11)	0,559
MCP-1; pg/ml (DS)	178,04 (179,79)	182,59 (196,14)	188,69 (154,85)	128,30 (101,92)	0,743
IL-17A; pg/ml (DS)	1,67 (4,65)	2,01 (5,40)	0,81 (2,00)	1,10 (2,03)	0,678
IL-6; pg/ml (DS)	21,49 (33,91)	16,58 (21,68)	38,56 (61,27)	22,07 (24,56)	0,118
IL-10; pg/ml (DS)	1,75 (8,36)	1,96 (9,84)	1,84 (3,76)	0,25 (0,44)	0,884
IFN- γ ; pg/ml (DS)	3,60 (14,36)	3,89 (15,45)	4,07 (14,69)	0,84 (1,47)	0,868
IL-12p70; pg/ml (DS)	1,37 (8,04)	1,74 (9,56)	0,73 (2,38)	0,16 (0,43)	0,849
IL-8; pg/ml (DS)	3,02 (6,38)	3,16 (6,76)	3,66 (6,72)	0,90 (0,97)	0,636
TGF- β 1; pg/ml (DS)	85,15 (199,51)	89,47 (225,19)	89,34 (133,43)	49,02 (116,55)	0,883

Comparaciones entre pacientes con TEP no provocada, TEP asociada a cáncer y TEP no provocada (ANOVA): *p <0.05; †p <0.01; ‡p <0.001.

Abreviaturas: CXCL10, ligando 10 de quimiocina con motivo C-X-C; DS, desviación estándar; IFN, interferón; IL, interleucina; MCP, proteína quimioatrayente de monocitos; TEP, tromboembolia de pulmón; TGF, factor de crecimiento transformante; TNF, factor de necrosis tumoral.

Se consideró TEP no provocada en ausencia de cáncer activo, inmovilidad reciente, cirugía, uso de estrógenos, embarazo, posparto o viajes de larga duración; El cáncer activo se definió como cáncer recién diagnosticado o en tratamiento antineoplásico de cualquier tipo (es decir, cirugía oncológica, quimioterapia, radioterapia, terapias hormonales, de apoyo o combinadas); Se consideró TEP provocada en presencia de inmovilidad reciente, cirugía, uso de estrógenos, embarazo, posparto o viajes de larga duración.

4.2.4. Objetivo secundario 3: Biomarcadores de coagulación en sujetos sanos y pacientes con TEP

En comparación con controles sanos, encontramos que los pacientes con TEP presentan valores más elevados de dímero D (2.901 ng/ml vs. 100 ng/ml; $p < 0,001$), del activador tisular del plasminógeno (tPA) (12.710 pg/ml vs. 4.967 pg/ml; $p < 0,001$) y del factor IX de la coagulación (2.759 pg/ml vs. 1.713 pg/ml; $p < 0,001$). También observamos que los pacientes con TEP aguda presentan una tendencia hacia valores más elevados del sCD40L (6.200 pg/ml vs. 3.197 pg/ml, $p = 0,069$) y de la P-selectina (2.206 pg/ml vs. 1.232 pg/ml; $p = 0,156$) ([tabla 17 y figura 9](#)).

Tabla 17: Marcadores de la coagulación comparando casos frente a controles.

Variable	Casos	Controles	p
Pacientes, N	66	15	
P-selectina ; pg/ml (DS)	2.206,36 (2.577,53)	1.232,55 (1.007,26)	0,156
Dímero D ; ng/ml (DS)	2.900,95 (5.513,27)	99,65 (48,90)	<0,001 [‡]
PSGL-1 ; pg/ml (DS)	1.444,79 (1.099,18)	1.934,24 (2.543,77)	0,477
tPA ; pg/ml (DS)	12.709,67 (7.374,29)	4.966,87 (2.449,37)	<0,001 [‡]
sCD40L ; pg/ml (DS)	6.199,64 (8.262,30)	3.196,55 (4.791,48)	0,069
PAI-1 ; ng/ml (DS)	503,18 (273,03)	538,56 (504,59)	0,796
Factor IX ; ng/ml (DS)	2.759,01 (942,10)	1.713,01 (1.047,76)	<0,001 [‡]

Comparaciones entre casos (pacientes con TEP) y controles: * $p < 0.05$; [†] $p < 0.01$; [‡] $p < 0.001$.

Abreviaturas: DS, desviación estándar; IL, interleucina; PAI-1, inhibidor del activador del plasminógeno-1; PSGL-1, ligando-1 de glicoproteína p-selectina; sCD40L, ligando CD40 soluble plaquetario; tPA, activador tisular del plasminógeno.

Comparación de los niveles de marcadores de la coagulación en muestras de sangre entre pacientes con tromboembolia de pulmón según factores de riesgo de tromboembolismo venoso.

En el análisis comparativo de los niveles de estos marcadores de la coagulación entre los pacientes con TEP aguda (N=66), de acuerdo con los factores de riesgo de ETEV (TEP no provocada; n=46 vs. TEP provocada; n=20), no encontramos diferencias (**tabla 18 y figura 15**).

Tabla 18: Marcadores de la coagulación comparando pacientes con tromboembolia pulmonar provocada frente a no provocada.

<i>Variable</i>	Casos totales	TEP no provocada	TEP provocada	p
Pacientes, N	66	46	20	
P-selectina ; pg/ml (DS)	2.206,36 (2.577,53)	2.159,57 (2.249,94)	2.314,00 (3.274,33)	0,825
Dímero D ; ng/ml (DS)	2.900,95 (5.513,27)	2.942,12 (5.880,06)	2.806,26 (4.699,44)	0,928
PSGL-1 ; pg/ml (DS)	1.444,79 (1.099,18)	1.374,60 (1.167,28)	1.606,25 (931,05)	0,436
tPA ; pg/ml (DS)	12.709,67 (7.374,29)	12.108,72 (5.808,26)	14.091,88 (10.161,27)	0,319
sCD40L ; pg/ml (DS)	6.199,64 (8.262,30)	6.017,28 (7.773,16)	6.619,05 (9.495,79)	0,788
PAI-1 ; ng/ml (DS)	503,179 (273,03)	459,682 (197,98)	197,981 (383,49)	0,126
Factor IX ; ng/ml (DS)	2.759,008 (942,10)	2.635,823 (908,55)	3.042,332 (979,84)	0,108

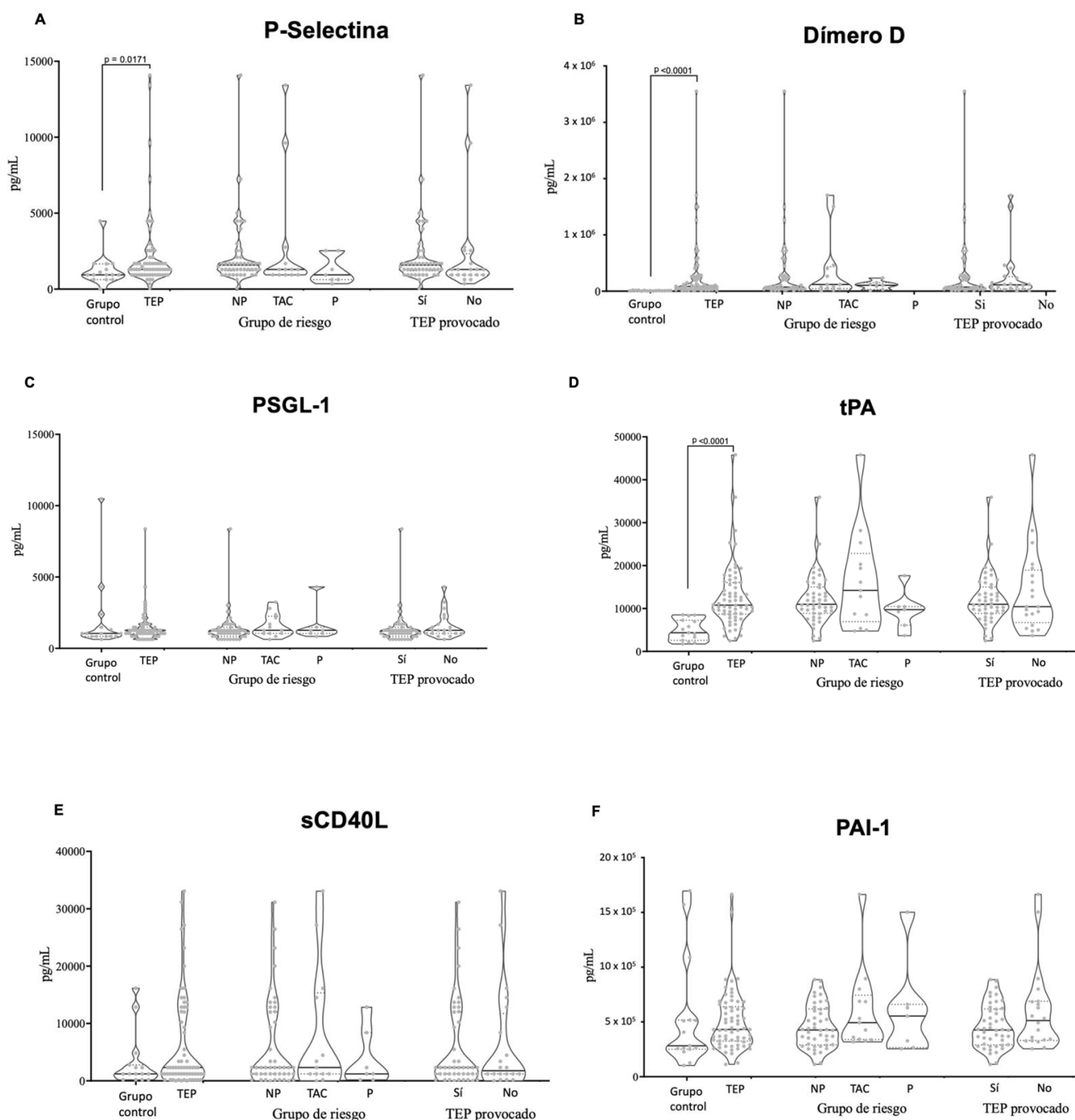
Comparaciones entre pacientes con TEP no provocada y TEP provocada: *p <0.05; †p <0.01; ‡p <0.001.

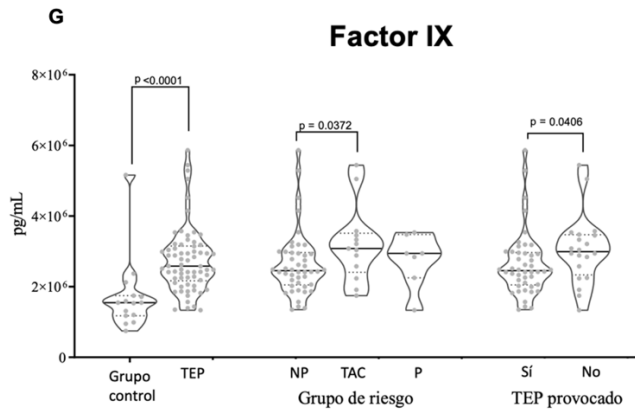
Abreviaturas: DS, desviación estándar; IL, interleucina; PAI-1, inhibidor del activador del plasminógeno-1; PSGL-1, ligando-1 de glicoproteína p-selectina; sCD40L, ligando CD40 soluble plaquetario; tPA, activador tisular del plasminógeno.

Se consideró TEP no provocada en ausencia de cáncer activo, inmovilidad reciente, cirugía, uso de estrógenos, embarazo, posparto o viajes de larga duración; Se consideró TEP provocada en presencia de inmovilidad reciente, cirugía, cáncer, uso de estrógenos, embarazo, posparto o viajes de larga duración.

Figura 15: Comparación de los valores de los marcadores de la coagulación entre controles sanos y pacientes con TEP, y entre pacientes con tromboembolia pulmonar según los factores de riesgo.

Comparaciones entre controles sanos y pacientes con TEP, y entre pacientes con TEP según los factores de riesgo trombóticos, para los siguientes marcadores coagulación: A) P-selectina; B) dímero D; C) ligando-1 de glicoproteína p-selectina; D) activador tisular del plasminógeno; E) ligando CD40 soluble plaquetario; F) inhibidor del activador del plasminógeno-1; G) factor IX de la coagulación.





Abreviaturas: NP, no provocada; PAI-1, inhibidor del activador del plasminógeno-1; PSGL-1, ligando-1 de glicoproteína p-selectina; sCD40L, ligando CD40 soluble plaquetario; TAC, trombosis asociada a cáncer; TEP, tromboembolia de pulmón; tPA, activador tisular del plasminógeno.

Adicionalmente, diferenciamos el subgrupo de pacientes cuya TEP aconteció en el contexto de un cáncer activo subyacente (N=13) del resto de pacientes con TEP provocada por otros factores de riesgo distintos al cáncer (N=7) ([tabla 19](#)); los pacientes con una TEP provocada presentan valores inferiores de tPA ($9.614,36 \pm 1.210,89$ pg/ml) en comparación con los pacientes con trombosis asociada a cáncer ($16.502,85 \pm 799,63$ pg/ml) y con los pacientes con TEP no provocada ($12.108,72 \pm 5.808,26$ pg/ml), aunque de forma no estadísticamente significativa ($p=0,081$).

Tabla 19: Marcadores de la coagulación en pacientes con tromboembolia pulmonar comparando por grupos según factores de riesgo (no provocada, asociada a cáncer, provocada).

<i>Variable</i>	Casos totales	TEP no provocada	TEP asociado a cáncer	TEP provocada	p
Pacientes; N	66	46	13	7	
P-selectina; pg/ml (DS)	2.206,36 (2.577,53)	2.159,57 (2.249,94)	2.874,62 (3.948,11)	1.272,86 (910,97)	0,411
Dímero D; ng/ml (DS)	2.900,95 (5.513,27)	2.942,12 (5.880,06)	3.741,47 (5.655,09)	1.069,42 (748,73)	0,591
PSGL-1; pg/ml (DS)	1.444,79 (1.099,18)	1.374,60 (1.167,28)	1.604,88 (799,63)	1.608,79 (1.210,89)	0,740
tPA; pg/ml (DS)	12.709,67 (7.374,29)	12.108,72 (5.808,26)	16.502,85 (11.662,43)	9.614,36 (4.353,64)	0,081
sCD40L; pg/ml (DS)	6.199,64 (8.262,30)	6.017,28 (7.773,16)	8.158,38 (11.106,03)	3.760,29 (4.353,64)	0,513
PAI-1; ng/ml (DS)	503,18 (273,03)	459,68 (197,98)	605,37 (372,80)	599,24 (433,27)	0,146
Factor IX; ng/ml (DS)	2.759,01 (942,10)	2.635,82 (908,55)	3.194,19 (1.076,35)	2.760,31 (761,89)	0,170

Comparaciones entre pacientes con TEP no provocada, TEP asociado a cáncer y TEP provocada (ANOVA): *p <0.05; †p <0.01; ‡p <0.001.

Abreviaturas: DS, desviación estándar; PAI-1, inhibidor del activador del plasminógeno-1; PSGL-1, ligando-1 de glicoproteína p-selectina; sCD40L, ligando CD40 soluble plaquetario; tPA, activador tisular del plasminógeno.

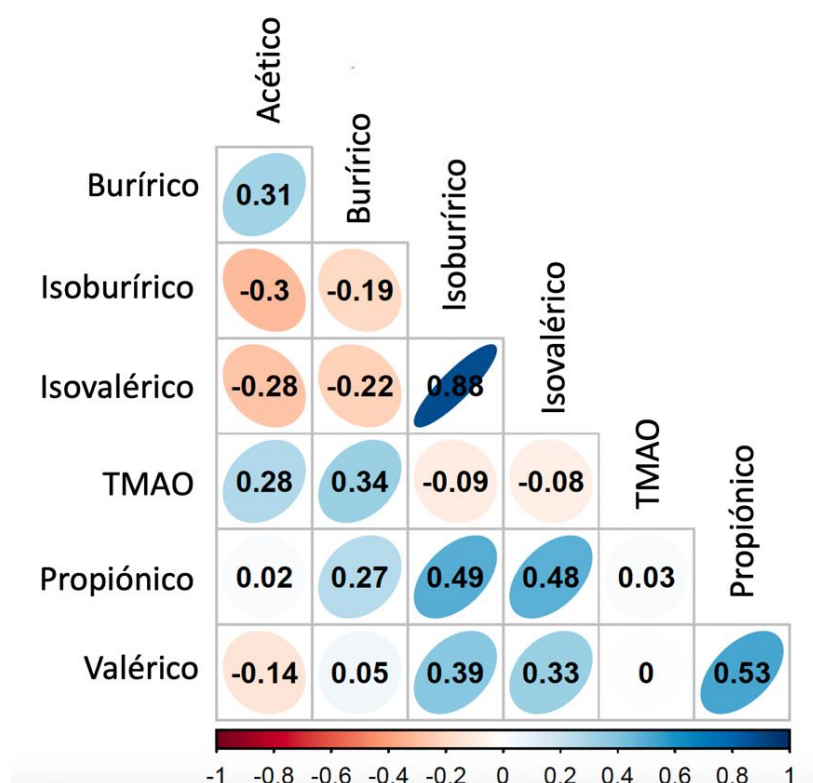
Se consideró TEP no provocada en ausencia de cáncer activo, inmovilidad reciente, cirugía, uso de estrógenos, embarazo, posparto o viajes de larga duración; El cáncer activo se definió como cáncer recién diagnosticado o en tratamiento antineoplásico de cualquier tipo (es decir, cirugía oncológica, quimioterapia, radioterapia, terapias hormonales, de apoyo o combinadas); Se consideró TEP provocada en presencia de inmovilidad reciente, cirugía, uso de estrógenos, embarazo, posparto o viajes de larga duración.

4.2.5. Objetivo secundario 4: Correlación e Integración de los metabolitos derivados del microbioma con los parámetros inflamatorios y de la coagulación

Correlación de los metabolitos derivados del microbioma

De acuerdo con los resultados anteriores, en el análisis de correlación de los distintos metabolitos derivados del microbioma entre sí, encontramos una correlación alta entre los valores de isovalérico e isobutírico ($r = 0,88$). Así mismo, encontramos una correlación moderada entre los valores de propiónico con los valores de valérico ($r = 0,53$), isobutírico ($r = 0,49$) e isovalérico ($r = 0,48$). Por el contrario, la correlación entre TMAO y ácido acético fue baja ($r = 0,28$) (figura 16).

Figura 16: Grado de correlación de los metabolitos derivados del microbioma

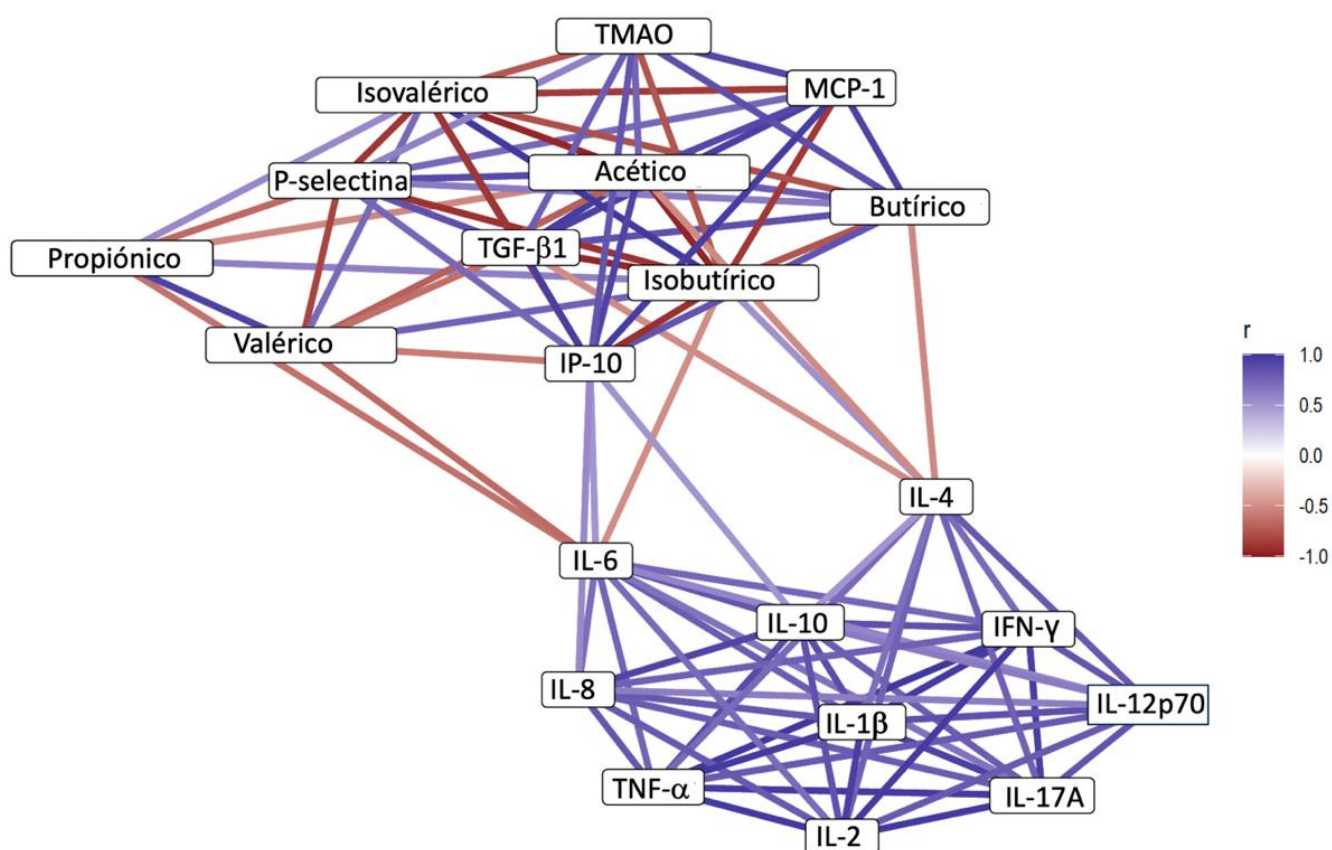


Abreviaturas: TMAO, N-óxido trimetilamina.

Correlación de los metabolitos del microbioma con parámetros inflamatorios

En el análisis de correlación, encontramos que varios de los parámetros inflamatorios presentan una correlación positiva con los valores del ácido acético y del ácido butírico, y una correlación negativa con los valores de isobutírico e isovalérico, especialmente TGF- β , MCP-1, IP-10 y p-selectina; por el contrario, la mayoría de las interleucinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70), el IFN gamma y el TNF- α no se correlacionan significativamente con ninguno de los metabolitos derivados del microbioma (**figura 17**).

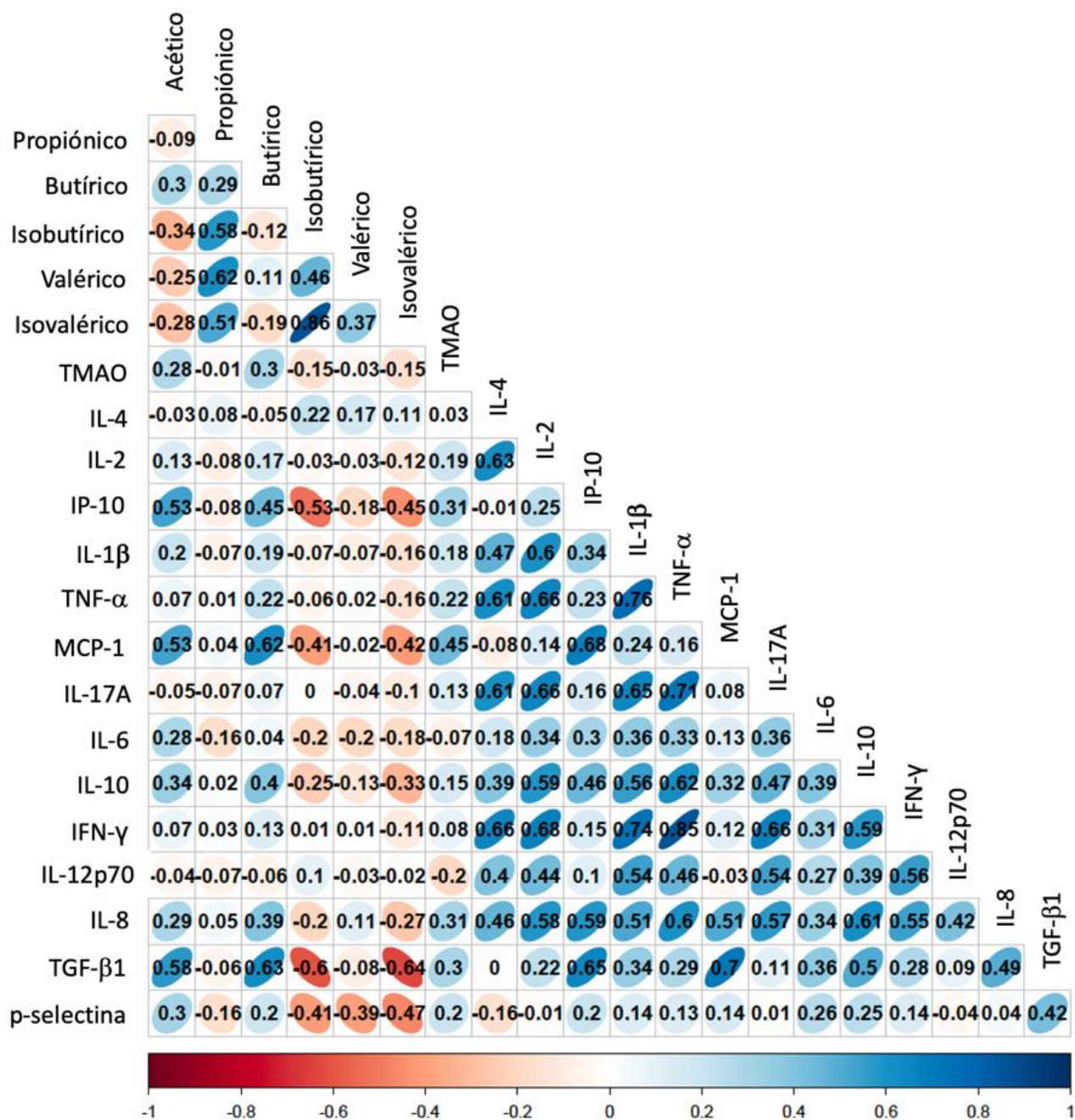
Figura 17: Análisis en red de la correlación de los metabolitos derivados del microbioma con los parámetros inflamatorios.



Abreviaturas: IFN, interferón; IL, interleucina; MCP, proteína quimioatrayente de monocitos; TGF, factor de crecimiento transformante; TMAO, N-óxido trimetilamina; TNF, factor de necrosis tumoral.

Entre ellos, destaca la correlación del TGF- β con el isovalérico ($r = -0,64$), con el butírico ($r = 0,63$), con el isobutírico ($r = -0,6$) y con el acético ($r = 0,53$); del MCP-1 con el butírico ($r = 0,62$) y el acético ($r = 0,53$); y del IP-10 con el acético ($r = 0,53$) y el isobutírico ($r = -0,53$) (figura 18).

Figura 18: Correlación de los metabolitos derivados del microbioma con los parámetros de inflamación.

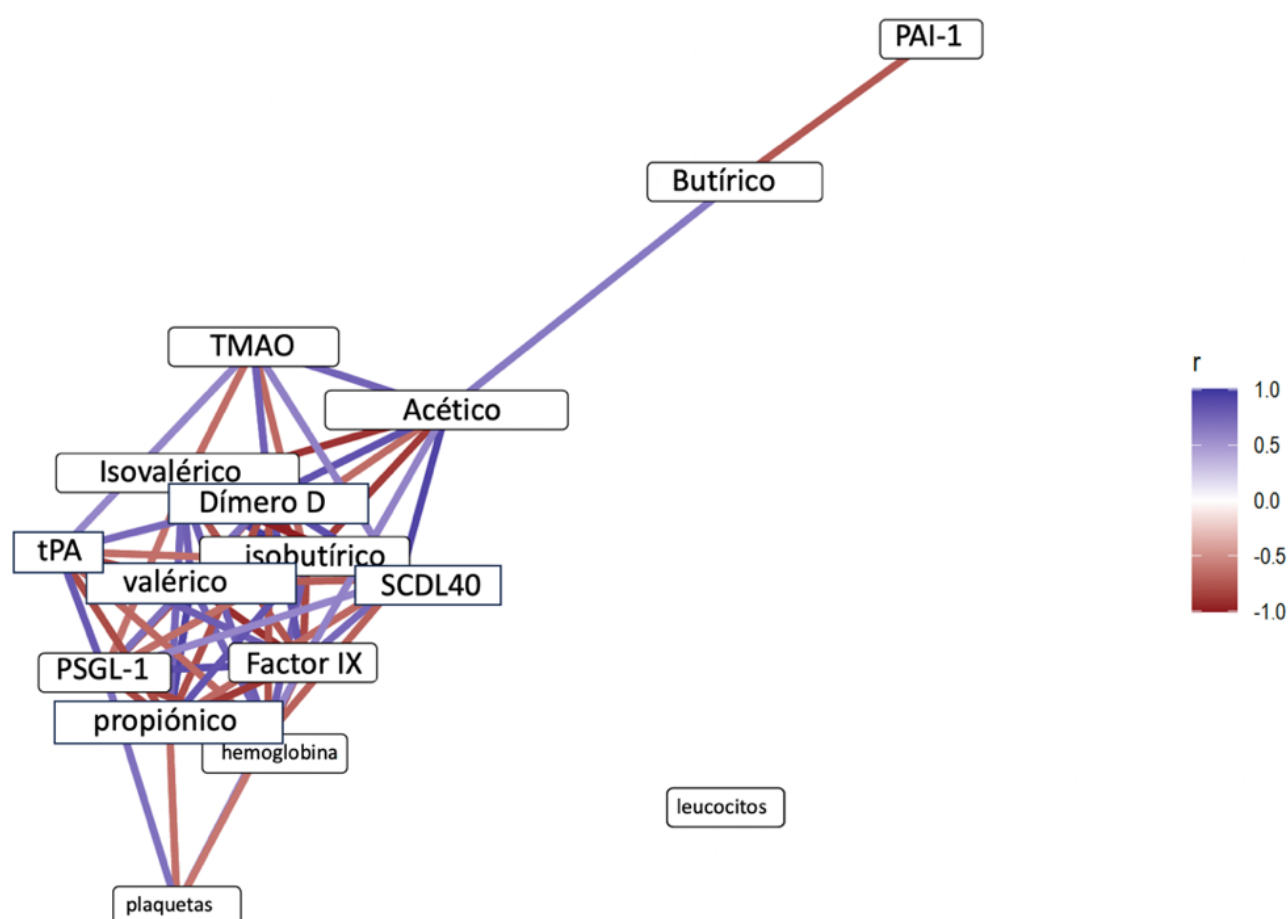


Abreviaturas: IFN, interferón; IL, interleucina; MCP, proteína quimioatrayente de monocitos; TGF, factor de crecimiento transformante; TMAO, N-óxido trimetilamina; TNF, factor de necrosis tumoral.

Correlación de los metabolitos del microbioma con parámetros de la coagulación

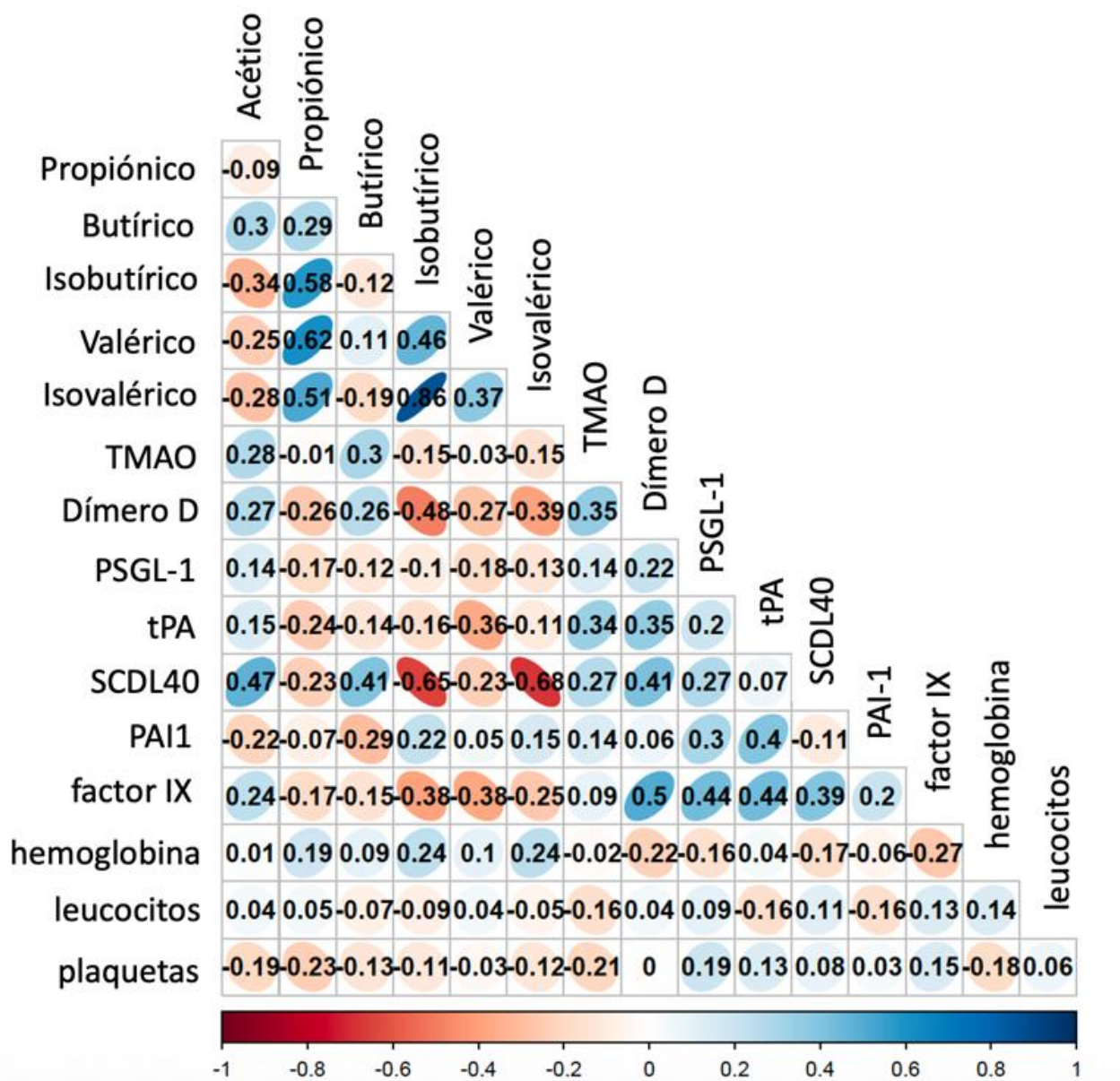
Identificamos una baja correlación entre los valores de los metabolitos derivados del microbioma y los biomarcadores de la coagulación, a excepción del isobutírico que se correlaciona negativamente con el valor de dímero D ($r = -0,48$) y de SCDL40 ($r = -0,65$). El valor de SCDL40 también se correlacionó negativamente con el valor de isoaléico ($r = -0,68$) y positivamente con los valores de acético ($r = 0,47$) (**figuras 19 y 20**).

Figura 19: Análisis en red de la correlación de los metabolitos derivados del microbioma con los parámetros de la coagulación.



Abreviaturas: PAI-1, inhibidor del activador del plasminógeno-1; PSGL-1, ligando-1 de glicoproteína p-selectina; sCD40L, ligando CD40 soluble plaquetario; TMAO, N-óxido trimetilamina; tPA, activador tisular del plasminógeno.

Figura 20: Correlación de los metabolitos derivados del microbioma con los parámetros de la coagulación.



Abreviaturas: PAI-1, inhibidor del activador del plasminógeno-1; PSGL-1, ligando-1 de glicoproteína p-selectina; sCD40L, ligando CD40 soluble plaquetario; TMAO, N-óxido trimetilamina; tPA, activador tisular del plasminógeno.

DISCUSIÓN:

5. DISCUSIÓN:

5.1. Valoración de los resultados del estudio

Hasta la fecha y en nuestro conocimiento, este es el primer estudio que explora el potencial papel del microbioma en la embolia de pulmón y las diferencias que pueden existir según los factores de riesgo que han contribuido en la etiopatogenia de la TEP.

En nuestro estudio, los pacientes con TEP aguda presentan diferencias significativas en los metabolitos derivados del microbioma, en comparación con sujetos sanos, caracterizadas por mayores niveles sanguíneos de TMAO y ácido acético y menores concentraciones de los ácidos propiónico, isobutírico y valérico.

Además, entre los pacientes con TEP, observamos diferencias en las concentraciones de los metabolitos derivados del microbioma según sus factores de riesgo etiológicos. Los pacientes con TEP no provocada (o idiopática) presentan valores más elevados de ácido acético y TMAO que los pacientes que presentan una TEP provocada por factores de riesgo distintos al cáncer.

Adicionalmente, en la línea de trabajos de investigación previos que han evaluado las diferencias en los metabolitos derivados del microbioma y su papel modulador en la carcinogénesis en los pacientes con cáncer, en nuestro trabajo encontramos que los pacientes con trombosis asociada a cáncer presentan característicamente valores de ácido acético significativamente más elevados, lo que plantea la hipótesis de su potencial utilidad como marcador de neoplasia en este escenario de trombosis.

5.1.1. Pacientes con tromboembolia de pulmón vs. controles sanos

5.1.1.1. Papel de los metabolitos derivados del microbioma

En el análisis funcional del microbioma, los pacientes diagnosticados de una TEP aguda presentan un perfil metabolómico diferente respecto a los controles sanos, fundamentalmente diferenciado por valores superiores de TMAO y de ácido acético, e inferiores de ácido propiónico, ácido isobutírico y ácido valérico. Entre los distintos biomarcadores derivados del microbioma, el ácido valérico fue el metabolito que mostró que mejor discrimina a los pacientes que presentan una TEP, respecto a controles sanos. Así, como ya se ha observado en otras enfermedades cardiovasculares, los metabolitos derivados del microbioma podrían estar implicados en la TEP.

Estos hallazgos son novedosos en el estudio de la TEP, ya que apenas existen estudios hasta la fecha que hayan evaluado estas diferencias en el perfil de los metabolitos derivados del microbioma en pacientes con TEP con respecto a controles sanos. Sin embargo, sí ha sido más ampliamente estudiado el papel del microbioma y sus metabolitos funcionales, principalmente el TMAO, en otras enfermedades cardiovasculares.

Muy recientemente se ha publicado un pequeño estudio que ha evaluado las diferencias en la microbiota intestinal y de los metabolitos séricos entre 8 pacientes con ETV (TVP y/o TEP) confirmada y 7 controles sanos. Para el estudio de la microbiota intestinal, se recogieron muestras fecales de pacientes con ETV y controles, realizando la secuenciación de los perfiles del 16S ARNr para identificar la diferencias taxonómicas en la microbiota intestinal. Los autores observaron que los pacientes con ETV presentaron alteraciones en el microbioma, caracterizadas por un sobrecrecimiento de la microbiota intestinal, enriquecida de *Blautia*, *Roseburia*, *Coprococcus* y *Ruminococcus*.⁸⁴ Estas bacterias se han relacionado anteriormente con un estado proinflamatorio y pro-trombótico, y se han asociado con distintas enfermedades como la diabetes tipo 2 o la enfermedad inflamatoria intestinal.²⁰⁴⁻²⁰⁷ En cuanto a los metabolitos derivados del microbioma analizados en muestras de sangre, encontraron valores de colina sérica y ácido litocólico en

el grupo de pacientes con ETV.⁸⁴ A diferencia de nuestro trabajo, no se incluyeron en el análisis otros metabolitos como el TMAO o el ácido acético, sobre los que disponemos de más bibliografía que apoya su papel tanto en la trombosis como en el desarrollo de distintas enfermedades cardiovasculares.^{112,208}

En cuanto al TMAO, apenas existen datos sobre el papel de la TMAO en la TEP aguda y ninguno que compare los niveles de TMAO en pacientes con ETV o TEP frente a controles sanos. Tal y como avanzado en la introducción, ya se ha estudiado ampliamente la relación del TMAO con el desarrollo de eventos cardiovasculares. Como sucede en nuestro trabajo, valores más elevados de TMAO han sido relacionados de forma consistente con la presencia y aparición de distintas enfermedades cardiovasculares, como la cardiopatía isquémica.^{8,142,209} Si bien apenas existen estudios enfocados en TEP, tenemos más evidencias de su relación con la fisiopatología de la TEP de forma indirecta, tanto por su rol en distintos mecanismos patogénicos subyacentes de la ETV, como por su asociación con otras enfermedades cardiovasculares distintas a la TEP.

Se ha reportado que el TMAO incrementa la actividad plaquetaria y el riesgo de trombosis en estudios in vitro y en humanos.²¹⁰ La TMAO parece modular la movilización plaquetaria dependiente de calcio, lo que incrementa la respuesta plaquetaria y la activación de monocitos y macrófagos.²¹¹ En una cohorte de sujetos sanos, se evidenció una asociación dosis-dependiente entre los niveles de TMAO en plasma y la agregación plaquetaria.²¹⁰ Este efecto desfavorable sobre la agregación plaquetaria explicaría su impacto en el mayor riesgo de aterosclerosis. Además, el TMAO incrementa la captación de colesterol por los macrófagos, lo que lleva a la formación de células espumosas, y la activación de monocitos/macrófagos, favoreciendo el desarrollo de lesiones ateroscleróticas.¹⁴⁰

En nuestro estudio no encontramos una correlación significativa entre los valores de TMAO y las cifras de plaquetas en el momento del diagnóstico del evento tromboembólico venoso, lo que no nos permite confirmar este papel del TMAO en la actividad plaquetaria para el desarrollo de ETV. Tampoco encontramos ningún grado de correlación de los leucocitos con los distintos metabolitos derivados del microbioma analizados. Sin embargo, tantos los monocitos como las plaquetas

han demostrado estar implicados en el inicio y la amplificación de los eventos tromboembólicos venosos. En el desarrollo de la trombosis venosa, los monocitos y los neutrófilos son los leucocitos principales adheridos a las paredes de la venas; similarmente, las plaquetas se adhieren al endotelio vascular favoreciendo el reclutamiento neutrofílico y la formación de NETs, implicados en la trombogénesis venosa y en la activación plaquetaria.²¹² De hecho, los tratamientos antiplaquetarios como el ácido acetilsalicílico, se han empleado como estrategia para reducir el riesgo de ETV, fundamentalmente en la prevención secundaria.²¹³ En cualquier caso, su eficacia antitrombótica es inferior a la de los anticoagulantes.²¹⁴

Más allá de su papel en los mecanismos etiopatogénicos de la ETV, un metaanálisis reciente demostró que también existe una asociación positiva dosis-dependiente entre los niveles plasmáticos de TMAO y un incremento tanto del riesgo cardiovascular como de la mortalidad.²¹⁵

Algunos trabajos han evaluado los ecosistemas microbiológicos a nivel intestinal en pacientes con IAM, observando situaciones de disbiosis en estos escenarios.^{216,217} Además, se ha empezado a estudiar el papel de los metabolitos derivados del microbioma como biomarcadores en estas enfermedades cardiovasculares. Un estudio prospectivo reciente evidenció las alteraciones del microbioma en los pacientes con IAM.¹⁹⁸ Los autores identificaron que los valores de TMAO y ácido acético eran superiores en los pacientes con IAM, en comparación con controles sanos. Además, los valores de propiónico también resultaron inferiores en los pacientes con IAM. Estos hallazgos son coincidentes con nuestros resultados, en el caso del estudio MICTEP comparando a sujetos con TEP con controles sanos.

En otra cohorte de más de 4.000 individuos remitidos para realización de una coronariografía electiva en situación de estabilidad, y que fueron seguidos durante 3 años, se observó una relación dosis-dependiente entre los niveles plasmáticos de TMAO y la incidencia acumulada de eventos cardiovasculares, definidos como infartos de miocardio e infartos cerebrales.¹⁴³ Este riesgo aumentado se mantenía incluso después de ajustarse por distintos factores de riesgo clásicos.^{143,209}

Aunque la mayoría de la evidencia bibliográfica actual se sustenta sobre el impacto de los metabolitos derivados del microbioma en la trombosis arterial, fundamentalmente en el IAM, estos resultados también tienen trascendencia en la TEP, no sólo por tratarse de otra de las enfermedades cardiovasculares principales, sino porque es conocida la estrecha interrelación entre la TEP y el IAM. La existencia de una asociación entre la aterotrombosis y la ETV fue sugerida inicialmente por Prandoni *et al.*, cuando los autores observaron que la presencia de placas de ateroma en las arterias carótidas se asociaba con el doble de riesgo de presentar ETV.²¹⁸ Estos resultados fueron refrendados en ulteriores trabajos que confirmaron el riesgo aumentado de ETV entre los pacientes con historia de cardiopatía isquémica. Por lo tanto, el IAM es considerado un factor de riesgo de presentar complicaciones tromboembólicas venosas.^{219,220} De hecho, ambas enfermedades cardiovasculares comparten una gran cantidad de factores de riesgo y algunos elementos de la fisiopatología son comunes entre la trombosis venosa originaria de la TEP y la aterotrombosis del IAM.²¹⁹ Entre los factores de riesgo compartidos, destacan distintas alteraciones metabólicas, como la obesidad, la diabetes o la dislipemia, entre otras, que son importantes factores de riesgo comunes reconocidos en las dos entidades.^{221,222} De este modo, se sugiere la posibilidad de realizar también determinadas inferencias en los resultados disponibles en la bibliografía sobre el papel del microbioma en la trombosis arterial y su potencial relación con el desarrollo de ETV, incluyendo la TEP.

En este punto, la dieta, que se ha explicado que es crítica para la correcta funcionalidad del microbioma, es uno de los elementos que mejor correlacionan el papel del microbioma en la génesis de la ETV y el IAM mediado por la dieta. Dietas ricas en frutas, verduras y pescado se han asociado con un menor riesgo de ETV, lo que podría explicarse por el impacto de los metabolitos del microbioma en la génesis de la trombosis.²²³ El microbioma se ve afectado por la dieta, pero también está vinculado con el metabolismo de los alimentos influyendo en cómo se procesan y absorben los nutrientes, como el colesterol y la glucosa, habiéndose relacionado con distintos factores metabólicos de riesgo cardiovascular.

En nuestro estudio, en el que hemos analizado únicamente metabolitos derivados exclusivamente del microbioma y relacionados con la dieta, obtenemos resultados que evidencian niveles plasmáticos de TMAO significativamente superiores en los

pacientes con ETV con respecto a controles sanos, que se podrían explicar por el propio papel del TMAO en la génesis trombótica. Sin embargo, el diseño de nuestro estudio no permite descartar que esta elevación de TMAO sea consecuencia del propio proceso trombótico, ni tampoco que sea debido a diferencias significativas en la dieta de los pacientes con TEP en comparación con los sujetos sanos.

En cualquier caso, estos hallazgos apoyarían la plausibilidad biológica para la existencia de una nueva diana farmacológica en la prevención de la ETV. Estas diferencias entre pacientes y controles necesitan ser validadas en otras cohortes, con estudios diseñados con este objetivo y, adicionalmente, buscando estrategias de segunda etapa que modulen o bloqueen la producción de estos metabolitos bacterianos para controlar la inflamación asociada a la TEP. De hecho, ya hay datos sobre la utilidad de la administración de inhibidores de la TMAO, sin modificar el microbioma propiamente, en modelos animales. Así, se ha demostrado que esta intervención farmacológica logra bloquear el mecanismo trombogénico relacionado con la TMAO e inducido por la dieta, lo que apoyaría la utilidad de esta vía farmacológica en la prevención de riesgo cardiovascular.¹⁵¹

Más allá de su papel en la etiopatogenia, un estudio multicéntrico realizado en Suiza en el que se recogieron 859 pacientes ancianos (≥ 65 años) con ETV aguda, que fueron seguidos durante una media de 28 meses, se evaluó la relación entre los niveles plasmáticos de la TMAO al diagnóstico (agrupados en tres categorías -bajo, intermedio y alto-), y la aparición de complicaciones durante el seguimiento. Las variables principales del estudio analizadas fueron, por lo tanto, la recurrencia tromboembólica venosa, los sangrados y la mortalidad. Este estudio falló en demostrar la existencia de cualquier asociación de los niveles de TMAO con las recurrencias trombóticas, o con la aparición de hemorragias; sin embargo, el estudio demostró una asociación entre los niveles de TMAO y la mortalidad durante el seguimiento; los pacientes con niveles intermedios de TMAO presentaron una menor mortalidad que los pacientes con niveles de TMAO bajos (*hazard ratio* [HR] ajustado: 0,68; IC95%, 0,47-0,98, $p=0,0039$) demostrándose una asociación en forma de U, hasta ahora desconocida, entre los niveles de TMAO y la mortalidad durante el seguimiento en la ETV (p ajustada=0,045).²⁰⁸

Como los niveles de TMAO dependen de distintos elementos exógenos, estos resultados sugieren el potencial impacto de las infecciones concomitantes, la dieta y el uso de antibióticos en la mortalidad tras una TEP. En cualquier caso, estos resultados requieren de ensayos clínicos que evalúen los verdaderos efectos de la modificación de los niveles de TMAO en términos de eficacia y de seguridad. El análisis del papel del microbioma en el pronóstico de la TEP no fue uno de los objetivos de nuestro estudio. Aunque nuestra cohorte también fue seguida durante una media de 26 meses, nuestro estudio presenta la limitación tanto del tamaño muestral como del bajo número de eventos durante el seguimiento. Esto supone una baja potencia estadística del estudio para evaluar el papel pronóstico del metaboloma, tanto de la TMAO como del resto de metabolitos funcionales del microbioma. Por lo tanto, son necesarios nuevos estudios con mayor tamaño muestral y dirigidos a este análisis para evaluar adecuadamente esta cuestión.

5.1.1.2. Papel de los biomarcadores inflamatorios

Más allá del análisis funcional del microbioma, en la evaluación de la relación de distintos parámetros inflamatorios con la TEP, encontramos que los pacientes que sufren una TEP presentaron valores inferiores en la mayoría de los biomarcadores inflamatorios (i.e., IL-4, IL-2, IL-17-A, IL-8, TNF- α e IFN- γ) a excepción de la IL-6 que fue significativamente superior en los pacientes con TEP aguda en comparación con los controles sanos.

Estos resultados son similares a los observados en estudios básicos previos realizados en pacientes con TEP. Un trabajo previo que analizaba la expresión genética de distintos marcadores inflamatorios en sangre periférica observó una menor expresión de distintas interleucinas (e.g., IL-2, IL-20) e IFN- γ en pacientes con TEP respecto a controles sanos.²²⁴ Sin embargo, otros trabajos han reportado una elevación significativa de distintas citocinas inflamatorias en pacientes con ETV.²²⁵ Esta situación proinflamatoria asociada a la TEP ha sido explicada con modelos animales de ETV, en la que se ha comprobado que se produce una infiltración leucocitaria precoz en la pared del vaso, con una infiltración monocitaria

y linfocitaria posteriores.²²⁶ En cualquier caso, existe poca bibliografía actualmente, y con resultados heterogéneos, que evalúen el papel diagnóstico de las interleucinas y otros marcadores inflamatorios en la ETV.²²⁵

La IL-6 incrementa la producción de factor tisular, la transcripción de factor VIII y la producción de fibrinógeno.²²⁷ Esto podría explicar nuestra observación de valores de IL-6 superiores en los pacientes con TEP, respecto a los controles. Sin embargo, existen resultados contradictorios sobre los niveles de IL-6 en el momento del diagnóstico de TVP y TEP.^{228,229}

Aún no se conoce completamente la relación entre inflamación y ETV.²³⁰ La respuesta inflamatoria en la ETV puede ser potencialmente tanto la causa como la consecuencia de la propia trombosis. El papel de la inflamación en la patogénesis de la ETV se ha basado sobre todo en la observación de un aumento de riesgo tromboembólico venoso en los pacientes con determinadas enfermedades inflamatorias, como la enfermedad inflamatoria intestinal y las vasculitis sistémicas.²³¹⁻²³³ En un estudio prospectivo observacional realizado por nuestro grupo en pacientes ingresados por infección COVID-19, la PCR elevada se asoció con una mayor incidencia de TEP.²³⁴ Por otro lado, la disbiosis podría contribuir a un estado de inflamación crónica en el organismo, que podría contribuir al desarrollo de enfermedades cardiovasculares, como sucede en la aterosclerosis. Además, las citocinas inflamatorias podrían favorecer el desarrollo de eventos trombóticos influyendo en la expresión de factor tisular.²³⁵

A pesar de lo anterior, en nuestro estudio identificamos una menor respuesta inflamatoria evaluada por estos biomarcadores inflamatorios en los pacientes con TEP. Esto podría ser explicado parcialmente por el papel que ejercen los AGCC en la menor producción de distintas citocinas inflamatorias a través de su inhibición del factor nuclear kappa B.^{129,130}

En un trabajo previo de Marchena *et al.*, los autores observaron una elevación de IL-6 e IL-8 en menos del 10% de los pacientes con TEP. Este subgrupo de pacientes con biomarcadores inflamatorios elevados presentó una peor supervivencia.⁷⁷ Otros trabajos apoyarían la posible utilidad de los marcadores de

inflamación en la ETV en aras de identificar a pacientes con mayor riesgo de desarrollar eventos adversos; e incluso se han propuesto terapias antiinflamatorias para el manejo de la TEP aguda con disfunción del ventrículo derecho, por el potencial efecto beneficioso de los mismos sobre el ventrículo derecho.^{76,236}

Por lo tanto, la principal aplicabilidad de estos marcadores inflamatorios en la TEP podría ser pronóstica, no quedando aclarada su utilidad para la diferenciación de pacientes con TEP respecto a controles sanos y, en consecuencia, para su diagnóstico. De hecho, las guías de práctica clínica actuales no establecen el empleo de marcadores de inflamación ni reactantes de fase aguda en la valoración diagnóstica de sospecha de TEP.^{9,31}

Por otro lado, los metabolitos derivados del microbioma están involucrados en la modulación de la inflamación y también han sido relacionados con algunos trastornos de la coagulación, por lo que planteamos analizar la posible correlación en los niveles de estos marcadores del microbioma (TMAO, acético, butírico, etc) y los distintos biomarcadores inflamatorios. En nuestro trabajo, encontramos que los niveles de acético y de butírico se relacionan de forma directamente proporcional con valores plasmáticos más elevados de algunas moléculas proinflamatorias. Estos hallazgos podrían ser explicados como la consecuencia de la alteración de la composición taxonómica de la microbiota intestinal que condiciona un estado proinflamatorio local y sistémico, desencadenado por la mayor permeabilidad intestinal y la liberación de sustancias inflamatorias a la circulación sanguínea.¹³¹ Por otro lado, esta correlación también podría ser explicada en sentido inverso, ya que el propio estado inflamatorio se asocia tanto con el desarrollo de disbiosis, como con un aumento de la permeabilidad intestinal y la producción de distintos metabolitos específicos.¹⁰⁰ Por otro lado, resulta destacable que no encontramos ninguna correlación del microbioma con ninguna de las interleucinas investigadas.

Se debe seguir investigando el papel de la inflamación en las situaciones de disbiosis para conocer mejor sus vías patogénicas y el potencial impacto de estrategias terapéuticas contra la respuesta inflamatoria, antes y después de la

TEP, ya que la implicación de la microbiota intestinal en la homeostasis global humana parece evidente.

5.1.1.3. Papel de los biomarcadores de la coagulación

El notable papel de la hipercoagulabilidad en la patogénesis de la ETV está mucho más establecido. Así, el riesgo de ETV se ha asociado de forma consistente a la presencia de alteraciones en la coagulación. Este es el caso de los pacientes con trombofilias, hereditarias o adquiridas, que presentan un riesgo aumentado de ETV con respecto a la población general.³⁵

En el análisis de los biomarcadores de la coagulación, como era esperable, los pacientes que padecen una TEP aguda presentaron diferencias significativas en algunos de los factores de la coagulación en comparación con los sujetos sanos analizados, incluyendo valores más elevados de dímero D, del tPA y del factor IX de la coagulación. En cuanto a los valores del sCD40L, los valores medios fueron más altos en los pacientes con TEP, al límite de la significación estadística.

Sin embargo, en nuestro trabajo encontramos una escasa correlación entre las determinaciones de los distintos metabolitos derivados del microbioma y los parámetros de la coagulación.

5.1.2. Papel de los metabolitos del microbioma en la identificación de factores de riesgo subyacentes

En nuestra población, la mayoría de los pacientes (69,8%) presentaron el episodio tromboembólico venoso sin identificarse ningún factor de riesgo transitorio, como se ha descrito en la mayoría de las series.^{190,192,237,238} Además, entre el resto de los pacientes en los que sí identificamos un factor de riesgo asociado, en la mayoría de ellos el factor de riesgo fue el cáncer.

Nuestra hipótesis inicial planteaba que en determinados pacientes que presentaran una TEP aguda sin factores de riesgo transitorios asociados, lo que

clásicamente era clasificado como TEP idiopática, podría existir un trastorno en la homeostasis de la microbiota y del microbioma, predisponente para la génesis del evento cardiovascular. De acuerdo con nuestros resultados, los valores de acético se asocian con los factores de riesgo de TEP, de manera que los pacientes que presentan un evento idiopático tienen valores más elevados de este biomarcador que aquéllos en los que identificamos factores de riesgo, pero distintos al cáncer. De forma similar, encontramos niveles de TMAO más elevados con más probabilidad en los pacientes con una TEP idiopática. Además, observamos que el ácido acético podría ser un buen marcador de trombosis asociada a cáncer, ya que encontramos una asociación entre el ácido acético y la presencia de cáncer, según la cual los niveles de ácido acético más elevados aumentan la probabilidad de presentar un cáncer subyacente en el contexto de la propia TEP.

Nuestro trabajo apoya la hipótesis planteada, según la cual los pacientes que presentan una TEP idiopática podrían presentar diferencias en el microbioma y sus metabolitos funcionales que faciliten el desarrollo del evento trombótico, relacionado fundamentalmente con un aumento de los niveles de ácido acético y TMAO. La producción de estos dos metabolitos derivados del microbioma aumenta en situaciones de disbiosis, derivados del metabolismo de la fosfatidilcolina, la colina y la carnitina.¹³¹ Por lo tanto, la disbiosis se nos presenta como un potencial mecanismo etiopatogénico en el desarrollo de ETV.

En cuanto a la trombosis asociada a un cáncer activo, es bien reconocido que esta es una situación particularmente pro-trombótica desde que Jean Baptiste Bouillaud (en 1823) y Armand Trousseau (en 1865) describieron por primera vez esta asociación.^{239,240} Así, los pacientes con cáncer presentan un riesgo de 4 a 7 veces aumentado de presentar ETEV, siendo los cánceres sólidos de localización pancreática, cerebral, pulmonar y gástrica, los que presentan un mayor riesgo de ETEV, especialmente cuando se presentan con metástasis a distancia.²⁴⁰ De hecho, según distintas series, el cáncer está presente en hasta el 17-30% de los pacientes diagnosticados actualmente de una ETEV, y con una incidencia que ha seguido aumentando en los últimos años.

Distintos trabajos y revisiones sistemáticas han analizado los mecanismos oncogénicos en los que el microbioma tiene impacto.^{241,242} Los metabolitos

derivados del microbioma pueden ser moduladores de microambiente tumoral contribuyendo en la inflamación, proliferación y muerte celular, tanto en sentido positivo como negativo. El acético es una de las principales fuentes energéticas durante las condiciones de hipoxia, como sucede en el cáncer, y ha sido considerado un marcador de carcinogénesis, favoreciendo la extensión del cáncer y su capacidad de invasión metastásica.²⁴³ Por lo tanto, nuestros resultados podrían ser explicados por este motivo.^{196,197}

En consecuencia, de los resultados de nuestro estudio surge la hipótesis de la utilidad diagnóstica del ácido acético en la detección de neoplasia oculta en los pacientes que presentan una TEP a priori idiopática. De hecho, el estudio de la neoplasia oculta en pacientes que presentan un episodio tromboembólico venoso a través de muestras de sangre periférica ya se ha empezado a investigar y actualmente se aplica de forma limitada. Para ello, se han desarrollado técnicas de cribado, denominadas colectivamente como biopsias líquidas, que pretenden ser una herramienta complementaria en la detección de cáncer, así como permitir su monitorización (detectar recidivas) o evaluar la respuesta al tratamiento oncológico. En cualquier caso, aunque el acético podría ser un biomarcador potencialmente aplicable como herramienta diagnóstica en la TEP, esta hipótesis, que es biológicamente plausible y que sería apoyada por nuestros resultados, precisa de nuevos estudios dirigidos a este objetivo de identificación de neoplasia oculta en pacientes inicialmente diagnosticados de una TEP aguda y seguidos más a largo plazo, como ya se ha planteado con otros biomarcadores sanguíneos.²⁴⁴

En el análisis comparador de los niveles de estos marcadores de inflamación entre los distintos grupos de TEP según los factores de riesgo, obtuvimos que los pacientes que presentan una TEP no provocada tienen valores de IL-4 y TNF- α superiores, e inferiores de IL-6. A diferencia de estos resultados, estudios previos han fallado en encontrar cualquier correlación entre los niveles de distintas interleucinas y los factores predisponentes para el desarrollo de ETV.^{225,229}

5.1.3. Correlación del microbioma con los parámetros inflamatorios

Los metabolitos derivados del microbioma están involucrados en la modulación de la inflamación y también han sido relacionados con algunos trastornos de la coagulación, por lo que planteamos analizar la posible correlación en los niveles de estos marcadores del microbioma (TMAO, acético, butírico, etc.) y los distintos biomarcadores inflamatorios y de la coagulación.

En nuestro trabajo, encontramos que los niveles de acético y de butírico se relacionan de forma directamente proporcional con los valores plasmático más elevados de algunas moléculas proinflamatorias, sobre todo con TGF- β , MCP-1, IP-10 y p-selectina, aunque sin apenas correlación con la mayoría de las interleucinas. Estos hallazgos podrían ser explicados como la consecuencia de la alteración de la composición taxonómica de la microbiota intestinal que condiciona un estado proinflamatorio local y sistémico, desencadenado por la mayor permeabilidad intestinal y la liberación de sustancias inflamatorias a la circulación sanguínea.¹³¹ Por otro lado, esta correlación también podría ser explicada en sentido inverso, ya que el propio estado inflamatorio se asocia tanto con el desarrollo de disbiosis, como con un aumento de la permeabilidad intestinal y la producción de distintos AGCC específicos.¹⁰⁰ Por otro lado, resulta destacable que no encontramos ninguna correlación del microbioma con ninguna de las interleucinas investigadas.

La implicación de la microbiota intestinal en la homeostasis global humana resulta evidente, pero se precisa de nuevos estudios que investiguen más sobre el papel de la inflamación en las situaciones de disbiosis, permitiendo conocer mejor sus vías patogénicas y el potencial impacto de estrategias terapéuticas contra la respuesta inflamatoria antes y después de la TEP.

5.2. Limitaciones del estudio y futuras líneas de investigación

Nuestro estudio tiene varias limitaciones que deben ser tenidas en consideración:

- En primer lugar, el presente trabajo se plantea como un análisis *post-hoc* de una cohorte de pacientes con TEP aguda que fue recogida prospectivamente para el estudio OSIRIS. Por lo tanto, nuestros resultados deben tratarse con cautela teniendo en cuenta las limitaciones inherentes a estudios que no fueron diseñados específicamente para estudiar la microbiota en la TEP.
- En segundo lugar, el análisis microbiológico a partir de muestras de sangre, a priori libres de gérmenes durante una TEP aguda, supone una limitación importante para cualquier análisis de composición taxonómica en muestras sanguíneas. En nuestro estudio se realizó una prueba de detección de ADN bacteriano en una pequeña muestra de la cohorte de pacientes con TEP, pero no se obtuvo ningún resultado.
- En tercer lugar, el diseño de nuestro estudio no permite diferenciar si los valores de los metabolitos derivados del microbioma en los pacientes con TEP son causa o consecuencia del evento cardiovascular acontecido.
- En cuarto lugar, en el presente estudio no se analizaron todos los metabolitos potencialmente medibles. Se realizó una selección de metabolitos derivados del microbioma de acuerdo con la bibliografía actualmente disponible y la experiencia de nuestro grupo de trabajo, dirigido a un perfil de metabolitos relacionados con la dieta.
- En quinto lugar, el diseño de nuestro estudio no permite garantizar que las diferencias obtenidas en el microbioma sean explicadas por diferencias relevantes en la dieta entre los pacientes con TEP y los controles analizados.
- En sexto lugar, la diferencia de edad de las muestras de pacientes en comparación con los controles es otra limitación potencialmente relevante. La edad media del grupo control es inferior a la de los pacientes con TEP y no pueden descartarse diferencias en el perfil del microbioma explicadas por esta diferencia de edad.
- Por último, y aunque no se trataba de un objetivo inicial del estudio, el tamaño muestral y el bajo número de eventos recogidos durante el seguimiento (muertes, hemorragias y recurrencias trombóticas) implica una limitación de potencia estadística, que nos ha impedido evaluar

adecuadamente la capacidad pronóstica de los distintos biomarcadores derivados del microbioma.

Por lo tanto, se requieren nuevos estudios que validen y confirmen nuestros resultados. En aras de este objetivo, son necesarios trabajos con diseños de estudios casos-controles prospectivos y con mayores tamaños muestrales que investiguen el papel del microbioma en la TEP aguda. Además, podrían ser de interés nuevos estudios que completen el estudio microbiológico con muestras biológicas adicionales que permitan un análisis más completo de la microbiota diferencial en los pacientes con TEP (e.g., muestras de heces y/o de mucosa oral), así como del papel de otras ómicas asociadas al microbioma, como el transcriptoma o el proteoma.

El presente proyecto constituye así el punto de partida de una nueva y estratégica línea de investigación del grupo de trabajo del PII de TEP de la SEPAR, a partir del cual se plantea desarrollar nuevos estudios con diseños prospectivos y que terminen de resolver las numerosas cuestiones aún sin respuesta en el potencial papel crítico del microbioma en la TEP, tanto en la fase aguda como en el seguimiento a largo plazo. En esta línea, realizados los análisis de los resultados de este primer proyecto, se plantea realizar un estudio prospectivo multicéntrico en el que se recogerán muestras de mucosa oral, heces y sangre para realizar una valoración más completa del microbioma de pacientes con TEP agudo sintomático y validar los resultados del estudio MICTEP.

5.3. Potencial aplicabilidad práctica de los resultados

La comunidad científica está avanzando en el conocimiento del microbioma, en los estados de salud y de enfermedad, integrando otras ómicas (transcriptoma, proteoma, metaboloma) que suponen una vía novedosa en investigación. Esto está permitiendo identificar novedosas “sellos microbiológicos” asociados con el desarrollo y progresión de diversas enfermedades, principalmente de aquellas que tienen un sustrato inflamatorio.²⁴¹

Los distintos metabolitos derivados del microbioma han ido ganando interés desde que se ha empezado a reconocer su importante papel en mantener la fisiología humana, el metabolismo celular, la correcta funcionalidad del sistema inmune y su papel en la biopatología de distintas enfermedades no infecciosas, incluyendo las cardiovasculares.²⁴³ Existe así un creciente cuerpo de investigación que sugiere una relación entre el microbioma y las enfermedades cardiovasculares.

Los metabolitos circulantes derivados del microbioma tienen, por lo tanto, interés como herramientas de utilidad tanto en diagnóstico como en tratamiento. La mejor comprensión de las relaciones del microbioma con la TEP podría aplicarse para abrir un nuevo campo en el desarrollo de la medicina personalizada en la TEP dirigida por el microbioma, permitiendo mejorar su diagnóstico y tratamiento.

Este novedoso campo de investigación se plantea por su potencial aplicabilidad en una medicina personalizada de la TEP dirigida por el microbioma:

- Diagnóstico de TEP: Hemos identificado un perfil diferencial de metabolitos derivados del microbioma en los pacientes que presentan una TEP, destacando las concentraciones más elevadas de TMAO y de ácido acético, e inferiores de los ácidos propiónico, isobutírico y valérico. De este modo, se plantea que estos biomarcadores sanguíneos que pueden ser determinados en muestras de sangre periférica podrían ser de utilidad en el diagnóstico de esta enfermedad cardiovascular. De todos ellos, el TMAO es el biomarcador del que disponemos de más evidencia bibliográfica sobre su papel en el desarrollo de eventos cardiovasculares, ya que niveles más altos de TMAO se han asociado con mayor riesgo de trombosis y de presencia de enfermedad cardiovascular.
- Identificación de neoplasia oculta en paciente con una TEP: en nuestro estudio, determinados metabolitos se han relacionado con la trombosis asociada a cáncer. Se trata del primer estudio que identifica metabolitos asociados con cáncer en el contexto de una tromboembolia pulmonar aguda. En cualquier caso, nuestro trabajo no tiene el diseño de estudio de

diagnóstico de neoplasia oculta, ya que los diagnósticos de cáncer son conocidos en el momento del diagnóstico de la TEP aguda. Por lo tanto, estos resultados tan solo generan hipótesis que justifican plantear futuras líneas de investigación que permitan evaluar la potencial aplicabilidad de estos metabolitos como herramienta diagnóstica en la valoración de una neoplasia subyacente en pacientes con diagnóstico de TEP.

- Utilidad pronóstica: los biomarcadores analíticos empleados en los pacientes con TEP son fundamentalmente medidos en muestras de sangre venosa periférica, no habiéndose demostrado hasta la fecha la utilidad de biomarcadores obtenibles mediante otro tipo de muestras biológicas (orina, heces, etc.). Por ello, resulta especialmente interesante poder descubrir nuevos marcadores con utilidad pronóstica a través de las muestras de sangre habituales, como se plantean los metabolitos derivados del microbioma. Nuestro estudio no permite descartar su utilidad también en la caracterización pronóstica de los pacientes que sufren una TEP.
- Diana terapéutica en la TEP: las estrategias de tratamiento en la TEP contra la respuesta inflamatoria se encuentran en fase de investigación. El microbioma está involucrado en la homeostasis de este estado inflamatorio, lo que pone el foco en conocer, no sólo la composición taxonómica de la microbiota, sino los metabolitos finales que son responsables de realizar la funciones de forma remota. Intervenciones terapéuticas que puedan influir de manera favorable en un perfil gastrointestinal disbiótico y promover un microbioma saludable podrían ser beneficiosas para el sistema cardiovascular mediante la reducción de la incidencia de eventos cardiovasculares en ciertas situaciones. El mejor conocimiento de las diferencias de estos metabolitos entre pacientes y controles nos da información de utilidad para valorar potenciales dianas terapéuticas basadas en la modulación externa de la producción de estos metabolitos para controlar la inflamación asociada a la TEP y, por ello, ser de aplicación tanto en el tratamiento como en la prevención (primaria y secundaria) de la ETV. Así, por ejemplo, como ha sucedido con otras enfermedades

cardiovasculares, los resultados de nuestro estudio plantean la potencial utilidad en la TEP de bloquear la producción de TMAO. En cualquier caso, estas hipótesis deben ser estudiadas y validadas con estudios diseñados adecuadamente para este fin.

En resumen, nuestro estudio aporta información novedosa y relevante sobre los metabolitos derivados del microbioma en sujetos que presentan una TEP aguda, y justifica la necesidad de nuevos estudios que investiguen que permitan esclarecer este papel del microbioma y su potencial aplicabilidad en el manejo diagnóstico, terapéutico y de prevención de la TEP.

CONCLUSIONES:

6. CONCLUSIONES:

Nuestro trabajo, que es el primer estudio publicado hasta la fecha que evalúa el papel del microbioma a través de sus metabolitos funcionales en la génesis de la TEP, obtuvimos las siguientes conclusiones:

- Los pacientes con una TEP aguda presentan características en el perfil del metaboloma derivado del microbioma diferenciales en comparación con sujetos sanos, destacando las concentraciones más elevadas de TMAO y de ácido acético, e inferiores de los ácidos propiónico, isobutírico y valérico.
- Los pacientes con TEP idiopática presentan valores más elevados tanto de ácido acético como de TMAO, en comparación con los que presentan una TEP provocada por factores de riesgo distintos al cáncer.
- Estos resultados sugieren un potencial papel del microbioma y sus metabolitos funcionales en el desarrollo de la TEP, que podría explicar la aparición de eventos tromboembólicos en los pacientes con TEP en los que no se logran identificar ninguno de los factores de riesgo de ETV habitualmente reconocidos.
- Los pacientes con trombosis asociada a cáncer se caracterizan por presentar valores de ácido acético significativamente más elevados. Este hallazgo plantea la hipótesis de su potencial utilidad como marcador de neoplasia en este escenario de trombosis.

ANEXOS:

7. ANEXOS:

ANEXO 1:

Carta de aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario y Politécnico La Fe para esta tesis doctoral, con fecha 12 de diciembre de 2017:

LaFe
Departament de Salut

FPNT-CEIB-04 (B)

DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENTOS

Don Serafín Rodríguez Capellán, Secretario del Comité de Ética de la Investigación con Medicamentos del Hospital Universitario y Politécnico La Fe,

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado en su sesión de fecha **12 de Diciembre de 2017**, el Proyecto de Investigación:

Título: **"ESTUDIO MICTEP: EVALUACIÓN DEL MICROBIOMA EN EL TROMBOEMBOLISMO PULMONAR."**
Nº de registro: **2017/0579**
Versión/fecha de la memoria del proyecto: **02 de noviembre de 2017**
Versión/fecha de la Hoja de Información al Paciente y Consentimiento Informado: **2/ 01 de diciembre de 2017**

Que dicho proyecto se ajusta a las normativas éticas sobre investigación biomédica con sujetos humanos y es viable en cuanto al planteamiento científico, objetivos, material y métodos, etc, descritos en la solicitud, así como la Hoja de Información al Paciente y el Consentimiento Informado.

En consecuencia, este Comité acuerda emitir **INFORME FAVORABLE** de dicho Proyecto de Investigación que será realizado en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe por el/la **Dr. / Dra. Alberto García Ortega** del servicio/unidad/grupo de investigación de **NEUMOLOGÍA** como Investigador Principal.

Que el CEIm del Hospital Universitario y Politécnico La Fe, tanto en su composición como en sus procedimientos, cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95) y con la legislación vigente que regula su funcionamiento, y que la composición del CEIm del Hospital Universitario y Politécnico La Fe es la indicada en el anexo I, teniendo en cuenta que, en el caso de que algún miembro participe en el estudio o declare algún conflicto de interés, no habrá participado en la evaluación ni en el dictamen de la solicitud de autorización del estudio clínico.

Lo que firmo en Valencia, a 12 de diciembre de 2017



Fdo.: Don Serafín Rodríguez Capellán
Secretario del Comité de Ética de la Investigación con Medicamentos

ANEXO 2:

Obtención de beca para el proyecto de investigación de la tesis doctoral por parte de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR) en la Convocatoria de becas SEPAR de 2017:



ANEXO 3:

Carta de obtención de beca para el proyecto de investigación de la tesis doctoral por parte de la Sociedad Valenciana de Neumología (SVN) en la Convocatoria de becas de la SVN de 2018:

SOCIEDAD VALENCIANA DE NEUMOLOGIA**FUNDACION DE NEUMOLOGIA DE LA COMUNIDAD VALENCIANA**

Atendiendo a la valoración por parte del Comité Científico de la Sociedad Valenciana de Neumología, la Junta Directiva de esta Sociedad resuelve conceder una Beca de la Fundación de Neumología de la Comunidad Valenciana dotada con 6.000 euros al proyecto de investigación (perfil vascular), titulado

Estudio MICTEP: evaluación del Microbioma en el Tromboembolismo Pulmonar

Investigador Principal: ALBERTO GARCIA ORTEGA

Otros investigadores: REMEDIOS OTERO CANDELER, RAQUEL LOPEZ REYES, ROSA DEL CAMPO, ANA TORRENTS VILAR, MARCOS PRADO BARRAGAN

En Alicante, 21 de abril de 2018

Luís Hernández Blasco
Presidente SVN/FNCV

Eva Martínez Moragón
Vicepresidenta SVN/FNCV

Sociedad Valenciana de Neumología | Fundación de Neumología de la Comunidad Valenciana. G-97424733.
Contacto: administracion@svneumo.org | Dirección postal: Sociedad Valenciana de Neumología o Fundación de Neumología de la Comunidad Valenciana: Colegio de Médicos de Valencia, Poeta Llem 14, 46013 Valencia.
www.svneumo.org

ANEXO 4:

Listado de tablas por orden de aparición:

- **Tabla 1:** Factores de riesgo predisponentes para el desarrollo de enfermedad tromboembólica venosa (página 16).
- **Tabla 2:** Características demográficas y antropométricas de la cohorte de pacientes con tromboembolia pulmonar (página 61).
- **Tabla 3:** Factores de riesgo de la cohorte de pacientes con tromboembolia pulmonar (página 62).
- **Tabla 4:** Comorbilidades de la cohorte de pacientes con tromboembolia pulmonar (página 63).
- **Tabla 5:** Características basales de la cohorte de pacientes con tromboembolia pulmonar comparando por grupos según los factores de riesgo (página 65).
- **Tabla 6:** Presentación inicial de la tromboembolia pulmonar (página 66).
- **Tabla 7:** Características de resultados analíticos y de imagen al diagnóstico de la tromboembolia pulmonar (página 68).
- **Tabla 8:** Pruebas de diagnóstico por imagen de la tromboembolia pulmonar (página 69).
- **Tabla 9:** Complicaciones durante el seguimiento de la cohorte de pacientes con tromboembolia pulmonar (página 70).
- **Tabla 10:** Metabolitos derivados del microbioma comparando casos frente a controles (página 72).
- **Tabla 11:** Áreas bajo la curva de los metabolitos derivados del microbioma para predecir tromboembolia pulmonar (página 74).
- **Tabla 12:** Comparación de los metabolitos derivados del microbioma entre pacientes con tromboembolia pulmonar provocada frente a tromboembolia pulmonar no provocada (página 75).
- **Tabla 13:** Modelo multinomial para discriminar distintos grupos de riesgo etiológicos según valores de TMAO y acético (página 77).
- **Tabla 14:** Marcadores inflamatorios comparando casos frente a controles (página 79).

- **Tabla 15:** Marcadores inflamatorios comparando pacientes con tromboembolia pulmonar provocada frente a no provocada (página 83).
- **Tabla 16:** Marcadores inflamatorios en pacientes con tromboembolia pulmonar comparando por grupos según factores de riesgo (no provocada, asociada a cáncer, provocada) (página 84).
- **Tabla 17:** Marcadores de la coagulación comparando casos frente a controles (página 85).
- **Tabla 18:** Marcadores de la coagulación comparando pacientes con tromboembolia pulmonar provocada frente a no provocada (página 86).
- **Tabla 19:** Marcadores de la coagulación en pacientes con tromboembolia pulmonar comparando por grupos según factores de riesgo (no provocada, asociada a cáncer, provocada) (página 89).

ANEXO 5:

Listado de figuras por orden de aparición:

- **Figura 1:** Mecanismos etiopatogénicos de la enfermedad tromboembólica venosa: Triada de Virchow (página 17).
- **Figura 2:** Fisiopatología de la tromboembolia pulmonar aguda e impacto en la circulación pulmonar y sistémica (página 23).
- **Figura 3:** Relación entre la gravedad de la tromboembolia pulmonar aguda y el pronóstico (página 24).
- **Figura 4:** Evolución de la composición del microbiota a lo largo de la vida y factores modificadores (página 30).
- **Figura 5:** Esquema de los efectos del microbiota intestinal y su microbioma en los factores de riesgo cardiovascular y el desarrollo de eventos cardiovasculares (página 34).
- **Figura 6:** Fisiopatología común de la trombosis venosa y arterial (página 35).
- **Figura 7:** Hipótesis fisiopatológica de las potenciales relaciones entre la disbiosis y un estado de hipercoagulabilidad (página 37).
- **Figura 8:** Estrategias de intervención sobre el microbioma y potencial impacto en la salud humana dirigida a la enfermedad tromboembólica venosa (página 39).
- **Figura 9:** Diagrama de flujo de pacientes con tromboembolia de pulmón seleccionados para el análisis del estudio (página 60).
- **Figura 10:** Comparación de los valores de los metabolitos derivados del microbioma entre controles sanos y pacientes con tromboembolia pulmonar, y entre pacientes con tromboembolia pulmonar según los factores de riesgo (página 73).
- **Figura 11:** Probabilidad de los grupos de riesgo etiológicos según los niveles de TMAO (página 76).
- **Figura 12:** Probabilidad de los grupos de riesgo etiológicos según los niveles de ácido acético (página 77).
- **Figura 13:** Área bajo la curva ROC de los niveles de acético para diagnóstico de tromboembolia pulmonar no provocada (página 78).

- **Figura 14:** Comparación de los valores de los marcadores inflamatorios entre controles sanos y pacientes con tromboembolia pulmonar, y entre pacientes con tromboembolia pulmonar según los factores de riesgo (páginas 80 y 81).
- **Figura 15:** Comparación de los valores de los marcadores de la coagulación entre controles sanos y pacientes con TEP, y entre pacientes con TEP según los factores de riesgo de enfermedad tromboembólica venosa subyacentes (páginas 87 y 88).
- **Figura 16:** Grado de correlación de los metabolitos derivados del microbioma (página 90).
- **Figura 17:** Análisis en red de la correlación de los metabolitos derivados del microbioma con los parámetros inflamatorios (página 91).
- **Figura 18:** Correlación de los metabolitos derivados del microbioma con los parámetros inflamatorios (página 92).
- **Figura 19:** Análisis en red de la correlación de los metabolitos derivados del microbioma con los parámetros de la coagulación (página 93).
- **Figura 20:** Correlación de los metabolitos derivados del microbioma con los parámetros de la coagulación (página 94).

ANEXO 6:

Definiciones básicas de algunos de términos y nomenclaturas seleccionadas por orden alfabético:

- **ARNr 16S:** Componente de la subunidad pequeña 30S de los ribosomas procarióticos. La secuenciación del 16S ARNr ha sido utilizado para identificar la taxonomía procariótica en muestras medioambientales completas como el microbioma.
- **Disbiosis:** cambios en la composición y estructura del microbiota humano en una determinada localización, a menudo por presiones externas tales como los estados de enfermedad o las medicaciones, que puede explicar por qué algunos individuos tienen más probabilidad de desarrollar ciertas enfermedades o desarrollar formas más graves de la enfermedad.
- **Metagenómica:** La información genética de una población compleja, típicamente de microbios en un medioambiente o en la muestra de un huésped, que está constituida por los genomas de muchos organismos. El metagenoma da información sobre la funcionalidad genética de la población agregada.
- **Microbioma:** colección de genomas microbianos. La totalidad de los microbios, su información genética y el medio en el que interactúan.
- **Microbiota:** colección de organismos microbios que constituyen el microbioma. La composición de la microbiota puede variar sustancialmente según las localizaciones anatómicas y en los estados salud y enfermedad.
- **Patógeno:** un organismo que es perjudicial para el hospedador o causa una enfermedad.
- **Prebióticos:** ingredientes alimentarios que confieren cambios específicos en el microbioma intestinal, que producen efectos beneficiosos en el hospedador.
- **Probióticos:** microorganismos que se emplean para producir beneficios de salud para el hospedador.

BIBLIOGRAFÍA:

8. BIBLIOGRAFÍA:

1. Kahn SR, de Wit K. Pulmonary embolism. *N Engl J Med*. 2022;387(1):45-57. doi: 10.1056/NEJMcp2116489.
2. Jiménez D, Aujesky D, Díaz G, et al. Prognostic significance of deep vein thrombosis in patients presenting with acute symptomatic pulmonary embolism. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;181(9):983-991. doi: 10.1164/rccm.200908-1204OC.
3. Cho I, Blaser MJ. The human microbiome: At the interface of health and disease. *Nature reviews. Genetics*. 2012;13(4):260-270. doi: 10.1038/nrg3182.
4. Pflughoeft KJ, Versalovic J. Human microbiome in health and disease. *Annual review of pathology*. 2012;7(1):99-122. doi: 10.1146/annurev-pathol-011811-132421.
5. Battson ML, Lee DM, Weir TL, Gentile CL. The gut microbiota as a novel regulator of cardiovascular function and disease. *J Nutr Biochem*. 2018; 56:1-15. doi:10.1016/j.jnutbio.2017.12.010
6. The integrative human microbiome project. *Nature*. 2019;569(7758):641-648. doi: 10.1038/s41586-019-1238-8.
7. Ahmad AF, Dwivedi G, O'Gara F, Caparros-Martin J, Ward NC. The gut microbiome and cardiovascular disease: Current knowledge and clinical potential. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2019;317(5):H923-H938. doi: 10.1152/ajpheart.00376.2019.
8. Trøseid M, Andersen GØ, Broch K, Hov JR. The gut microbiome in coronary artery disease and heart failure: Current knowledge and future directions. *EBioMedicine*. 2020; 52:102649. doi:10.1016/j.ebiom.2020.102649
9. Konstantinides SV, Meyer G. The 2019 ESC guidelines on the diagnosis and management of acute pulmonary embolism. *European Heart Journal*. 2019;40(42):3453-3455. doi: 10.1093/eurheartj/ehz726.

10. Wendelboe AM, Raskob GE. Global burden of thrombosis: Epidemiologic aspects. *Circ Res*. 2016;118(9):1340-1347. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306841.
11. Thrombosis: A major contributor to global disease burden. *Thromb Res*. 2014;134(5):931-938. doi: 10.1016/j.thromres.2014.08.014.
12. Wendelboe A, Raskob G. Global burden of thrombosis: Epidemiologic aspects. *Circulation Research*. 2016;118(9):1340-1347. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306841.
13. Raskob GE, Angchaisuksiri P, Blanco AN, et al. Thrombosis: A major contributor to global disease burden. *Thrombosis Research*. 2014;134(5):931-938. doi: 10.1016/j.thromres.2014.08.014.
14. de Miguel-Díez J, Jiménez-García R, Jiménez D, et al. Trends in hospital admissions for pulmonary embolism in Spain from 2002 to 2011. *The European respiratory journal*. 2014;44(4):942-950. doi: 10.1183/09031936.00194213.
15. Di Nisio M, van Es N, Büller HR. Deep vein thrombosis and pulmonary embolism. *Lancet*. 2016;388(10063):3060-3073. doi: 10.1016/S0140-6736(16)30514-1.
16. Kostadima E, Zakynthinos E. Pulmonary embolism: Pathophysiology, diagnosis, treatment. *Hellenic J Cardiol*. 2007;48(2):94-107.
17. Lehnert P, Lange T, Møller CH, Olsen PS, Carlsen J. Acute pulmonary embolism in a national danish cohort: Increasing incidence and decreasing mortality. *Thromb Haemost*. 2018;118(3):539-546. doi: 10.1160/TH17-08-0531.
18. Klok FA, Huisman MV. Management of incidental pulmonary embolism. *Eur Respir J*. 2017;49(6):1700275. doi: 10.1183/13993003.00275-2017.
19. de Miguel-Díez J, Jiménez-García R, Jiménez D, et al. Trends in hospital admissions for pulmonary embolism in Spain from 2002 to 2011. *Eur Respir J*. 2014;44(4):942-950. doi: 10.1183/09031936.00194213.
20. Jiménez D, Bikdeli B, Quezada A, et al. Hospital volume and outcomes for acute pulmonary embolism: Multinational population based cohort study. *BMJ*. 2019;366: l4416. doi: 10.1136/bmj.l4416.
21. Jiménez D, de Miguel-Díez J, Guijarro R, et al. Trends in the management and outcomes of acute pulmonary embolism: Analysis from the RIETE registry. *J Am Coll Cardiol*. 2016;67(2):162-170. doi: 10.1016/j.jacc.2015.10.060.

22. Dentali F, Ageno W, Pomero F, Fenoglio L, Squizzato A, Bonzini M. Time trends and case fatality rate of in-hospital treated pulmonary embolism during 11 years of observation in northwestern Italy. *Thromb Haemost.* 2016;115(2):399-405. doi: 10.1160/TH15-02-0172.
23. Keller K, Hobohm L, Ebner M, et al. Trends in thrombolytic treatment and outcomes of acute pulmonary embolism in Germany. *Eur Heart J.* 2020;41(4):522-529. doi: 10.1093/eurheartj/ehz236.
24. Mahmud E, Madani MM, Kim NH, et al. Chronic thromboembolic Pulmonary Hypertension: Evolving therapeutic approaches for operable and inoperable Disease. *J Am Coll Cardiol.* 2018;71(21):2468-2486. doi: 10.1016/j.jacc.2018.04.009.
25. Ramírez P, Otero R, Barberà JA. Pulmonary chronic thromboembolic disease. *Arch Bronconeumol.* 2020;56(5):314-321. doi: 10.1016/j.arbr.2020.03.007.
26. Bělohávek J, Dytrych V, Linhart A. Pulmonary embolism, part I: Epidemiology, risk factors and risk stratification, pathophysiology, clinical presentation, diagnosis and nonthrombotic pulmonary embolism. *Exp Clin Cardiol.* 2013;18(2):129-138.
27. Cushman M. Epidemiology and risk factors for venous thrombosis. *Semin Hematol.* 2007;44(2):62-69. doi: 10.1053/j.seminhematol.2007.02.004.
28. Esmon CT. Basic mechanisms and pathogenesis of venous thrombosis. *Blood Rev.* 2009;23(5):225-229. doi: 10.1016/j.blre.2009.07.002.
29. De Maeseneer MGR, Hertoghs M, Lauwers K, Koeyers W, de Wolf M, Wittens C. Chronic venous insufficiency in patients with absence of the inferior vena cava. *J Vasc Surg Venous Lymphat Disord.* 2013;1(1):39-44.e2. doi: 10.1016/j.jvsv.2012.05.002.
30. Uresandi F, Jiménez D. National consensus on the diagnosis, risk stratification and treatment of patients with pulmonary embolism: An update. *Arch Bronconeumol.* 2016;52(2):61-62. doi: 10.1016/j.arbres.2015.07.002.
31. Konstantinides SV. 2014 ESC guidelines on the diagnosis and management of acute pulmonary embolism. *European heart journal.* 2014;35(45):3145-3146. doi: 10.1093/eurheartj/ehu393.
32. Sørensen HT, Horvath-Puho E, Lash TL, et al. Heart disease may be a risk factor for pulmonary embolism without peripheral deep venous thrombosis. *Circulation.* 2011;124(13):1435-1441. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.025627.

33. Ageno W, Becattini C, Brighton T, Selby R, Kamphuisen PW. Cardiovascular risk factors and venous thromboembolism: A meta-analysis. *Circulation*. 2008;117(1):93-102. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.709204.
34. Steffen LM, Cushman M, Peacock JM, et al. Metabolic syndrome and risk of venous thromboembolism: Longitudinal investigation of thromboembolism etiology. *J Thromb Haemost*. 2009;7(5):746-751. doi: 10.1111/j.1538-7836.2009.03295.x.
35. Piazza G, Goldhaber SZ. Venous thromboembolism and atherothrombosis: An integrated approach. *Circulation*. 2010;121(19):2146-2150. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.951236.
36. Esmon CT. Basic mechanisms and pathogenesis of venous thrombosis. *Blood Reviews*. 2009;23(5):225-229. doi: 10.1016/j.blre.2009.07.002.
37. Clayton TC, Thompson M, Meade TW. Recent respiratory infection and risk of cardiovascular disease: Case-control study through a general practice database. *Eur Heart J*. 2008;29(1):96-103. doi: 10.1093/eurheartj/ehm516.
38. Smeeth L, Thomas SL, Hall AJ, Hubbard R, Farrington P, Vallance P. Risk of myocardial infarction and stroke after acute infection or vaccination. *N Engl J Med*. 2004;351(25):2611-2618. doi: 10.1056/NEJMoa041747.
39. Shah IK, Merfeld JM, Chun J, Tak T. Pathophysiology and management of pulmonary embolism. *Int J Angiol*. 2022;31(3):143-149. doi: 10.1055/s-0042-1756204.
40. Oger E. Incidence of venous thromboembolism: A community-based study in western france. EPI-GETBP study group. groupe d'etude de la thrombose de bretagne occidentale. *Thromb Haemost*. 2000;83(5):657-660.
41. Bhagat K, Vallance P. Inflammatory cytokines impair endothelium-dependent dilatation in human veins in vivo. *Circulation*. 1997;96(9):3042-3047. doi: 10.1161/01.cir.96.9.3042.
42. Smeeth L, Cook C, Thomas S, Hall AJ, Hubbard R, Vallance P. Risk of deep vein thrombosis and pulmonary embolism after acute infection in a community setting. *Lancet*. 2006;367(9516):1075-1079. doi: 10.1016/S0140-6736(06)68474-2.
43. Samama MM. An epidemiologic study of risk factors for deep vein thrombosis in medical outpatients: The sirius study. *Arch Intern Med*. 2000;160(22):3415-3420. doi: 10.1001/archinte.160.22.3415.

44. Alikhan R, Cohen AT, Combe S, et al. Risk factors for venous thromboembolism in hospitalized patients with acute medical illness: Analysis of the MEDENOX study. *Archives of Internal Medicine*. 2004;164(9):963-968. doi: 10.1001/archinte.164.9.963.
45. Rogers MAM, Levine DA, Blumberg N, Flanders SA, Chopra V, Langa KM. Triggers of hospitalization for venous thromboembolism. *Circulation*. 2012;125(17):2092-2099. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.084467.
46. Frasson S, Gussoni G, Di Micco P, et al. Infection as cause of immobility and occurrence of venous thromboembolism: Analysis of 1635 medical cases from the RIETE registry. *Journal of thrombosis and thrombolysis*. 2016;41(3):404-412. doi: 10.1007/s11239-015-1242-2.
47. Nakayama T, Akahoshi M, Irino K, et al. Transient antiphospholipid syndrome associated with primary cytomegalovirus infection: A case report and literature review. *Case Rep Rheumatol*. 2014; 2014:271548. doi: 10.1155/2014/271548.
48. Yildiz H, Zech F, Hainaut P. Venous thromboembolism associated with acute cytomegalovirus infection: Epidemiology and predisposing conditions. *Acta Clin Belg*. 2016;71(4):231-234. doi: 10.1080/17843286.2016.1177265.
49. Paran Y, Shalev V, Steinvil A, et al. Thrombosis following acute cytomegalovirus infection: A community prospective study. *Ann Hematol*. 2013;92(7):969-974. doi: 10.1007/s00277-013-1715-3.
50. Kelkar AH, Jacob KS, Yousif EB, Farrell JJ. Venous thromboembolism related to cytomegalovirus infection: A case report and literature review. *Medicine (Baltimore)*. 2017;96(51):e9336. doi: 10.1097/MD.00000000000009336.
51. Emmerich J. Infection and venous thrombosis. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2002;32(5-6):346-348. doi: 10.1159/000073596.
52. Dalager-Pedersen M, Søgaaard M, Schønheyder HC, Thomsen RW, Baron JA, Nielsen H. Venous thromboembolism after community-acquired bacteraemia: A 20-year danish cohort study. *PloS one*. 2014;9(1):e86094. doi: 10.1371/journal.pone.0086094.
53. Martin E, Cevik C, Nugent K. The role of hypervirulent staphylococcus aureus infections in the development of deep vein thrombosis. *Thromb Res*. 2012;130(3):302-308. doi: 10.1016/j.thromres.2012.06.013.
54. Nicholson M, Chan N, Bhagirath V, Ginsberg J. Prevention of venous thromboembolism in 2020 and beyond. *J Clin Med*. 2020;9(8):2467. doi: 10.3390/jcm9082467.

55. Cohen AT, Harrington RA, Goldhaber SZ, et al. Extended thromboprophylaxis with betrixaban in acutely ill medical patients. *N Engl J Med.* 2016;375(6):534-544. doi: 10.1056/NEJMoa1601747.
56. Cohen AT, Spiro TE, Büller HR, et al. Rivaroxaban for thromboprophylaxis in acutely ill medical patients. *N Engl J Med.* 2013;368(6):513-523. doi: 10.1056/NEJMoa1111096.
57. Knotts TL, Mousa SA. Anticoagulation in venous thromboembolism prophylaxis in medically ill patients: Potential impact of NOACs. *Am J Cardiovasc Drugs.* 2019;19(4):365-376. doi: 10.1007/s40256-019-00329-5.
58. Kahn SR, Lim W, Dunn AS, et al. Prevention of VTE in nonsurgical patients: Antithrombotic therapy and prevention of thrombosis, 9th ed: American college of chest physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest.* 2012;141(2 Suppl):e195S-e226S. doi: 10.1378/chest.11-2296.
59. Hull RD, Schellong SM, Tapson VF, et al. Extended-duration venous thromboembolism prophylaxis in acutely ill medical patients with recently reduced mobility: A randomized trial. *Ann Intern Med.* 2010;153(1):8-18. doi: 10.7326/0003-4819-153-1-201007060-00004.
60. Gärdlund B. Randomised, controlled trial of low-dose heparin for prevention of fatal pulmonary embolism in patients with infectious diseases. the heparin prophylaxis study group. *Lancet.* 1996;347(9012):1357-1361. doi: 10.1016/s0140-6736(96)91009-0.
61. Geerts WH, Bergqvist D, Pineo GF, et al. Prevention of venous thromboembolism: American college of chest physicians evidence-based clinical practice guidelines (8th edition). *Chest.* 2008;133(6 Suppl):381S-453S. doi: 10.1378/chest.08-0656.
62. Pedrajas JM, Garmendia C, Portillo J, et al. Enfermedad tromboembólica venosa idiopática versus secundaria. hallazgos del registro RIETE. *Revista Clínica Española.* 2014;214(214):357-364. doi: 10.1016/j.rce.2014.05.017.
63. Goldhaber SZ, Elliott CG. Acute pulmonary embolism: Part I: Epidemiology, pathophysiology, and diagnosis. *Circulation.* 2003;108(22):2726-2729 doi: 10.1161/01.CIR.0000097829.89204.0C.
64. Burrowes KS, Clark AR, Tawhai MH. Blood flow redistribution and ventilation-perfusion mismatch during embolic pulmonary arterial occlusion. *Pulm Circ.* 2011;1(3):365-376. doi: 10.4103/2045-8932.87302.
65. D'Alonzo GE, Dantzker DR. Gas exchange alterations following pulmonary thromboembolism. *Clin Chest Med.* 1984;5(3):411-419.

66. Konstantinides S, Geibel A, Kasper W, Olschewski M, Blümel L, Just H. Patent foramen ovale is an important predictor of adverse outcome in patients with major pulmonary embolism. *Circulation*. 1998;97(19):1946-1951. doi: 10.1161/01.cir.97.19.1946.
67. Saghazadeh A, Rezaei N. Inflammation as a cause of venous thromboembolism. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016; 99:272-285. doi: 10.1016/j.critrevonc.2016.01.007.
68. Hasan RA, Koh AY, Zia A. The gut microbiome and thromboembolism. *Thromb Res*. 2020; 189:77-87. doi: 10.1016/j.thromres.2020.03.003.
69. Kaplan D, Casper TC, Elliott CG, et al. VTE incidence and risk factors in patients with severe sepsis and septic shock. *Chest*. 2015;148(5):1224-1230. doi: 10.1378/chest.15-0287.
70. Kappelman MD, Horvath-Puho E, Sandler RS, et al. Thromboembolic risk among danish children and adults with inflammatory bowel diseases: A population-based nationwide study. *Gut*. 2011;60(7):937-943. doi: 10.1136/gut.2010.228585.
71. Carminita E, Crescence L, Panicot-Dubois L, Dubois C. Role of neutrophils and NETs in animal models of thrombosis. *Int J Mol Sci*. 2022;23(3):1411. doi: 10.3390/ijms23031411.
72. Thoreau B, Galland J, Delrue M, et al. D-dimer level and neutrophils count as predictive and prognostic factors of pulmonary embolism in severe non-ICU COVID-19 patients. *Viruses*. 2021; 13(5):758. doi: 10.3390/v13050758.
73. Siddiqui F, García-Ortega A, Kantarcioglu B, et al. Cellular indices and outcome in patients with acute venous thromboembolism. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2022; 28:10760296221113346. doi: 10.1177/10760296221113346.
74. Watts JA, Gellar MA, Stuart LK, Obraztsova M, Kline JA. Proinflammatory events in right ventricular damage during pulmonary embolism: Effects of treatment with ketorolac in rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2009;54(3):246-252. doi: 10.1097/FJC.0b013e3181b2b699.
75. Phan T, Brailovsky Y, Fareed J, Hoppensteadt D, Iqbal O, Darki A. Neutrophil-to-lymphocyte and platelet-to-lymphocyte ratios predict all-cause mortality in acute pulmonary embolism. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2020; 26:1076029619900549. doi: 10.1177/1076029619900549.
76. Jimenez D, Nieto R, Corres J, et al. Diclofenac for reversal of right ventricular dysfunction in acute normotensive pulmonary embolism: A pilot study. *Thromb Res*. 2018; 162:1-6. doi: 10.1016/j.thromres.2017.12.002.
77. Marchena Yglesias PJ, Nieto Rodríguez JA, Serrano Martínez S, et al. [Acute-phase reactants and markers of inflammation in venous thromboembolic disease: Correlation with clinical and

- evolution parameters]. *An Med Interna*. 2006;23(3):105-110. doi: 10.4321/s0212-71992006000300002.
78. Galliazzo S, Nigro O, Bertù L, et al. Prognostic role of neutrophils to lymphocytes ratio in patients with acute pulmonary embolism: A systematic review and meta-analysis of the literature. *Intern Emerg Med*. 2018;13(4):603-608. doi: 10.1007/s11739-018-1805-2.
79. Condado JF, Junpaparp P, Binongo JN, et al. Neutrophil-lymphocyte ratio (NLR) and platelet-lymphocyte ratio (PLR) can risk stratify patients in transcatheter aortic-valve replacement (TAVR). *Int J Cardiol*. 2016; 223:444-449. doi: 10.1016/j.ijcard.2016.08.260.
80. Wang Q, Ma J, Jiang Z, Ming L. Prognostic value of neutrophil-to-lymphocyte ratio and platelet-to-lymphocyte ratio in acute pulmonary embolism: A systematic review and meta-analysis. *Int Angiol*. 2018;37(1):4-11. doi: 10.23736/S0392-9590.17.03848-2.
81. The integrative human microbiome project. *Nature*. 2019;569(7758):641-648. doi: 10.1038/s41586-019-1238-8.
82. Stappenbeck TS, Virgin HW. Accounting for reciprocal host-microbiome interactions in experimental science. *Nature*. 2016;534(7606):191-199. doi: 10.1038/nature18285.
83. Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Gordon JI, Turnbaugh PJ, Knight R. The human microbiome project. *Nature*. 2007;449(7164):804-810. doi: 10.1038/nature06244.
84. Fan Z, Xu S, Deng Y, Wei L, Yang J, Xing X. Disordered gut microbiota and alterations in the serum metabolome are associated with venous thromboembolism. *Thromb Res*. 2024; 235:68-74. doi: 10.1016/j.thromres.2024.01.022.
85. Gill SR, Pop M, Deboy RT, et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*. 2006;312(5778):1355-1359. doi: 10.1126/science.1124234.
86. Garrido-Martín EM, Paz-Ares L. Lung cancer and microbiome. *Archivos de Bronconeumologia*. 2020;56(1):3-4. doi: 10.1016/j.arbres.2019.04.012.
87. Costello EK, Lauber CL, Hamady M, Fierer N, Gordon JI, Knight R. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science*. 2009;326(5960):1694-1697. doi: 10.1126/science.1177486.
88. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012;486(7402):207-214. doi: 10.1038/nature11234.
89. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*. 2005;308(5728):1635-1638. doi: 10.1126/science.1110591.

90. Ursell LK, Clemente JC, Rideout JR, Gevers D, Caporaso JG, Knight R. The interpersonal and intrapersonal diversity of human-associated microbiota in key body sites. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;129(5):1204-1208. doi: 10.1016/j.jaci.2012.03.010.
91. Faith JJ, Guruge JL, Charbonneau M, et al. The long-term stability of the human gut microbiota. *Science.* 2013;341(6141):1237439. doi: 10.1126/science.1237439.
92. Cho I, Blaser MJ. The human microbiome: At the interface of health and disease. *Nat Rev Genet.* 2012;13(4):260-270. doi: 10.1038/nrg3182.
93. Shi N, Li N, Duan X, Niu H. Interaction between the gut microbiome and mucosal immune system. *Mil Med Res.* 2017; 4:14. doi: 10.1186/s40779-017-0122-9.
94. Chen J, Yue Y, Wang L, et al. Altered gut microbiota correlated with systemic inflammation in children with kawasaki disease. *Sci Rep.* 2020;10(1):14525. Accessed Dec 10, 2023. doi: 10.1038/s41598-020-71371-6.
95. Tilg H, Zmora N, Adolph TE, Elinav E. The intestinal microbiota fuelling metabolic inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2020;20(1):40-54. Accessed Dec 10, 2023. doi: 10.1038/s41577-019-0198-4.
96. Hakansson A, Molin G. Gut microbiota and inflammation. *Nutrients.* 2011;3(6):637-682. Accessed Dec 10, 2023. doi: 10.3390/nu3060637.
97. Cerf-Bensussan N, Gaboriau-Routhiau V. The immune system and the gut microbiota: Friends or foes? *Nat Rev Immunol.* 2010;10(10):735-744. Accessed Dec 14, 2023. doi: 10.1038/nri2850.
98. Shulzhenko N, Morgun A, Hsiao W, et al. Crosstalk between B lymphocytes, microbiota and the intestinal epithelium governs immunity versus metabolism in the gut. *Nat Med.* 2011;17(12):1585-1593. doi: 10.1038/nm.2505.
99. Clemente JC, Manasson J, Scher JU. The role of the gut microbiome in systemic inflammatory disease. *BMJ.* 2018;360: j5145. doi: 10.1136/bmj.j5145.
100. Álvarez J, Fernández Real JM, Guarner F, et al. Gut microbes and health. *Gastroenterol Hepatol.* 2021;44(7):519-535. doi: 10.1016/j.gastrohep.2021.01.009.
101. Requena T, Velasco M. The human microbiome in sickness and in health. *Rev Clin Esp (Barc).* 2021;221(4):233-240. doi: 10.1016/j.rceng.2019.07.018.
102. Ahmadmehrabi S, Tang WHW. Gut microbiome and its role in cardiovascular diseases. *Curr Opin Cardiol.* 2017;32(6):761-766. doi: 10.1097/HCO.0000000000000445.

103. Finlay BB. Are noncommunicable diseases communicable? *Science*. 2020;367(6475):250-251. doi: 10.1126/science.aaz3834.
104. Hsiao EY, McBride SW, Hsien S, et al. Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell*. 2013;155(7):1451-1463. doi: 10.1016/j.cell.2013.11.024.
105. Lee SH, Sung JY, Yong D, et al. Characterization of microbiome in bronchoalveolar lavage fluid of patients with lung cancer comparing with benign mass like lesions. *Lung Cancer*. 2016; 102:89-95. doi: 10.1016/j.lungcan.2016.10.016.
106. Jin C, Lagoudas GK, Zhao C, et al. Commensal microbiota promote lung cancer development via $\gamma\delta$ T cells. *Cell*. 2019;176(5):998-1013.e16. doi: 10.1016/j.cell.2018.12.040.
107. Tang WHW, Wang Z, Fan Y, et al. Prognostic value of elevated levels of intestinal microbe-generated metabolite trimethylamine-N-oxide in patients with heart failure: Refining the gut hypothesis. *J Am Coll Cardiol*. 2014;64(18):1908-1914. doi: 10.1016/j.jacc.2014.02.617.
108. Lawrence G, Midtved I, Samuelsen SO, Kristoffersen AK, Enersen M, Håheim LL. The blood microbiome and its association to cardiovascular disease mortality: Case-cohort study. *BMC Cardiovasc Disord*. 2022;22(1):344. doi: 10.1186/s12872-022-02791-7.
109. Zhao Y, Wang Z. Gut microbiome and cardiovascular disease. *Curr Opin Cardiol*. 2020;35(3):207-218. doi: 10.1097/HCO.0000000000000720.
110. Al Khodor S, Reichert B, Shatat IF. The microbiome and blood pressure: Can microbes regulate our blood pressure? *Frontiers in pediatrics*. 2017; 5:138. doi: 10.3389/fped.2017.00138.
111. Diamant M, Blaak EE, Vos WM. Do nutrient-gut-microbiota interactions play a role in human obesity, insulin resistance and type 2 diabetes? *Obesity Reviews*. 2011;12(4):272-281.
112. Tang WH, Hazen S. The gut microbiome and its role in cardiovascular diseases. *Circulation*. 2017;135(11):1008-1010. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.024251.
113. Wilson A, McLean C, Kim RB. Trimethylamine-N-oxide: A link between the gut microbiome, bile acid metabolism, and atherosclerosis. *Current opinion in lipidology*. 2016;27(2):148-154. doi: 10.1097/MOL.0000000000000274.
114. Kim N, Jeon SH, Ju IG, et al. Transplantation of gut microbiota derived from alzheimer's disease mouse model impairs memory function and neurogenesis in C57BL/6 mice. *Brain Behav Immun*. 2021; 98:357-365. doi: 10.1016/j.bbi.2021.09.002.

115. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*. 2006;444(7122):1027-1031. doi: 10.1038/nature05414.
116. Haiser HJ, Gootenberg DB, Chatman K, Sirasani G, Balskus EP, Turnbaugh PJ. Predicting and manipulating cardiac drug inactivation by the human gut bacterium *eggertella lenta*. *Science*. 2013;341(6143):295-298. doi: 10.1126/science.1235872.
117. Taur Y, Jenq RR, Perales M, et al. The effects of intestinal tract bacterial diversity on mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2014;124(7):1174-1182. doi: 10.1182/blood-2014-02-554725.
118. Matson V, Fessler J, Bao R, et al. The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients. *Science*. 2018;359(6371):104-108. doi: 10.1126/science.aao3290.
119. Rauch M, Lynch SV. The potential for probiotic manipulation of the gastrointestinal microbiome. *Current Opinion in Biotechnology*. 2011;23(2):192-201. doi: 10.1016/j.copbio.2011.11.004.
120. Faner R, Sibila O, Agustí A, et al. The microbiome in respiratory medicine: Current challenges and future perspectives. *The European respiratory journal*. 2017; 49(4):1602086. doi: 10.1183/13993003.02086-2016.
121. Xu H, Wang X, Feng W, et al. The gut microbiota and its interactions with cardiovascular disease. *Microb Biotechnol*. 2020. doi: 10.1111/1751-7915.13524.
122. Klassen JL. Defining microbiome function. *Nat Microbiol*. 2018;3(8):864-869. doi: 10.1038/s41564-018-0189-4.
123. Knight R, Vrbanac A, Taylor BC, et al. Best practices for analysing microbiomes. *Nat Rev Microbiol*. 2018;16(7):410-422. doi: 10.1038/s41579-018-0029-9.
124. den Besten G, Lange K, Havinga R, et al. Gut-derived short-chain fatty acids are vividly assimilated into host carbohydrates and lipids. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2013; 305(12):900. doi: 10.1152/ajpgi.00265.2013.
125. Ríos-Covián D, Ruas-Madiedo P, Margolles A, Gueimonde M, de Los Reyes-Gavilán CG, Salazar N. Intestinal short chain fatty acids and their link with diet and human health. *Front Microbiol*. 2016; 7:185. doi: 10.3389/fmicb.2016.00185.

126. Brown AJ, Goldsworthy SM, Barnes AA, et al. The orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *J Biol Chem.* 2003;278(13):11312-11319. doi: 10.1074/jbc.M211609200.
127. Kimura I, Ozawa K, Inoue D, et al. The gut microbiota suppresses insulin-mediated fat accumulation via the short-chain fatty acid receptor GPR43. *Nat Commun.* 2013; 4:1829. doi: 10.1038/ncomms2852.
128. Sina C, Gavrilova O, Förster M, et al. G protein-coupled receptor 43 is essential for neutrophil recruitment during intestinal inflammation. *J Immunol.* 2009;183(11):7514-7522. doi: 10.4049/jimmunol.0900063.
129. Usami M, Kishimoto K, Ohata A, et al. Butyrate and trichostatin A attenuate nuclear factor kappaB activation and tumor necrosis factor alpha secretion and increase prostaglandin E2 secretion in human peripheral blood mononuclear cells. *Nutr Res.* 2008;28(5):321-328. doi: 10.1016/j.nutres.2008.02.012.
130. Maslowski KM, Vieira AT, Ng A, et al. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature.* 2009;461(7268):1282-1286. doi: 10.1038/nature08530.
131. Manolis AA, Manolis TA, Melita H, Manolis AS. Gut microbiota and cardiovascular disease: Symbiosis versus dysbiosis. *Curr Med Chem.* 2022;29(23):4050-4077. doi: 10.2174/0929867328666211213112949.
132. Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE, et al. Heart disease and stroke statistics-2017 update: A report from the american heart association. *Circulation.* 2017;135(10):e146-e603. doi: 10.1161/CIR.0000000000000485.
133. Qin J, Li Y, Cai Z, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature.* 2012;490(7418):55-60. doi: 10.1038/nature11450.
134. Kelly TN, Bazzano LA, Ajami NJ, et al. Gut microbiome associates with lifetime cardiovascular disease risk profile among bogalusa heart study participants. *Circ Res.* 2016;119(8):956-964. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309219.
135. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. *Nature.* 2006;444(7122):1022-1023. doi: 10.1038/4441022a.
136. Serena C, Ceperuelo-Mallafré V, Keiran N, et al. Elevated circulating levels of succinate in human obesity are linked to specific gut microbiota. *ISME J.* 2018;12(7):1642-1657. doi: 10.1038/s41396-018-0068-2.

137. O'Donnell JA, Zheng T, Meric G, Marques FZ. The gut microbiome and hypertension. *Nat Rev Nephrol.* 2023;19(3):153-167. doi: 10.1038/s41581-022-00654-0.
138. Jama HA, Kaye DM, Marques FZ. The gut microbiota and blood pressure in experimental models. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2019;28(2):97-104. doi: 10.1097/MNH.0000000000000476.
139. Koeth RA, Wang Z, Levison BS, et al. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med.* 2013;19(5):576-585. doi: 10.1038/nm.3145.
140. Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature.* 2011;472(7341):57-63. doi: 10.1038/nature09922.
141. Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature.* 2011;472(7341):57-63. doi: 10.1038/nature09922.
142. Zhu W, Gregory JC, Org E, et al. Gut microbial metabolite TMAO enhances platelet hyperreactivity and thrombosis risk. *Cell.* 2016;165(1):111-124. doi: 10.1016/j.cell.2016.02.011.
143. Tang WHW, Wang Z, Levison BS, et al. Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. *N Engl J Med.* 2013;368(17):1575-1584. doi: 10.1056/NEJMoa1109400.
144. Pluznick JL, Protzko RJ, Gevorgyan H, et al. Olfactory receptor responding to gut microbiota-derived signals plays a role in renin secretion and blood pressure regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(11):4410-4415. doi: 10.1073/pnas.1215927110.
145. Pevsner-Fischer M, Blacher E, Tatirovsky E, Ben-Dov IZ, Elinav E. The gut microbiome and hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2017;26(1):1-8. doi: 10.1097/MNH.0000000000000293.
146. Yang T, Santisteban MM, Rodriguez V, et al. Gut dysbiosis is linked to hypertension. *Hypertension.* 2015;65(6):1331-1340. Accessed Jan 21, 2020. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05315.
147. Iraporda C, Errea A, Romanin DE, et al. Lactate and short chain fatty acids produced by microbial fermentation downregulate proinflammatory responses in intestinal epithelial cells and myeloid cells. *Immunobiology.* 2015;220(10):1161-1169. doi: 10.1016/j.imbio.2015.06.004.

148. Santisteban MM, Kim S, Pepine CJ, Raizada MK. Brain-gut-bone marrow axis: Implications for hypertension and related therapeutics. *Circ Res*. 2016;118(8):1327-1336. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.307709.
149. Netti V, Iovane A, Zotta E, Fellet A, Balaszczuk A. 6b.06: Cardiac AQP1 nitrosylation in response to osmotic stress induced by water restriction during postnatal growth. *Journal of Hypertension*. 2015; 33 Suppl 1 - ESH 2015 Abstract Book:e77. doi: 10.1097/01.hjh.0000467561.95712.8e.
150. Kahleova H, Levin S, Barnard ND. Vegetarian dietary patterns and cardiovascular disease. *Prog Cardiovasc Dis*. 2018;61(1):54-61. doi: 10.1016/j.pcad.2018.05.002.
151. Wang Z, Roberts AB, Buffa JA, et al. Non-lethal inhibition of gut microbial trimethylamine production for the treatment of atherosclerosis. *Cell*. 2015;163(7):1585-1595. doi: 10.1016/j.cell.2015.11.055.
152. Huang S, Frangogiannis NG. Anti-inflammatory therapies in myocardial infarction: Failures, hopes and challenges. *Br J Pharmacol*. 2018;175(9):1377-1400. doi: 10.1111/bph.14155.
153. Barritt DW, Jordan SC. Anticoagulant drugs in the treatment of pulmonary embolism. A controlled trial. *Lancet*. 1960;1(7138):1309-1312. doi: 10.1016/s0140-6736(60)92299-6.
154. Konstantinides SV, Barco S, Lankeit M, Meyer G. Management of pulmonary embolism. *Journal of the American College of Cardiology*. 2016;67(8):976. doi: 10.1016/j.jacc.2015.11.061.
155. Smyth R, Kabrhel C, Morris T. Treatment of intermediate-risk pulmonary embolism. *N Engl J Med*. 2023;389(2):184-187. doi: 10.1056/NEJMcide2301330.
156. Ageno W, Becattini C, Brighton T, Selby R, Kamphuisen PW. Cardiovascular risk factors and venous thromboembolism: A meta-analysis. *Circulation*. 2008;117(1):93-102. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.709204.
157. Schmidt M, Horvath-Puho E, Thomsen RW, Smeeth L, Sørensen HT. Acute infections and venous thromboembolism. *Journal of Internal Medicine*. 2012;271(6):608-618. doi: 10.1111/j.1365-2796.2011.02473.x.
158. Berghaus T, Witkowska A, Wagner T, Faul C, Schwaiblmair M, von Scheidt W. Obstructive sleep apnea might trigger acute pulmonary embolism: Results from a cohort study. *Clin Res Cardiol*. 2016;105(11):938-943. doi: 10.1007/s00392-016-1002-0.

159. Atzmony L, Grosfeld A, Saar N, Justo D. Inherited and acquired predispositions for thrombosis in immunocompetent patients with cytomegalovirus-associated thrombosis. *European Journal of Internal Medicine*. 2009;21(1):2-5. doi: 10.1016/j.ejim.2009.10.002.
160. Heit JA. Epidemiology of venous thromboembolism. *Nature Reviews Cardiology*. 2015;12(8):464-474. doi: 10.1038/nrcardio.2015.83.
161. Bělohávek J, Dytrych V, Linhart A. Pulmonary embolism, part I: Epidemiology, risk factors and risk stratification, pathophysiology, clinical presentation, diagnosis and nonthrombotic pulmonary embolism. *Experimental and clinical cardiology*. 2013;18(2):129.
162. García-Ortega A, Mañas E, López-Reyes R, et al. Obstructive sleep apnoea and venous thromboembolism: Pathophysiological links and clinical implications. *The European respiratory journal*. 2019; 53(2):1800893. doi: 10.1183/13993003.00893-2018.
163. Schwarz EI, Puhan MA, Schlatzer C, Stradling JR, Kohler M. Effect of CPAP therapy on endothelial function in obstructive sleep apnoea: A systematic review and meta-analysis. *Respirology*. 2015;20(6):889-895. doi: 10.1111/resp.12573.
164. Schwarz EI, Puhan MA, Schlatzer C, Stradling JR, Kohler M. Effect of CPAP therapy on endothelial function in obstructive sleep apnoea: A systematic review and meta-analysis. *Respirology*. 2015;20(6):889-895. doi: 10.1111/resp.12573.
165. Glynn RJ, Danielson E, Fonseca FA, et al. A randomized trial of rosuvastatin in the prevention of venous thromboembolism. *N Engl J Med*. 2009; 360(18):1851-1861. doi:10.1056/NEJMoa0900241
166. Shahin Y, Khan JA, Samuel N, Chetter I. Angiotensin converting enzyme inhibitors effect on endothelial dysfunction: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Atherosclerosis*. 2011; 216(1):7-16. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.02.044
167. Schmidt M, Cannegieter SC, Johannesdottir SA, Dekkers OM, Horváth-Puhó E, Sørensen HT. Statin use and venous thromboembolism recurrence: A combined nationwide cohort and nested case-control study. *J Thromb Haemost*. 2014;12(8):1207-1215. doi: 10.1111/jth.12604.
168. Biere-Rafi S, Hutten BA, Squizzato A, et al. Statin treatment and the risk of recurrent pulmonary embolism. *Eur Heart J*. 2013;34(24):1800-1806. doi: 10.1093/eurheartj/ehd046.
169. Siniscalchi C, Muriel A, Suriñach Caralt JM, et al. Statin use and 30-day mortality in patients with acute symptomatic pulmonary embolism. *J Thromb Haemost*. 2022;20(8):1839-1851. doi: 10.1111/jth.15753.

170. Samama M. An epidemiologic study of risk factors for deep vein thrombosis in medical outpatients: The sirius study. *Archives of Internal Medicine*. 2000;160(22):3415-3420. doi: 10.1001/archinte.160.22.3415.
171. Yildiz H, Zech F, Hainaut P. Venous thromboembolism associated with acute cytomegalovirus infection: Epidemiology and predisposing conditions. *Acta Clinica Belgica*. 2016;71(4):231-234. doi: 10.1080/17843286.2016.1177265.
172. Gok M, Kurtul A. A novel marker for predicting severity of acute pulmonary embolism: Systemic immune-inflammation index. *Scand Cardiovasc J*. 2021;55(2):91-96. doi: 10.1080/14017431.2020.1846774.
173. Bontekoe E, Brailovsky Y, Hoppensteadt D, et al. Upregulation of inflammatory cytokines in pulmonary embolism using biochip-array profiling. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2021; 27:10760296211013107. doi:10.1177/10760296211013107
174. Xue J, Ma D, Jiang J, Liu Y. Diagnostic and prognostic value of immune/inflammation biomarkers for venous thromboembolism: Is it reliable for clinical practice? *J Inflamm Res*. 2021; 14:5059-5077. doi: 10.2147/JIR.S327014.
175. Araz O, Yilmazel Ucar E, Yalcin A, et al. Predictive value of serum hs-CRP levels for outcomes of pulmonary embolism. *Clin Respir J*. 2016;10(2):163-167. doi: 10.1111/crj.12196.
176. Abul Y, Karakurt S, Ozben B, Toprak A, Celikel T. C-reactive protein in acute pulmonary embolism. *J Investig Med*. 2011;59(1):8-14. doi: 10.2310/jim.0b013e31820017f2.
177. D' Atri LP, Schattner M. Platelet toll-like receptors in thromboinflammation. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2017;22(11):1867-1883. doi: 10.2741/4576.
178. Wang T, Chen R, Liu C, et al. Attention should be paid to venous thromboembolism prophylaxis in the management of COVID-19. *Lancet Haematol*. 2020;7(5): e362-e363. doi:10.1016/S2352-3026(20)30109-5
179. Spor A, Koren O, Ley R. Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome. *Nat Rev Microbiol*. 2011;9(4):279-290. doi: 10.1038/nrmicro2540.
180. Aron-Wisnewsky J, Clément K. The gut microbiome, diet, and links to cardiometabolic and chronic disorders. *Nat Rev Nephrol*. 2016;12(3):169-181. doi: 10.1038/nrneph.2015.191.
181. Bubier JA, Chesler EJ, Weinstock GM. Host genetic control of gut microbiome composition. *Mamm Genome*. 2021;32(4):263-281. doi: 10.1007/s00335-021-09884-2.

182. Zhang Z, Chen H, Huang J, et al. Early administration of vancomycin inhibits pulmonary embolism by remodeling gut microbiota. *J Pers Med.* 2023;13(3):537. doi: 10.3390/jpm13030537.
183. Yang M, Luo P, Zhang F, Xu K, Feng R, Xu P. Large-scale correlation analysis of deep venous thrombosis and gut microbiota. *Front Cardiovasc Med.* 2022; 9:1025918. doi: 10.3389/fcvm.2022.1025918.
184. M Remy-Jardin, J Remy, L Wattinne, F Giraud. Central pulmonary thromboembolism: Diagnosis with spiral volumetric CT with the single-breath-hold technique--comparison with pulmonary angiography. *Radiology.* 1992;185(2):381-387. doi: 10.1148/radiology.185.2.1410342.
185. Value of the ventilation/perfusion scan in acute pulmonary embolism. results of the prospective investigation of pulmonary embolism diagnosis (PIOPED). *JAMA.* 1990;263(20):2753-2759. doi: 10.1001/jama.1990.03440200057023.
186. Clive Kearon, Jeffrey S. Ginsberg, Jack Hirsh. The role of venous ultrasonography in the diagnosis of suspected deep venous thrombosis and pulmonary embolism. *Annals of Internal Medicine.* 1998;129(12):1044. doi: 10.7326/0003-4819-129-12-199812150-00009.
187. Kucher N, Rossi E, De Rosa M, Goldhaber SZ. Prognostic role of echocardiography among patients with acute pulmonary embolism and a systolic arterial pressure of 90 mm hg or higher. *Archives of Internal Medicine.* 2005;165(15):1777-1781. doi: 10.1001/archinte.165.15.1777.
188. Kearon C, Ageno W, Cannegieter SC, Cosmi B, Geersing G-, Kyrle PA. Categorization of patients as having provoked or unprovoked venous thromboembolism: Guidance from the SSC of ISTH. *J Thromb Haemost.* 2016;14(7):1480-1483. doi: 10.1111/jth.13336.
189. Uresandi F, Monreal M, García-Bragado F, et al. National consensus on the diagnosis, risk stratification and treatment of patients with pulmonary embolism. spanish society of pneumology and thoracic surgery (SEPAR). society española internal medicine (SEMI). spanish society of thrombosis and haemostasis (SETH). spanish society of cardiology (ESC). spanish society of medicine accident and emergency (SEMES). spanish society of angiology and surgery vascular (SEACV). *Arch Bronconeumol.* 2013;49(12):534-547. doi: 10.1016/j.arbres.2013.07.008.
190. Iorio A, Kearon C, Filippucci E, et al. Risk of recurrence after a first episode of symptomatic venous thromboembolism provoked by a transient risk factor: A systematic review. *Arch Intern Med.* 2010;170(19):1710-1716. doi: 10.1001/archinternmed.2010.367.

191. Ageno W, Haas S, Weitz JI, et al. Characteristics and management of patients with venous thromboembolism: The GARFIELD-VTE registry. *Thromb Haemost.* 2019;119(2):319-327. doi: 10.1055/s-0038-1676611.
192. Ageno W, Farjat A, Haas S, et al. Provoked versus unprovoked venous thromboembolism: Findings from GARFIELD-VTE. *Res Pract Thromb Haemost.* 2021;5(2):326-341. doi: 10.1002/rth2.12482.
193. Monreal M, Jiménez D, Bikdeli B. RIETE registry: Past, present and future. *Arch Bronconeumol.* 2022;58(3):205-207. doi: 10.1016/j.arbres.2021.06.010.
194. Ortega AG, Jiménez D, Pedro-Tudela A, et al. Age-related differences in the presentation, management, and clinical outcomes of 100,000 patients with venous thromboembolism in the RIETE registry. *Arch Bronconeumol.* 2024;60(3):143-152. doi: 10.1016/j.arbres.2023.12.016.
195. Bikdeli B, Jimenez D, Hawkins M, et al. Rationale, design and methodology of the computerized registry of patients with venous thromboembolism (RIETE). *Thromb Haemost.* 2018;118(1):214-224. doi: 10.1160/TH17-07-0511.
196. Gatarek P, Kaluzna-Czaplinska J. Trimethylamine N-oxide (TMAO) in human health. *EXCLI J.* 2021; 20:301-319. doi:10.17179/excli2020-3239
197. Mirji G, Worth A, Bhat SA, et al. The microbiome-derived metabolite TMAO drives immune activation and boosts responses to immune checkpoint blockade in pancreatic cancer. *Sci Immunol.* 2022;7(75): eabn0704. doi: 10.1126/sciimmunol.abn0704.
198. Avendaño-Ortiz J, Lorente-Ros Á, Briones-Figueroa A, et al. Serological short-chain fatty acid and trimethylamine N-oxide microbial metabolite imbalances in young adults with acute myocardial infarction. *Heliyon.* 2023;9(10):e20854. doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e20854.
199. Zhao L, Ni Y, Su M, et al. High throughput and quantitative measurement of microbial metabolome by gas chromatography/mass spectrometry using automated alkyl chloroformate derivatization. *Anal Chem.* 2017;89(10):5565-5577. doi: 10.1021/acs.analchem.7b00660.
200. Zhao S, Li L. Dansylhydrazine isotope labeling LC-MS for comprehensive carboxylic acid submetabolome profiling. *Anal Chem.* 2018;90(22):13514-13522. doi: 10.1021/acs.analchem.8b03435.
201. Liu Q, Shepherd BE, Li C, Harrell FE. Modeling continuous response variables using ordinal regression. *Stat Med.* 2017;36(27):4316-4335. doi: 10.1002/sim.7433.

202. Makowski D, Ben-Shachar MS, Chen SHA, Lüdecke D. Indices of effect existence and significance in the bayesian framework. *Front Psychol.* 2019; 10:2767. doi: 10.3389/fpsyg.2019.02767.
203. Otero R, Lobo JL, López R, et al. Feasibility of a screening algorithm for chronic thromboembolic pulmonary hypertension: The OSIRIS study. *Thromb Res.* 2023; 228:1-9. doi: 10.1016/j.thromres.2023.05.005.
204. Hoffmann TW, Pham H, Bridonneau C, et al. Microorganisms linked to inflammatory bowel disease-associated dysbiosis differentially impact host physiology in gnotobiotic mice. *ISME J.* 2016;10(2):460-477. doi: 10.1038/ismej.2015.127.
205. Gurung M, Li Z, You H, et al. Role of gut microbiota in type 2 diabetes pathophysiology. *EBioMedicine.* 2020;51:102590. doi: 10.1016/j.ebiom.2019.11.051.
206. Hall AB, Yassour M, Sauk J, et al. A novel ruminococcus gnavus clade enriched in inflammatory bowel disease patients. *Genome Med.* 2017;9(1):103. doi: 10.1186/s13073-017-0490-5.
207. Holy EW, Forestier M, Richter EK, et al. Dietary α -linolenic acid inhibits arterial thrombus formation, tissue factor expression, and platelet activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(8):1772-1780. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.226118.
208. Reiner MF, Müller D, Gobbato S, et al. Gut microbiota-dependent trimethylamine-N-oxide (TMAO) shows a U-shaped association with mortality but not with recurrent venous thromboembolism. *Thrombosis Research.* 2019; 174:40-47. doi: 10.1016/j.thromres.2018.12.011.
209. Tang WHW, Wang Z, Fan Y, et al. Prognostic value of elevated levels of intestinal microbe-generated metabolite trimethylamine-N-oxide in patients with heart failure: Refining the gut hypothesis. *J Am Coll Cardiol.* 2014; 64(18):1908-1914. doi: 10.1016/j.jacc.2014.02.617.
210. Zhu W, Wang Z, Tang WHW, Hazen SL. Gut microbe-generated trimethylamine N-oxide from dietary choline is prothrombotic in subjects. *Circulation.* 2017;135(17):1671-1673. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.025338.
211. Zhu W, Gregory JC, Org E, et al. Gut microbial metabolite TMAO enhances platelet hyperreactivity and thrombosis risk. *Cell.* 2016;165(1):111-124. doi: 10.1016/j.cell.2016.02.011.
212. von Brühl M, Stark K, Steinhart A, et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med.* 2012;209(4):819-835. doi: 10.1084/jem.20112322.

213. Stevens SM, Woller SC, Kreuziger LB, et al. Antithrombotic therapy for VTE disease: Second update of the CHEST guideline and expert panel report. *Chest*. 2021;160(6):e545-e608. doi: 10.1016/j.chest.2021.07.055.
214. Weitz JI, Lensing AWA, Prins MH, et al. Rivaroxaban or aspirin for extended treatment of venous thromboembolism. *N Engl J Med*. 2017;376(13):1211-1222. doi: 10.1056/NEJMoa1700518.
215. Schiattarella GG, Sannino A, Toscano E, et al. Gut microbe-generated metabolite trimethylamine-N-oxide as cardiovascular risk biomarker: A systematic review and dose-response meta-analysis. *Eur Heart J*. 2017;38(39):2948-2956. doi: 10.1093/eurheartj/ehx342.
216. Han Y, Gong Z, Sun G, et al. Dysbiosis of gut microbiota in patients with acute myocardial infarction. *Front Microbiol*. 2021; 12:680101. doi: 10.3389/fmicb.2021.680101.
217. Chiu F, Tsai C, Huang P, et al. The gut microbiome, seleno-compounds, and acute myocardial infarction. *J Clin Med*. 2022; 11(5):1462. doi: 10.3390/jcm11051462.
218. Prandoni P, Bilora F, Marchiori A, et al. An association between atherosclerosis and venous thrombosis. *N Engl J Med*. 2003;348(15):1435-1441. doi: 10.1056/NEJMoa022157.
219. Piazza G, Goldhaber SZ. Venous thromboembolism and atherothrombosis: An integrated approach. *Circulation*. 2010;121(19):2146-2150. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.951236.
220. Spencer FA, Ginsberg JS, Chong A, Alter DA. The relationship between unprovoked venous thromboembolism, age, and acute myocardial infarction. *J Thromb Haemost*. 2008;6(9):1507-1513doi: 10.1111/j.1538-7836.2008.03062.x.
221. Steffen LM, Cushman M, Peacock JM, et al. Metabolic syndrome and risk of venous thromboembolism: Longitudinal investigation of thromboembolism etiology. *J Thromb Haemost*. 2009;7(5):746-751. doi: 10.1111/j.1538-7836.2009.03295.x.
222. Stewart LK, Kline JA. Metabolic syndrome increases risk of venous thromboembolism recurrence after acute pulmonary embolism. *Ann Am Thorac Soc*. 2020;17(7):821-828. doi: 10.1513/AnnalsATS.201907-518OC.
223. Steffen LM, Folsom AR, Cushman M, Jacobs DR, Rosamond WD. Greater fish, fruit, and vegetable intakes are related to lower incidence of venous thromboembolism: The longitudinal investigation of thromboembolism etiology. *Circulation*. 2007;115(2):188-195. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.641688

224. Duan Q, Lv W, Wang L, et al. mRNA expression of interleukins and Th1/Th2 imbalance in patients with pulmonary embolism. *Mol Med Rep.* 2013;7(1):332-336. doi: 10.3892/mmr.2012.1142.
225. Galeano-Valle F, Ordieres-Ortega L, Oblitas CM, Del-Toro-Cervera J, Alvarez-Sala-Walther L, Demelo-Rodríguez P. Inflammatory biomarkers in the short-term prognosis of venous thromboembolism: A narrative review. *Int J Mol Sci.* 2021;22(5):2627. doi: 10.3390/ijms22052627.
226. Eagleton MJ, Henke PK, Luke CE, et al. Southern association for vascular surgery william J. von leibig award. inflammation and intimal hyperplasia associated with experimental pulmonary embolism. *J Vasc Surg.* 2002;36(3):581-588. doi: 10.1067/mva.2002.126556.
227. Kerr R, Stirling D, Ludlam CA. Interleukin 6 and haemostasis. *Br J Haematol.* 2001;115(1):3-12. doi: 10.1046/j.1365-2141.2001.03061.x.
228. Vormittag R, Hsieh K, Kaider A, et al. Interleukin-6 and interleukin-6 promoter polymorphism (-174) G > C in patients with spontaneous venous thromboembolism. *Thromb Haemost.* 2006;95(5):802-806.
229. Steppich BA, Hassenpflug M, Braun SL, et al. Circulating tissue factor and microparticles are not increased in patients with deep vein thrombosis. *Vasa.* 2011;40(2):117-122. doi: 10.1024/0301-1526/a000081.
230. Poredos P, Jezovnik MK. The role of inflammation in venous thromboembolism and the link between arterial and venous thrombosis. *Int Angiol.* 2007;26(4):306-311.
231. Liapi M, Jayne D, Merkel PA, Segelmark M, Mohammad AJ. Venous thromboembolism in ANCA-associated vasculitis: A population-based cohort study. *Rheumatology (Oxford).* 2021;60(10):4616-4623. doi: 10.1093/rheumatology/keab057.
232. Stadnicki A, Stadnicka I. Venous and arterial thromboembolism in patients with inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol.* 2021;27(40):6757-6774. doi: 10.3748/wjg.v27.i40.6757.
233. Ungprasert P, Koster MJ, Thongprayoon C, Warrington KJ. Risk of venous thromboembolism among patients with vasculitis: A systematic review and meta-analysis. *Clin Rheumatol.* 2016;35(11):2741-2747. doi: 10.1007/s10067-016-3394-7.
234. García-Ortega A, Oscullo G, Calvillo P, et al. Incidence, risk factors, and thrombotic load of pulmonary embolism in patients hospitalized for COVID-19 infection. *J Infect.* 2021;82(2):261-269. doi: 10.1016/j.jinf.2021.01.003.

235. Anghel L, Sascău R, Radu R, Stătescu C. From classical laboratory parameters to novel biomarkers for the diagnosis of venous thrombosis. *Int J Mol Sci.* 2020;21(6):1920. doi: 10.3390/ijms21061920.
236. Büyüksirin M, Anar C, Polat G, Karadeniz G. Can the level of CRP in acute pulmonary embolism determine early mortality? *Turk Thorac J.* 2021;22(1):4-10. doi: 10.5152/TurkThoracJ.2020.19048.
237. Le Mao R, Orione C, de Moreuil C, et al. Risk stratification for predicting recurrent venous thromboembolism after discontinuation of anticoagulation: A post hoc analysis of a french prospective multicentre study. *Eur Respir J.* 2022;60(3):2103002. doi: 10.1183/13993003.03002-2021.
238. Bova C, Sanchez O, Prandoni P, et al. Identification of intermediate-risk patients with acute symptomatic pulmonary embolism. *Eur Respir J.* 2014;44(3):694-703. doi: 10.1183/09031936.00006114.
239. Buller HR, van Doormaal FF, van Sluis GL, Kamphuisen PW. Cancer and thrombosis: From molecular mechanisms to clinical presentations. *J Thromb Haemost.* 2007; 5 Suppl 1:246-254. doi: 10.1111/j.1538-7836.2007.02497.x.
240. Horsted F, West J, Grainge MJ. Risk of venous thromboembolism in patients with cancer: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Med.* 2012; 9(7):e1001275. doi: 10.1371/journal.pmed.1001275.
241. Rajagopala SV, Vashee S, Oldfield LM, et al. The human microbiome and cancer. *Cancer Prev Res (Phila).* 2017;10(4):226-234. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-16-0249.
242. Cullin N, Azevedo Antunes C, Straussman R, Stein-Thoeringer CK, Elinav E. Microbiome and cancer. *Cancer Cell.* 2021;39(10):1317-1341. doi: 10.1016/j.ccell.2021.08.006.
243. Rossi T, Vergara D, Fanini F, Maffia M, Bravaccini S, Pirini F. Microbiota-derived metabolites in tumor progression and metastasis. *Int J Mol Sci.* 2020;21(16):5786. doi: 10.3390/ijms21165786.
244. Otero R, Solier-López A, Sánchez-López V, et al. Biomarkers of Venous Thromboembolism Recurrence after Discontinuation of Low Molecular Weight Heparin Treatment for Cancer-Associated Thrombosis (HISPALIS-Study). *Cancers (Basel).* 2022;14(11):2771. doi:10.3390/cancers14112771