

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 362**

51 Int. Cl.:

G01N 33/92 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.06.2012** **E 12171573 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.02.2016** **EP 2674762**

54 Título: **PC-O 42:4 - Un biomarcador de la adiposidad visceral**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.03.2016

73 Titular/es:

NESTEC S.A. (100.0%)
Avenue Nestlé 55
1800 Vevey, CH

72 Inventor/es:

MARTIN, FRANÇOIS-PIERRE;
MONTOLIU ROURA, IVAN;
GUY, PHILIPPE ALEXANDRE y
REZZI, SERGE ANDRÉ DOMINIQUE

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 564 362 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

PC-O 42:4 - Un biomarcador de la adiposidad visceral

5 La presente invención se refiere en general al campo de los biomarcadores. En particular la presente invención se refiere a biomarcadores tales como 1-O-alkil-2-acilglicerofosfolina (PC-O) 42:4, que pueden usarse, por ejemplo, para detectar y/o cuantificar la adiposidad visceral y/o sus variaciones. Este biomarcador también se puede usar para diagnosticar el efecto de un cambio de estilo de vida en la adiposidad visceral de un sujeto.

10 El continuo aumento del sobrepeso y de la obesidad epidémica, en particular entre los niños, ha hecho que el desciframiento de sus fenotipos relacionados con el genoma y el metaboloma sea uno de los mayores desafíos de la salud pública. Aunque la malnutrición y la obesidad definida por el índice de masa corporal (IMC) disminuyen de manera importante la esperanza de vida, es evidente que el IMC tiene considerables limitaciones para evaluar la composición corporal y le falta sensibilidad para estimar los riesgos de enfermedad (Dulloo, A. G., y otros (2010) Int. J. Obes. (Lond) 34 Suppl 2, S4-17. Dullo y otros revisaron recientemente los últimos avances en conceptos sobre los riesgos sanitarios relacionados con los fenotipos de composición corporal, incluyendo (i) la división del IMC entre un índice (MG/E2) de masa grasa (MG) y un índice (MLG/E2) de masa libre de grasa (MLG), (ii) la división de la MLG entre masa orgánica y masa muscular esquelética, (iii) la división de la MG entre grasa peligrosa y grasa protectora, y (iv) la interacción entre la expansibilidad del tejido adiposo y la deposición ectópica de grasa dentro o alrededor de los órganos/tejidos que constituyen la masa muscular magra (Dulloo, A. G., y otros (2010) Int. J. Obes. (Lond) 34 Suppl 2, S4-17.

25 En los últimos decenios numerosas investigaciones han identificado genes y factores de transcripción relacionados con el almacenamiento de grasa y la obesidad mediante el uso de tecnologías del estado técnico (Viguerie, N., y otros (2005) Diabetologia 48, 123-131; Viguerie, N., y otros (2005) Biochimie 87, 117-123; Sorensen, T. I. y otros (2006) PLoS. Clin. Trials 1, e12; Klannemark, M., y otros, (1998) Diabetologia 41, 1516-1522; Clement, K. y otros (2007) J. Intern. Med. 262, 422-430), genetic inheritability [*heredabilidad genética*] (Teran-Garcia, M. Y otros (2007) Appl. Physiol Nutr. Metab 32, 89-114) y han planteado que la flora microbiana del intestino humano puede influir en la incidencia de la obesidad (Backhed, F., y otros (2007) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 104, 979-984; Ley, R., y otros (2006) Nature 444, 1022-1023; Turnbaugh, P., y otros (2006) Nature 444, 1027-1031).

30 Sin embargo, en ambientes obesogénicos y diabetogénicos semejantes muchos individuos continúan siendo metabólicamente sanos y resistentes a los riesgos de enfermedades cardiovasculares (ECV) relacionados con la adiposidad. Aunque es sabido que los riesgos de enfermedad cardiovascular relacionados con la obesidad pueden ser diversos (Wildman, R. P., y otros (2008) Arch. Intern. Med. 168, 1617-1624), hay un número creciente de sujetos de peso normal (índice de masa corporal, IMC < 25) que expresan anomalías cardiometabólicas anteriormente consideradas específicas de los estados de sobrepeso y obesidad. Las pruebas más recientes indican cómo una composición corporal regioespecífica puede determinar la predisposición individual a enfermedades metabólicas, al existir una correlación entre la distribución de la grasa corporal, en particular de la grasa visceral, y un mayor riesgo de trastornos cardiometabólicos, diabetes, hipertensión, enfermedad del hígado graso no alcohólico y mortalidad.

35 La adiposidad visceral se controla clínicamente mediante mediciones de cintura y cadera (p.ej. > 0,9 para hombres y > 0,85 para mujeres), que sin embargo tienen unas limitaciones análogas, sobre todo en las poblaciones obesas. Actualmente hay tecnologías de referencia, incluyendo la toma de imágenes por resonancia magnética (IRM) y por tomografía computarizada (TC), que cuantifican regioespecíficamente con gran exactitud los depósitos de grasa visceral. No obstante, la valoración del metabolismo asociado a la grasa visceral continúa siendo un reto especial debido a la falta de biomarcadores no invasivos rápidos y fiables que se puedan usar en estudios epidemiológicos y a las limitaciones de los métodos analíticos convencionales, que no son adecuados para el análisis holístico del metabolismo.

40 El exceso de grasa almacenada en el tronco o en las regiones androides podría ser metabólicamente menos sano que la grasa acumulada en la zona ginoide, siendo la resistencia a la insulina el principal mecanismo causante. Por lo tanto la estratificación del paciente es necesaria para un control nutricional y terapéutico personalizado, pero su aplicación es cuestionable cuando los sujetos tienen una proporción similar entre cintura y cadera, y el acceso a los equipos de escaneo es limitado. Por consiguiente se necesitan urgentemente biomarcadores que permitan evaluar la presencia de grasa visceral, el metabolismo relacionado con la grasa visceral y/o sus cambios de manera simple y fiable.

45 Los presentes inventores han abordado esta necesidad.

50 Así el objetivo de la presente invención era mejorar el estado técnico y proporcionar biomarcadores que cumplieran el objetivo de la presente invención y/o permitir la superación de al menos una de las desventajas del estado técnico actual.

55 La patente EP2249161 A1 revela un método para diagnosticar asfixia. Se revela un gran número de compuestos específicos de la asfixia, incluyendo la fosfatidilcolina con un radical acil-alkilo en proporción C44:4.

Oberbach y otros, J. Proteome Res., 10(10), 2011, páginas 4769-4788, revelan un perfilado proteómico y metabólico combinado del suero, para identificar marcadores de los cambios de masa corporal.

5 La patente EP 2172775 A1 identifica aminoácidos que sirven para discriminar un grupo de sujetos con acumulación de grasa visceral de un grupo de sujetos sin acumulación de grasa visceral.

Para identificar biomarcadores apropiados los presentes inventores han empleado un método metabonómico.

10 La metabonómica se considera actualmente un enfoque bien establecido del sistema para caracterizar el fenotipo metabólico, que incluye la influencia de varios factores tales como los ambientales, los fármacos, los dietéticos, el estilo de vida, los genéticos y los microbiómicos. A diferencia de la expresión genética y de los datos proteómicos, que indican el potencial de cambios fisiológicos, los metabolitos y sus cambios dinámicos de concentración dentro de las células, tejidos y órganos representan los puntos finales reales de los procesos de regulación fisiológica.

15 Los recientes descubrimientos basados en metabolómica y lipidómica han acelerado nuestra comprensión de los procesos patológicos y proporcionarán nuevas vías para prevenir y controlar los trastornos subclínicos relacionados con el síndrome metabólico.

20 Los presentes inventores pretenden proporcionar un fenotipo metabólico completo de una composición corporal regioespecífica: adiposidad visceral. Esto ha permitido la identificación de marcadores biológicos específicos de la adiposidad visceral.

25 En el presente estudio se investigó el metabolismo relacionado con la adiposidad visceral en una cohorte de 40 mujeres obesas sanas, midiendo varios puntos finales metabólicos en combinación con la cuantificación in vivo de la composición corporal por absorciometría de rayos X de energía dual (DXA) y la distribución de la grasa abdominal por tomografía computarizada (TC).

30 Utilizando una combinación de espectroscopia de resonancia magnética nuclear protónica (RMN H¹) y perfiles de muestras de plasma y de orina de 24 horas recogidas a lo largo del tiempo analizados por LC-MS/MS selectiva, los presentes inventores han identificado nuevos biomarcadores de la distribución de la grasa visceral en esta cohorte obesa bien definida, con diferentes patrones de depósito de grasa visceral.

Los presentes inventores han identificado como tal un biomarcador, la PC-O 42:4.

35 PC-O 42:4 es 1-O-alkil-2-acilglicerofosfolina.

40 Las especies lípidas individuales se registraron del modo siguiente: [clase de lípido] [número total de átomos de carbono] : [número total de dobles enlaces]. Así, por ejemplo, PC 34:1 refleja un compuesto de fosfatidilcolina que comprende 34 átomos de carbono y un doble enlace.

Por lo tanto PC-O 42:4 es 1-O-alkil-2-acilglicerofosfolina 42:4.

45 Además los presentes inventores han encontrado que la PC-O 42:4 se puede usar como biomarcador para detectar y/o cuantificar la adiposidad visceral y/o cambios en la misma. Este método diagnóstico se pone en práctica fuera del cuerpo humano o animal.

Esta detección y/o cuantificación del biomarcador se puede realizar en un líquido corporal que puede ser sangre, plasma sanguíneo, suero sanguíneo u orina, por ejemplo.

50 La etapa de detección y/o cuantificación del biomarcador suele efectuarse en una muestra de fluido corporal que se obtiene previamente del sujeto examinado.

55 La grasa visceral también se conoce como grasa abdominal, grasa orgánica o grasa intra-abdominal y se encuentra dentro de la cavidad abdominal, entre los órganos.

60 La grasa visceral puede estar compuesta de varios depósitos adiposos, incluyendo los mesentéricos, los del tejido adiposo blanco epididimal (TABE) y los perirrenales, así como el tejido adiposo epicárdico y la grasa alrededor del hígado y del estómago. La grasa en el abdomen es sobre todo visceral y a menudo da lugar a la famosa "barriga cervicera".

Demasiada grasa visceral da como resultado la obesidad central, que a su vez está relacionada con trastornos cardiovasculares, diabetes tipo 2, resistencia a la insulina o enfermedades inflamatorias, por ejemplo. Estos son ejemplos de trastornos asociados al exceso de grasa visceral.

65 La presente invención también se refiere a un método para diagnosticar la adiposidad visceral en un sujeto, que consiste en determinar el nivel de 1-O-alkil-2-acilglicerofosfolina (PC-O) 42:4 en una muestra de fluido corporal

obtenida previamente de un sujeto sometido a examen y comparar el nivel de PC-O 42:4 del sujeto con un valor de referencia predeterminado, el cual está basado en un nivel promedio de PC-O 42:4 en el mismo fluido corporal de una población de control, de manera que un nivel de PC-O 42:4 en la muestra menor que el valor de referencia predeterminado indica un aumento de la adiposidad visceral.

5 La adiposidad visceral puede incluir grasa mesentérica, tejido adiposo blanco epididimal y/o grasa perirrenal, así como tejido adiposo epicárdico y grasa alrededor del hígado y del estómago.

10 El fluido corporal puede ser sangre, suero sanguíneo, plasma sanguíneo u orina, por ejemplo.

El suero sanguíneo y/o el plasma sanguíneo tienen la ventaja de que la relación de señal a ruido del biomarcador analizado es particularmente alta.

15 La orina tiene la ventaja de que la muestra de fluido corporal se puede obtener de manera no invasiva.

Independientemente del fluido corporal escogido, el método de la presente invención tiene la ventaja de que la obtención de dichos fluidos corporales de un sujeto es un procedimiento bien establecido.

20 El método diagnóstico en sí se aplica luego con una muestra de fluido corporal fuera del cuerpo.

El nivel de PC-O 42:4 en la muestra se puede detectar y cuantificar por cualquier medio conocido del estado técnico. Se puede usar por ejemplo la espectroscopia de masas, p.ej. UPLC-ESI-MS/MS. Asimismo se pueden emplear otros procedimientos tales como métodos espectroscópicos alternativos, métodos cromatográficos, técnicas de marcaje o métodos químicos cuantitativos.

25 El nivel de PC-O 42:4 en la muestra y el valor de referencia se determinan preferiblemente por el mismo método.

30 El valor de referencia predeterminado puede estar basado en un nivel promedio de PC-O 42:4 analizado en el fluido corporal de una población de control. La población de control puede ser un grupo de al menos 3, con preferencia de al menos 10, con mayor preferencia de al menos 50 personas de similar contexto genético, edad y estado general de salud.

35 La población de control también puede ser la misma persona, obteniendo el valor de referencia predeterminado previamente del mismo sujeto. Esto permite comparar directamente el efecto en la adiposidad visceral de un estilo de vida actual con uno anterior, por ejemplo, y valorar también directamente las mejoras.

La determinación de la adiposidad por grasa visceral permite deducir su presencia y el riesgo de adquirir trastornos relacionados con ella.

40 El contenido de la presente invención también se refiere a un método para diagnosticar un cambio en la adiposidad visceral de un sujeto, que consiste en determinar el nivel de PC-O 42:4 en una muestra de fluido corporal obtenida con anterioridad de un sujeto examinado y en comparar el nivel de PC-O 42:4 del sujeto con un valor de referencia predeterminado, el cual está basado en un nivel de PC-O 42:4 en el mismo fluido corporal obtenido previamente del mismo sujeto, de manera que un nivel de PC-O 42:4 en la muestra menor que el valor de referencia predeterminado indica un aumento de la adiposidad visceral.

45 Este método permite hacer un seguimiento de la acumulación o reducción de la grasa visceral a lo largo del tiempo y por lo tanto sacar conclusiones sobre los mayores o menores riesgos de desarrollar trastornos relacionados con la adiposidad visceral.

50 Esto tiene por ejemplo la ventaja de disponer de resultados inmediatos, mucho antes de que se pueda determinar un incremento o reducción real de la grasa visceral, lo cual es particularmente bueno para motivar a las personas que aspiran a reducir la grasa visceral. La reducción de la grasa visceral es una tarea especialmente difícil que suele requerir ejercicio intenso. Ohkawara y otros sugieren que se necesitan al menos 10 horas semanales de equivalente metabólico de actividad (MET) de ejercicio aeróbico para una reducción efectiva de la grasa visceral (Ohkawara, K.; y otros, (2007), International journal of obesity (2005) 31 (12): 1786-1797).

55 La presente invención también se refiere a un método para diagnosticar el efecto de un cambio de estilo de vida en la adiposidad visceral de un sujeto, que consiste en determinar el nivel de PC-O 42:4 en una muestra de fluido corporal obtenida con anterioridad de un sujeto sometido a examen y comparar el nivel de PC-O 42:4 del sujeto con un valor de referencia predeterminado que está basado en un nivel de PC-O 42:4 en el mismo fluido corporal obtenido previamente del mismo sujeto, de manera que un nivel de PC-O 42:4 en la muestra menor que el valor de referencia predeterminado indica un efecto positivo del cambio de estilo de vida en la adiposidad visceral.

60 Este método permite controlar el efecto de los cambios de estilo de vida en la masa grasa visceral y en los riesgos de trastornos relacionados.

El cambio de estilo de vida puede ser cualquier variación, por ejemplo un nuevo trabajo, un nivel de estrés diferente, una nueva relación, aumentos o disminuciones de la actividad física y/o un cambio en el bienestar general.

Por ejemplo, el cambio de estilo de vida puede ser una variación de la dieta.

5 El cambio de dieta puede ser un aumento o reducción del contenido de carbohidratos, lípidos y/o proteínas. Puede ser un cambio a una dieta regional diferente como la mediterránea, por ejemplo. También puede ser un cambio en la ingesta total de calorías.

10 El método como tal se puede emplear para probar la efectividad de un nuevo régimen nutricional, de productos nutricionales y/o de medicamentos.

Los productos nutricionales pueden ser por ejemplo aquellos que aseguran tener un efecto en la grasa corporal, en el control del peso y/o en la grasa visceral.

15 Los productos nutricionales serían típicamente productos alimenticios, bebidas, comida para mascotas, suplementos alimenticios, productos nutracéuticos, aditivos alimentarios o fórmulas nutricionales.

20 Por ejemplo, el cambio dietético puede ser el uso de al menos un producto nutricional no consumido anteriormente o consumido en cantidades diferentes.

Como tal, el método de la presente invención se puede utilizar para probar la efectividad de un nuevo régimen nutricional y/o de un producto nutricional.

25 La PC-O 42:4 se puede utilizar como el único marcador para el propósito de la presente invención.

Aunque la PC-O 42:4 como marcador único es una herramienta eficaz para el método diagnóstico de la presente invención, la calidad y/o el poder predictivo de dicho diagnóstico mejora basándolo en más de un solo marcador.

30 Por lo tanto, para diagnosticar la adiposidad visceral y/o el riesgo de trastornos asociados en un sujeto se puede usar uno o más marcadores alternativos en combinación con la PC-O 42:4.

Los presentes inventores se sorprendieron al ver que también se podían usar otros biomarcadores para diagnosticar la adiposidad visceral y/o el riesgo de trastornos asociados.

35 Así, los presentes inventores han comprobado que los descensos de las concentraciones de PC-O 44:6, PC-O 44:4, PC-O 42:4, PC-O 40:4 y/o PC-O 40:3 en los fluidos corporales y/o los aumentos de las concentraciones de tirosina y/o de glutamina en los fluidos corporales permiten diagnosticar un incremento de las cantidades de grasa visceral y/o un mayor riesgo de desarrollar trastornos relacionados con el exceso de grasa visceral.

40 Inversamente, los aumentos de las concentraciones de PC-O 44:6, PC-O 44:4, PC-O 42:4, PC-O 40:4 y/o PC-O 40:3 en los fluidos corporales y/o los descensos de las concentraciones de tirosina y/o de glutamina en los fluidos corporales permiten diagnosticar una disminución de las cantidades de grasa visceral y/o un menor riesgo de desarrollar trastornos relacionados con el exceso de grasa visceral.

45 Por consiguiente los métodos de la presente invención pueden incluir las etapas adicionales de determinación del nivel de al menos otro biomarcador escogido del grupo formado por glutamina y/o tirosina, PC-O 44:4, PC-O 44:6, PC-O 40:4 y/o PC-O 40:3 en la muestra de fluido corporal y comparar el nivel en el sujeto de al menos uno de los biomarcadores glutamina y/o tirosina, PC-O 44:4, PC-O 44:6, PC-O 40:4 y/o PC-O 40:3 con un valor de referencia predeterminado, basado en niveles promedio de glutamina, tirosina, PC-O 44:4, PC-O 44:6, PC-O 40:4 y/o PC-O 40:3 en una muestra de fluido corporal de una población de control sana normal o en niveles glutamina, tirosina, PC-O 44:4, PC-O 44:6, PC-O 40:4 y/o PC-O 40:3 en el mismo fluido corporal obtenido anteriormente del mismo sujeto, de manera que un aumento del nivel de glutamina y/o tirosina y/o un descenso del nivel de PC-O 44:6, PC-O 44:4, PC-O 42:4, PC-O 40:4 y/o PC-O 40:3 en la muestra de fluido corporal, en comparación con los valores de referencia predeterminados, indica una mayor adiposidad visceral.

El método de la presente invención puede consistir en determinar al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6 o al menos 7 biomarcadores.

60 Por ejemplo, la PC-O 42:4 se puede determinar junto con PC-O 44:4.

La PC-O 42:4 también se puede determinar junto con PC-O 44:6.

La PC-O 42:4 también se puede determinar junto con PC-O 40:4.

65 La PC-O 42:4 también se puede determinar junto con PC-O 40:3.

La PC-O 42:4 también se puede determinar junto con PC-O 44:4 y PC-O 44:6.

La PC-O 42:4 también se puede determinar junto con PC-O 44:4, PC-O 44:6 y PC-O 40:4.

5 La PC-O 42:4 también se puede determinar junto con PC-O 44:4, PC-O 44:6 y PC-O 40:3.

La PC-O 42:4 también se puede determinar junto con PC-O 44:4, PC-O 44:6, PC-O 40:3 y PC-O 40:4.

10 La PC-O 42:4 también se puede determinar junto con PC-O 44:4, PC-O 44:6, PC-O 40:3, PC-O 40:4 y glutamina.

La PC-O 42:4 también se puede determinar junto con PC-O 44:4, PC-O 44:6, PC-O 40:3, PC-O 40:4, glutamina y tirosina.

15 La ventaja de determinar más de un biomarcador es que cuantos más biomarcadores se midan, más fiable será el diagnóstico. Si p.ej. más de 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 biomarcadores muestran aumentos o descensos de concentración, tal como se ha descrito arriba, el poder predictivo de la presencia o ausencia y del grado de adiposidad visceral, así como del riesgo de trastornos asociados será mayor.

20 De acuerdo con ello los presentes inventores han identificado aún otros biomarcadores que pueden utilizarse para predecir la adiposidad visceral y el riesgo de desarrollar trastornos asociados.

25 Por ejemplo, se encontró que las mayores concentraciones de fenilalanina, leucina, isoleucina, palmitoíl-carnitina (C16), caproíl-carnitina (C10), octenoíl-carnitina (C8:1), lisofosfatidilcolina (LPC) 24:0, fosfatidilcolina (PC) PC 30:0 y/o PC 34:4 en los fluidos corporales o las menores concentraciones de PC-O 34:1, PC-O 34:2, PC-O 36:2, PC-O 36:3, PC-O 40:6, PC-O 42:2, PC-O 42:3, PC-O 44:3, PC-O 44:5, PC 42:0 y/o PC 42:2 en los fluidos corporales respecto a unos valores de referencia correspondientes obtenidos previamente indican un aumento de la adiposidad visceral y un mayor riesgo de trastornos asociados.

30 PC es fosfatidilcolina. LPC es lisofosfatidilcolina. C es acil-carnitina.

En cambio las menores concentraciones de fenilalanina, leucina, isoleucina, C10 (decanoíl-carnitina), C16 (palmitoíl-carnitina), C8:1 (octenoíl-carnitina), LPC 24:0, PC 30:0 y/o PC 34:4 en los fluidos corporales o las mayores concentraciones de PC-O 34:1, PC-O 34:2, PC-O 36:2, PC-O 36:3, PC-O 40:6, PC-O 42:2, PC-O 42:3, PC-O 44:3, PC-O 44:5, PC 42:0 y/o PC 42:2 en los fluidos corporales respecto a unos valores de referencia correspondientes obtenidos previamente indican un descenso de la adiposidad visceral y un menor riesgo de trastornos asociados.

40 Por consiguiente los métodos de la presente invención pueden incluir además las etapas de determinar el nivel de al menos otro biomarcador escogido del grupo formado por fenilalanina, leucina, isoleucina, C10 (decanoíl-carnitina), C16 (palmitoíl-carnitina), C8:1 (octenoíl-carnitina), LPC 24:0, PC 30:0, PC 34:4, PC-O 34:1, PC-O 34:2, PC-O 36:2, PC-O 36:3, PC-O 40:6, PC-O 42:2, PC-O 42:3, PC-O 44:3, PC-O 44:5, PC 42:0 y/o PC 42:2 en la muestra de fluido corporal y comparar el nivel en el sujeto de al menos uno de los biomarcadores fenilalanina, leucina, isoleucina, C10, C16, C8:1, carnitina, LPC 24:0, PC 30:0, PC 34:4, PC-O 34:1, PC-O 34:2, PC-O 36:2, PC-O 36:3, PC-O 40:6, PC-O 42:2, PC-O 42:3, PC-O 44:3, PC-O 44:5, PC 42:0 y/o PC 42:2 en una muestra de fluido corporal de una población de control sana normal o en los niveles de fenilalanina, leucina, isoleucina, C10 (decanoíl-carnitina), C16 (palmitoíl-carnitina), C8:1 (octenoíl-carnitina), LPC 24:0, PC 30:0, PC 34:4, PC-O 34:1, PC-O 34:2, PC-O 36:2, PC-O 36:3, PC-O 40:6, PC-O 42:2, PC-O 42:3, PC-O 44:3, PC-O 44:5, PC 42:0 y/o PC 42:2 en el mismo fluido corporal obtenido previamente del mismo sujeto, de manera que un mayor nivel de fenilalanina, leucina, isoleucina, C10, C16, C8:1, carnitina, LPC 24:0, PC 30:0 y/o PC 34:4 en el fluido corporal y/o un menor nivel de PC-O 34:1, PC-O 34:2, PC-O 36:2, PC-O 36:3, PC-O 40:6, PC-O 42:2, PC-O 42:3, PC-O 44:3, PC-O 44:5, PC 42:0 y/o PC 42:2 en la muestra de fluido corporal respecto a los valores de referencia predeterminados indica un aumento de la adiposidad visceral.

55 Una mayor adiposidad visceral incrementa el riesgo de desarrollar trastornos relacionados con el exceso de grasa visceral.

60 Por lo tanto, en los métodos de la presente invención el grado de adiposidad visceral se puede usar como indicación de la probabilidad de desarrollar trastornos relacionados con el exceso de grasa visceral.

Los cambios en la adiposidad visceral también se pueden usar como indicación de una mayor o menor probabilidad de desarrollar trastornos relacionados con el exceso de grasa visceral.

65 Los trastornos relacionados con la adiposidad visceral son por ejemplo de tipo cardiometabólico.

Por lo tanto los métodos de la presente invención se pueden usar para determinar el riesgo de desarrollar trastornos cardiometabólicos. Otros trastornos relacionados con la adiposidad visceral son por ejemplo las desregulaciones metabólicas. Como típicas desregulaciones metabólicas cabe citar las siguientes: obesidad, resistencia a la insulina, diabetes tipo 2, síndrome metabólico, enfermedades vasculares (hipertensión, enfermedades cardíacas coronarias), esteatohepatitis en la enfermedad metabólica del hígado, lipodistrofias, disfunción pulmonar, trastornos inflamatorios y otras afecciones relacionadas con la obesidad.

Los métodos de la presente invención se pueden llevar a cabo con cualquier sujeto.

El método de la presente invención se puede llevar a la práctica ventajosamente con sujetos que corren el riesgo de desarrollar adiposidad visceral y/o trastornos relacionados con la adiposidad visceral.

Por ejemplo, los métodos de la presente invención se pueden llevar a la práctica con sujetos normales, sujetos con sobrepeso u obesos.

Para un adulto humano "sobrepeso" se defina como un IMC entre 25 y 30. El "índice de masa corporal" o "IMC" es igual al peso en kg dividido por la altura en metros cuadrados. "Obesidad" es un estado en que la reserva natural de energía almacenada en el tejido adiposo de los animales, en particular de los humanos y otros mamíferos, aumenta hasta un extremo relacionado con ciertos problemas de salud o mayor mortalidad. Para un adulto humano "obeso" se defina como un IMC superior a 30.

El valor de referencia para PC-O 42:4 y opcionalmente para los demás biomarcadores se mide preferiblemente en las mismas unidades utilizadas para indicar el nivel de PC-O 42:4 y opcionalmente de los demás biomarcadores obtenidos del sujeto examinado. Por tanto, si el nivel de PC-O 42:4 y opcionalmente de los demás biomarcadores es un valor absoluto tal como las unidades de PC-O 42:4 en $\mu\text{mol/l}$ (μM), el valor de referencia también está basado en las unidades de PC-O 42:4 en $\mu\text{mol/l}$ (μM) de los individuos de una población general de control o de una población selecta de sujetos de control.

El valor de referencia puede ser asimismo un único valor límite, tal como una mediana o un promedio. Los valores de referencia de PC-O 42:4 y opcionalmente de los demás biomarcadores en muestras obtenidas de fluidos corporales, tales como niveles medios, medianas de los niveles o niveles "límite", se pueden establecer analizando una gran muestra de individuos de la población general o de la población selecta y empleando un modelo estadístico como método de valor predictivo para seleccionar un criterio de positividad o una curva característica receptor-operador que defina la especificidad (máximo porcentaje de verdaderos negativos) y la sensibilidad (máximo porcentaje de verdaderos positivos) óptimas, tal como está descrito en Knapp, R. G. y Miller, M. C. (1992). *Clinical Epidemiology and Biostatistics*. William y Wilkins, Harual Publishing Co. Malvern, Pa., que se incorpora aquí como referencia.

Los técnicos experimentados sabrán cómo asignar los valores de referencia correctos, ya que varían con el género, la raza, la herencia genética, el estado de salud o la edad, por ejemplo.

Los presentes inventores han determinado como ejemplo valores típicos de referencia de sujetos humanos adultos obesos y normales en un fluido corporal tal como el plasma sanguíneo, por ejemplo.

Entonces los valores medios de referencia predeterminados para sujetos obesos serían de

68,71 μM de tirosina en fluido corporal,
 662,67 μM de glutamina en fluido corporal,
 1,47 μM de PC-O 44:6 en fluido corporal,
 0,84 μM de PC-O 44:4 en fluido corporal,
 1,27 μM de PC-O 42:4 en fluido corporal,
 2,65 μM de PC-O 40:4 en fluido corporal,
 1,37 μM de PC-O 40:3 en fluido corporal,
 52,97 μM de fenilalanina en fluido corporal,
 193,56 μM de leucina + isoleucina en fluido corporal,
 0,19 μM de C10 en fluido corporal,
 0,06 μM de C16 en fluido corporal,
 0,03 μM de C8:1 en fluido corporal,
 0,25 μM de LPC 24:0 en fluido corporal,
 4,18 μM de PC 30:0 en fluido corporal,
 1,11 μM de PC 34:4 en fluido corporal,
 9,84 μM de PC-O 34:1 en fluido corporal,
 11,49 μM de PC-O 34:2 en fluido corporal,
 11,79 μM de PC-O 36:2 en fluido corporal,
 7,20 μM de PC-O 36:3 en fluido corporal,
 3,68 μM de PC-O 40:6 en fluido corporal,
 0,56 μM de PC-O 42:2 en fluido corporal,
 0,89 μM de PC-O 42:3 en fluido corporal,

0,21 μM de PC-O 44:3 en fluido corporal,
 2,17 μM de PC-O 44:5 en fluido corporal,
 0,56 μM de PC 42:0 en fluido corporal,
 0,22 μM de PC 42:2 en fluido corporal.

5 En los sujetos normales los valores medios de referencia predeterminados serían de

75,00 μM de tirosina en fluido corporal,
 748,27 μM de glutamina en fluido corporal,
 1,21 μM de PC-O 44:6 en fluido corporal,
 0,50 μM de PC-O 44:4 en fluido corporal,
 1,12 μM de PC-O 42:4 en fluido corporal,
 3,24 μM de PC-O 40:4, en fluido corporal
 2,10 μM de PC-O 40:3 en fluido corporal,
 49,17 μM de fenilalanina en fluido corporal,

15 197,52 μM de leucina + isoleucina en fluido corporal,

0,29 μM de C10 en fluido corporal,
 0,09 μM de C16 en fluido corporal,
 0,04 μM de C8:1 en fluido corporal,
 0,77 μM de LPC 24:0 en fluido corporal,

20 4,10 μM de PC 30:0 en fluido corporal,

1,42 μM de PC 34:4 en fluido corporal,
 8,20 μM de PC-O 34:1 en fluido corporal,
 9,26 μM de PC-O 34:2 en fluido corporal,
 12,67 μM de PC-O 36:2 en fluido corporal,

25 5,83 μM de PC-O 36:3 en fluido corporal,

4,45 μM de PC-O 40:6 en fluido corporal,
 0,82 μM de PC-O 42:2 en fluido corporal,
 1,08 μM de PC-O 42:3 en fluido corporal,
 0,22 μM de PC-O 44:3 en fluido corporal,

30 1,82 μM de PC-O 44:5 en fluido corporal,

0,65 μM de PC 42:0 en fluido corporal,
 0,35 μM de PC 42:2 en fluido corporal.

35 Los sujetos examinados con el método de la presente invención pueden ser humanos o animales, en particular un mamífero por ejemplo. Animales típicos pueden ser los de compañía, como gatos y perros o animales de granja por ejemplo.

40 Los expertos en la materia comprenderán que todas las características de la presente invención aquí descritas se pueden combinar libremente sin apartarse del alcance de la misma, tal como se ha expuesto. En particular, las características descritas para los métodos de la presente invención son aplicables a otros métodos y al empleo de la presente invención y viceversa.

Viendo los siguientes ejemplos y figuras se hacen patentes otras ventajas y características de la presente invención.

45 La tabla 1 muestra las características clínicas de la cohorte reclutada, estratificada en cuatro cuartiles basados en su contenido de grasa visceral evaluado mediante el \log_{10} del valor de la relación grasa intraperitoneal / grasa abdominal medido por tomografía computarizada.

50 Los valores se indican como media (\pm DE). ALAT = alanina aminotransferasa, ASAT = aspartato aminotransferasa, IMC = índice de masa corporal, GGT = gamma-glutamil transpeptidasa, HDL-C = lipoproteína colesterol de alta densidad, HOMA-IR = evaluación del modelo homeostático de resistencia a la insulina, LDL-C = lipoproteína colesterol de baja densidad, PAM = presión sanguínea arterial media, AGNE = ácidos grasos no esterificados, TG = triglicéridos.

55 La tabla 2 muestra las concentraciones de los metabolitos indicadas como media (\pm DE) para cada uno de los cuatro cuartiles basados en su contenido de grasa visceral evaluado mediante el \log_{10} del valor de la relación grasa intraperitoneal / grasa abdominal medido por tomografía computarizada.

60 La figura 1 muestra la reconstrucción estadística de los perfiles de plasma sanguíneo por RMN- ^1H , empleando el análisis de selvas aleatorias para identificar patrones relacionados con la adiposidad visceral (identificados con cuadrillos). GPC = glicerofosfolípidos, AGPI = ácidos grasos poliinsaturados, AGI = ácidos grasos insaturados.

65 La figura 2 muestra la importancia de los metabolitos y su robustez para predecir la adiposidad debida a la grasa visceral mediante la evaluación por análisis de selvas aleatorias. La exactitud de la media agrupada disminuye después de $n = 10000$ generaciones de selvas aleatorias. La mayor importancia de una variable corresponde a los valores más altos de disminución de exactitud de la media agrupada.

Las figuras 3-1, 3-2 y 3-3 muestran las diferencias de metabolitos entre sujetos con mucha y poca grasa visceral para cada metabolito seleccionado. Los datos están representados para cada cuartil basado en su contenido de grasa visceral evaluado mediante el \log_{10} del valor del volumen de grasa intraperitoneal medido por tomografía computarizada, 1 = cuartil 1, 2 = cuartil 2, 3 = cuartil 3, 4 = cuartil 4.

5

Ejemplos:

Sujetos y diseño experimental

10 El ensayo clínico consistió en un estudio de observación realizado con 40 mujeres caucásicas sanas y obesas en el Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV, Lausanne, Suiza). El protocolo del estudio fue aprobado por un comité ético establecido en el CHUV. Las participantes tenían un IMC entre 28 y 40, entre 25 y 45 años de edad y ningún indicio de enfermedad metabólica (diabetes tipo 2, enfermedad cardiovascular o síndrome metabólico). Las muestras biológicas obtenidas (muestras de plasma sanguíneo y orina de 24 horas) se conservaron a -80°C hasta el análisis metabólico.

15

Evaluación de la composición corporal

20 Se realizó una exploración corporal completa para determinar tanto la distribución de la grasa abdominal como la composición total del cuerpo. Los escaneos corporales completos se efectuaron en un sistema Lunar iDXA de GE (versión de software: enCORE versión 12.10.113) con un modo de escaneo determinado automáticamente por el aparato. Para la medición de la DXA todos los sujetos llevaban una bata de hospital y se habían quitado todos los objetos metálicos. La unidad iDXA se calibró diariamente con el cuerpo de calibración GE Lunar. Todos los escaneos fueron realizados por personal cualificado siguiendo el manual del operador para la colocación del paciente y la adquisición de los datos. Durante la cita de una hora se realizaron dos veces los escaneos corporales completos de cada sujeto recolocándolo entre los dos escaneos. Los escaneos se analizaron con el software enCORE (versión 14.00.207). Las RDI fueron determinadas automáticamente por medio del software enCORE (Auto ROI) para todo el cuerpo, los brazos, las piernas, el tronco y las regiones androide y ginoide. Un operador experimentado en DXA también verificó y, en caso indicado, reposicionó las colocaciones de las RDI (Expert ROI).

30 Además del escaneo iDXA se hicieron mediciones de cintura y cadera.

30

35 Las mediciones de TC se realizaron en un escáner de TC multidetector de 64 cortes (VCT Lightspeed, GE Medical Systems, Milwaukee, USA). Los sujetos estaban tendidos en posición supina con los brazos por encima de la cabeza y las piernas elevadas sobre un cojín. Se registra un solo escaneo (10 mm) del abdomen al nivel de las vértebras L4-L5, del cual se analiza un área transversal de tejido adiposo expresada en centímetros cuadrados. Se usaron los siguientes parámetros de adquisición: 120 Kv, 100-200 mA con modulación de la dosis en el eje z y un campo de visión de 500 mm. Se reconstruyen imágenes transversales axiales de cortes de 5 mm de grosor, usando un filtro Kernel estándar. El proceso de cuantificación utiliza un algoritmo semi-interactivo comercialmente disponible para segmentar la grasa subcutánea e intra-abdominal en la estación de trabajo "Advantage Window Workstation" (de GE Medical Systems).

40

Química clínica

45 Las concentraciones totales en el plasma de colesterol HDL y LDL, triglicéridos, uratos, creatinina, sodio y potasio, ALAT, ASAT, GGT, glucosa, ácidos grasos no esterificados, insulina y la presión sanguínea arterial media (PAM) se determinaron empleando métodos rutinarios de laboratorio. El estado de resistencia a la insulina se evaluó como modelo homeostático de valoración de la resistencia a la insulina (HOMA-IR) según la fórmula anteriormente descrita (Mathews y otros, 1985): $\text{insulina } (\mu\text{U/ml}) \times \text{glucosa } (\text{mmoles/l}) / 22,5$.

45

50 Preparación de las muestras y análisis por espectroscopia RMN- H^1

Se introdujeron muestras (400 μl) de plasma sanguíneo con heparina en tubos de RMN de 5 mm con 200 μl de solución tampón de fosfato deuterado (KH_2PO_4 a una concentración final de 0,2 M). El deuterio se empleó como sustancia de bloqueo. Los perfiles metabólicos se midieron mediante un espectrómetro Bruker Avance III 600 MHz equipado con una sonda criogénica inversa de 5 mm a 300 K (Bruker Biospin, Rheinstetten, Alemania). De cada muestra de plasma se registró la secuencia de pulsos de una RMN- H^1 unidimensional estándar con supresión de agua (RD = 4 s), la secuencia spin-eco según Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) con supresión de agua (RD = 4 s) y la secuencia editada por difusión (RD = 4 s). De cada experimento unidimensional se registraron 32 escaneos, usando 98 puntos de datos K. Los espectros de RMN- H^1 se procesaron mediante el programa TOPSPIN (versión 2.1, Bruker, Alemania) antes de la transformación de Fourier. Los espectros de RMN obtenidos se pusieron en fase manualmente y se corrigieron sus líneas base, refiriéndolos al desplazamiento químico del protón anomérico de la α -glucosa a δ 5,2396 para los espectros del plasma. La asignación de las resonancias de RMN- H^1 a los metabolitos específicos se llevó a cabo por comparación con nuestra base de datos de RMN de compuestos puros, desarrollada internamente, y utilizando los datos de la literatura (Fan, T. W. (1996) Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy 28, 161-219; Nicholson, J. K., y otros (1995) Anal. Chem. 67, 793-811). La identificación de los metabolitos se confirmó por técnicas de espectroscopia RMN 2D de correlación H^1 - H^1 (COSY) (Hurd, R. E. (1990) J.

65

Magn. Reson. 87, 422-428), espectroscopia de correlación total H^1-H^1 (TOCSY) (Bax, A. & Davis (1985) J. Magn. Reson. 65, 355-360) y correlación heteronuclear cuántica simple H^1-C^{13} (HSQC) (Bodenhausen, G. & Ruben (1980) Chemical Physics Letters 69, 185-189).

5 Preparación de muestras para el análisis con el kit Absolute IDQTM de Biocrates Life Sciences

El kit Absolute IDQTM de Biocrates Life Sciences se empleó para las muestras de plasma con EDTA, del modo publicado con anterioridad (Römisch-Margl, W., C. Prehn, R. Bogumil, C. Röhring, K. Suhre, J. Adamski, Procedure for tissue sample preparation and metabolite extraction for high-throughput targeted metabonomics [*Procedimiento de preparación de muestras de tejidos y extracción de metabolitos para metabonomía dirigida de alto rendimiento*]. Metabonomics, 2011. Online First). La preparación de placas de pocillos y la aplicación y extracción de las muestras se efectuó siguiendo las instrucciones del fabricante. En la placa provista de 96 pocillos se cargó un volumen final de 10 μ l que contenía patrones internos marcados con isótopos. La cromatografía líquida se llevó a cabo en un sistema Dionex Ultimate 3000 de cromatografía líquida a presión elevada (UHPLC) (Dionex AG, Olten, Suiza) acoplado a un espectrómetro de masas 3200 Q TRAP (AB Sciex; Foster City, CA, USA) equipado con una fuente iónica TurboV que funciona en modo de ionización por electrospray (ESI). Los extractos de las muestras (20 μ l) se inyectaron dos veces (en modo ESI positivo y negativo) por infusión directa, usando un gradiente de caudal de 0-2,4 min: 30 ml/min, 2,4-2,8 min: 200 ml/min, 2,9-3 min: 30 ml/min. Los parámetros iniciales de MS se ajustaron como sigue: temperatura de desolvatación (TEM): 200°C, alto voltaje: -4500 V (ESI -), 5500 V (ESI +), gas de cortina (CUR) y de nebulización (GS1 y GS2): nitrógeno; 20, 40 y 50 psi, respectivamente; presión de colisión del nitrógeno gaseoso: 5 mTorr. La adquisición MS/MS tuvo lugar en modo de control de la reacción seleccionada (SRM), con valores optimizados del potencial de desagrupamiento para los 163 metabolitos detectados en el ensayo. Los archivos de datos primarios (Analyst software, versión 1.5.1; AB Sciex, Foster City, CA, USA) se exportaron al programa de análisis facilitado MetIQ para calcular las concentraciones de los metabolitos. La lista de todos los metabolitos detectables se puede adquirir de Biocrates Life Sciences, Austria (<http://biocrates.com>).

Análisis multivariante de datos

Los espectros RMN de plasma se convirtieron en 22 puntos de datos K en el rango de δ 0,2-10,0 mediante una rutina MATLAB desarrollada internamente, excluyendo la señal de resto de agua entre δ 4,68-5,10. Las intensidades de desplazamiento químico se normalizaron respecto a la suma de todas las intensidades comprendidas en el rango especificado, antes del análisis quimiométrico. El análisis quimiométrico se llevó a cabo empleando el programa SIMCA-P+ (versión 12.0.1, Umetrics AB, Umea, Suecia) y rutinas MATLAB (The MathWorks Inc., Natick, MA, USA) desarrolladas internamente. Para detectar la presencia de analogías entre los perfiles metabólicos se utilizaron las técnicas del análisis de componentes principales (ACP) (Wold, S., y otros (1987) Chemom. Intell. Lab. Syst. 2, 37-52), la proyección a estructuras latentes (PLS) (Wold, S., y otros (1987) PLS Meeting, Frankfurt) y la proyección a ortogonal estructuras latentes (O-PLS) (Trygg, J. & Wold (2003) J. Chemom. 17, 53-64). Para evaluar la validez del modelo se usó una validación cruzada de siete iteraciones (Cloarec, O., y otros (2005) Anal. Chem. 77, 517-526). La exactitud de la clasificación del modelo O-PLS-DA se estableció a partir de las muestras predichas en el ciclo de validación cruzada de 7 iteraciones.

Los datos de la MS selectiva se analizaron por selvas aleatorias, usando el programa "randomForest" (A. Liaw y M. Wiener (2002). Classification and Regression by randomForest [*Clasificación y regresión por randomForest*]. R News 2(3), 18-22.) en el entorno R (R Development Core Team (2011). R: un programa y entorno de cálculo estadístico. R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>). Las pruebas de significación univariada también se realizaron en R.

Debido a la distribución anormal de la adiposidad visceral, para el subsiguiente análisis metabólico se usaron los siguientes parámetros: valor transformado logarítmicamente del contenido de grasa visceral, de la relación grasa intraperitoneal / grasa subcutánea (relación 1) o de la relación grasa intraperitoneal / grasa abdominal (relación 2).

En la tabla 1 se muestran las características antropométricas y bioquímicas de la cohorte estratificadas en cuatro cuartiles (Q1-4, n = 10) basados en el \log_{10} del valor de la relación de grasa intraperitoneal / abdominal (relación 2) medido por TC. La glucosa ($p < 0,10$) y la insulina ($p < 0,05$) en ayunas, así como la HOMA-IR ($p < 0,05$) fueron superiores en los sujetos con la máxima adiposidad visceral (Q4) en comparación con (Q1). Para estratificar a los sujetos según su adiposidad visceral se usaron con preferencia los valores transformados logarítmicamente de la relación grasa intraperitoneal / grasa subcutánea o de la relación grasa intraperitoneal / grasa abdominal, pues se demostró que estos parámetros eran independientes de los índices IMC, de cadera, de cintura, de ALAT, de la PAM y de los índices calorimétricos, pero no en el caso del valor transformado logarítmicamente del volumen de grasa intraperitoneal. Lo interesante de esta cohorte es que el HDL, el LDL y el colesterol total no fueron estadísticamente distintos entre los grupos.

Para identificar características fenotípicas de deposición de grasa visceral, las muestras de plasma se analizaron por RMN- H^1 y el método metabólico de LC-MS/MS selectiva. Los análisis se efectuaron con muestras de plasma en ayunas. Los análisis OPLS de las muestras recogidas indicaron algunas relaciones sutiles, aunque significativas, entre los lípidos del plasma sanguíneo y la deposición de grasa visceral (R^2X : 0,68; R^2Y : 0,506; Q^2Y : 0,167). El

análisis de selvas aleatorias también se utilizó para confirmar la relación estadística entre los lípidos específicos del plasma y el estado de la grasa visceral (figura 1), lo cual sugirió una remodelación específica de los lípidos del plasma, marcada por cambios en los glicerofosfolípidos y en el patrón de saturación de los ácidos grasos.

- 5 Por consiguiente la metabonomía por LC-MS/MS selectiva se empleó para proporcionar información estructural y mediciones cuantitativas de 163 metabolitos, incluyendo aminoácidos, azúcares, acilcarnitinas, esfingolípidos y glicerofosfolípidos. Utilizando el análisis OPLS se pudo determinar una característica metabólica de la adiposidad por grasa visceral (R^2X : 0,29; R^2Y : 0,68; Q^2Y : 0,32).
- 10 Para seleccionar los marcadores más robustos se usó el % de disminución media de exactitud de los datos “fuera de la bolsa” como característica variable de importancia. Así se pudieron determinar las variables que mejor discriminan los sujetos según su estado de grasa visceral (Q1 frente a Q4). Ambos, Q1 y Q4, se evaluaron mediante el valor transformado logarítmicamente de las relaciones 1 y 2 del volumen de grasa intraperitoneal. También se examinó la modelación para valorar las variaciones metabólicas entre días, considerando cada visita por separado (datos no mostrados). Al final quedaron 26 metabolitos importantes para clasificar los sujetos según su adiposidad por grasa visceral (figuras 2, 3-1, 3-2, 3-3). La adiposidad visceral se relacionó con mayores concentraciones de aminoácidos circulantes, incluyendo glutamina, leucina/iso-leucina, fenilalanina y tirosina. Estos patrones se relacionaron con mayores concentraciones de acilcarnitinas, incluyendo palmitoilcarnitina (C16), caproilcarnitina (C10) octenoilcarnitina (C8:1) y lisofosfatidilcolina LPC 24:0, y diacil-fosfolípidos, incluyendo PC 30:0, PC 34:4. Asimismo la adiposidad visceral fue marcada por una disminución de los acil-éteres PC-O 36:3, PC-O 40:3, PC-O 40:4, PC-O 40:6, PC-O 42:2, PC-O 42:3, PC-O 42:4, PC-O 44:3, PC-O 44:4, PC-O 44:6 y de dos diacil-fosfolípidos (PC 42:0 y PC 42:2). Para evaluar la capacidad discriminativa individual de cada componente de la característica se hicieron pruebas de la suma de rangos de Wilcoxon entre los grupos de adiposidad por grasa visceral (todos los metabolitos están listados en la tabla 2 según el descriptor ensayado, es decir el \log_{10} del valor de la relación 2).

25 La figura 2 reúne los biomarcadores seleccionados con su peso en la clasificación de la adiposidad visceral, usando el \log_{10} del valor del contenido de grasa visceral, el \log_{10} del valor de la relación 1 o el \log_{10} del valor de la relación 2. Estos marcadores mostraron una sensibilidad y especificidad de 0,90 para la grasa visceral en el modo de validación cruzada (Sencv, Specv).

30

Tabla 1:

| Factor | Primer cuartil Q1 | Segundo cuartil Q2 | Tercer cuartil Q3 | Cuarto cuartil Q4 | Valores P Mann-Whitney (Q1-Q4) |
|--|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------------------|
| Edad, años | 33,90 ± 4,89 | 32,80 ± 3,58 | 38,00 ± 4,42 | 37,60 ± 5,82 | 0,13897 |
| IMC, kg/m ² | 34,01 ± 3,27 | 36,34 ± 3,62 | 37,00 ± 2,95 | 34,59 ± 4,42 | 0,93969 |
| Log ₁₀ relación grasa intraperitoneal/abdominal | -0,70 ± 0,05 | -0,61 ± 0,02 | -0,52 ± 0,02 | -0,40 ± 0,06 | 1,25506E-09 |
| Cadera, cm | 122 ± 5,47 | 128 ± 7,48 | 127,34 ± 6,29 | 122,28 ± 9,65 | 0,5649 |
| Cintura, cm | 97,28 ± 8,28 | 103,39 ± 8,7 | 108,72 ± 11,71 | 104,73 ± 13,84 | 0,45838 |
| Relación cintura/cadera | 0,80 ± 0,07 | 0,81 ± 0,06 | 0,85 ± 0,07 | 0,84 ± 0,09 | 0,35104 |
| Na, mmol/l | 140,40 ± 1,35 | 140,80 ± 1,32 | 141,50 ± 1,58 | 139,9 ± 1,10 | 0,32894 |
| K, mmol/l | 4,05 ± 0,18 | 4,10 ± 0,18 | 3,99 ± 0,25 | 4,04 ± 0,18 | 0,8765 |
| Glucosa, mmol/l | 4,95 ± 0,35 | 5,17 ± 0,52 | 5,41 ± 0,49 | 5,37 ± 0,5 | 0,05716 |
| Creatinina, mmol/l | 65,60 ± 9,45 | 65,2 ± 11,2 | 64,78 ± 9,28 | 70,3 ± 6,53 | 0,2563 |
| Colesterol, mmol/l | 5,52 ± 1,01 | 5,58 ± 0,85 | 5,31 ± 0,68 | 5,48 ± 0,97 | 0,90965 |
| HDL, mmol/l | 1,54 ± 0,43 | 1,32 ± 0,29 | 1,38 ± 0,25 | 1,32 ± 0,24 | 0,18104 |
| Relación HDL/Col | 3,77 ± 1,07 | 4,4 ± 1,22 | 3,99 ± 0,97 | 4,24 ± 0,95 | 0,11901 |
| LDL, mmol/l | 3,50 ± 0,97 | 3,56 ± 0,88 | 3,34 ± 0,61 | 3,47 ± 0,79 | 1 |
| TG, mmol/l | 1,04 ± 0,43 | 2,25 ± 2,1 | 1,28 ± 0,45 | 1,52 ± 0,57 | 0,09354 |
| Urates, µmol/l | 275,20 ± 41,93 | 263,22 ± 71,45 | 303,40 ± 75,28 | 285,00 ± 31,70 | 0,35268 |
| ASAT, U/l | 21,40 ± 3,14 | 21,4 ± 4,48 | 24,00 ± 6,94 | 24,50 ± 6,7 | 0,40157 |
| ALAT, U/l | 18,40 ± 6,11 | 19,20 ± 5,07 | 23,50 ± 8,34 | 7,10 ± 13,28 | 0,13971 |
| Relación ALAT/ASAT | 0,86 ± 0,25 | 0,91 ± 0,21 | 0,99 ± 0,3 | 1,08 ± 0,34 | 0,12066 |
| PAM, mmHg | 57,80 ± 18,6 | 71,10 ± 19,75 | 62,40 ± 20,97 | 57,80 ± 14,15 | 0,8796 |
| GGT, U/l | 20,001 ± 11,86 | 17,50 ± 6,88 | 21,10 ± 4,84 | 25,44 ± 11,26 | 0,19122 |
| Calorimetría, kcal/24 h | 1357,00 ± 191,78 | 1434,00 ± 142,61 | 1469,00 ± 152,49 | 1433,00 ± 210,82 | 0,36362 |
| Insulina | 18,60 ± 9,21 | 22,12 ± 6,32 | 24,36 ± 7,22 | 25,44 ± 4,62 | 0,01468 |
| HOMA-IR | 4,24 ± 2,02 | 4,95 ± 1,49 | 6,06 ± 1,87 | 6,12 ± 1,23 | 0,01149 |
| AGNE, µmol/l | 544,50 ± 201,51 | 580,60 ± 301,38 | 596,20 ± 185,79 | 585,10 ± 188,62 | 0,66426 |

Tabla 2:

| Metabolitos | Primer cuartil Q1 | Segundo cuartil Q2 | Tercer cuartil Q3 | Cuarto cuartil Q4 | Valores P Mann-Whitney (Q1-Q4) |
|---|---------------------|--------------------|--------------------|-------------------|--------------------------------|
| Glutamina, $\mu\text{mol/l}$ | 615,56 \pm 107,95 | 748 \pm 193,49 | 792,1 \pm 260,61 | 714 \pm 94,03 | 0,02468 |
| Tirosina, $\mu\text{mol/l}$ | 61,97 \pm 11,02 | 80,54 \pm 22,21 | 75,91 \pm 21,83 | 80,99 \pm 24,69 | 0,05347 |
| Caproílcarnitina, $\mu\text{mol/l}$ | 0,22 \pm 0,1 | 0,2 \pm 0,09 | 0,14 \pm 0,06 | 0,3 \pm 0,19 | 0,40018 |
| Palmitoílcarnitina, $\mu\text{mol/l}$ | 0,07 \pm 0,02 | 0,07 \pm 0,03 | 0,07 \pm 0,03 | 0,1 \pm 0,04 | 0,12065 |
| Octenoílcarnitina, $\mu\text{mol/l}$ | 0,04 \pm 0,02 | 0,05 \pm 0,02 | 0,05 \pm 0,04 | 0,05 \pm 0,02 | 0,25258 |
| LPC 24:0, $\mu\text{mol/l}$ | 0,36 \pm 0,25 | 0,51 \pm 0,24 | 0,52 \pm 0,36 | 0,46 \pm 0,31 | 0,21613 |
| PC 30:0, $\mu\text{mol/l}$ | 4,43 \pm 1,48 | 5,17 \pm 2,35 | 5,75 \pm 1,98 | 5,57 \pm 1,76 | 0,1564 |
| PC 34:4, $\mu\text{mol/l}$ | 1,3 \pm 0,46 | 1,53 \pm 1,14 | 1,41 \pm 0,52 | 1,55 \pm 0,75 | 0,31537 |
| PC 42:0, $\mu\text{mol/l}$ | 0,65 \pm 0,23 | 0,48 \pm 0,16 | 0,47 \pm 0,08 | 0,48 \pm 0,14 | 0,07889 |
| PC 42:2, $\mu\text{mol/l}$ | 0,2 \pm 0,06 | 0,19 \pm 0,11 | 0,13 \pm 0,05 | 0,17 \pm 0,08 | 0,40018 |
| PC-O 34:1, $\mu\text{mol/l}$ | 9,94 \pm 2,22 | 9,78 \pm 3,84 | 8,48 \pm 2,15 | 8,53 \pm 0,99 | 0,17752 |
| PC-O 34:2, $\mu\text{mol/l}$ | 10,66 \pm 3,5 | 9,31 \pm 3,51 | 9,38 \pm 4,57 | 8,77 \pm 1,76 | 0,21102 |
| PC-O 36:2, $\mu\text{mol/l}$ | 11,29 \pm 2,64 | 11,86 \pm 2,68 | 10,38 \pm 3,08 | 9,17 \pm 2,09 | 0,07865 |
| PC-O 36:3, $\mu\text{mol/l}$ | 7,04 \pm 1,68 | 6,7 \pm 2,61 | 7,11 \pm 1,82 | 5,5 \pm 1,24 | 0,02792 |
| PC-O 40:3, $\mu\text{mol/l}$ | 1,41 \pm 0,27 | 1,46 \pm 0,38 | 1,27 \pm 0,3 | 0,86 \pm 0,42 | 0,00421 |
| PC-O 40:4, $\mu\text{mol/l}$ | 2,79 \pm 0,56 | 2,9 \pm 0,73 | 2,47 \pm 0,69 | 2,02 \pm 0,83 | 0,01784 |
| PC-O 40:6, $\mu\text{mol/l}$ | 3,81 \pm 0,86 | 3,27 \pm 1,09 | 2,8 \pm 0,84 | 2,74 \pm 1,09 | 0,06515 |
| PC-O 42:2, $\mu\text{mol/l}$ | 0,66 \pm 0,23 | 0,56 \pm 0,14 | 0,53 \pm 0,16 | 0,45 \pm 0,18 | 0,05347 |
| PC-O 42:3, $\mu\text{mol/l}$ | 0,89 \pm 0,2 | 0,92 \pm 0,14 | 0,9 \pm 0,27 0 | 63 \pm 0,26 | 0,06525 |
| PC-O 42:4, $\mu\text{mol/l}$ | 1,34 \pm 0,33 | 1,09 \pm 0,28 | 1,09 \pm 0,37 | 0,82 \pm 0,22 | 0,00198 |
| PC-O 44:3, $\mu\text{mol/l}$ | 0,21 \pm 0,06 | 0,2 \pm 0,04 | 0,15 \pm 0,06 | 0,17 \pm 0,05 | 0,1564 |
| PC-O 44:4, $\mu\text{mol/l}$ | 0,8 \pm 0,3 | 0,67 \pm 0,24 | 0,63 \pm 0,19 | 0,51 \pm 0,18 | 0,01721 |
| PC-O 44:5, $\mu\text{mol/l}$ | 2,29 \pm 0,74 | 2,03 \pm 0,55 | 1,9 \pm 0,74 | 1,71 \pm 0,7 | 0,04113 |
| PC-O 44:6, $\mu\text{mol/l}$ | 1,52 \pm 0,56 | 1,22 \pm 0,3 | 1,11 \pm 0,5 | 1,03 \pm 0,32 | 0,01013 |
| Fenilalanina, $\mu\text{mol/l}$ | 49,9 \pm 14,16 | 50,47 \pm 8,45 | 62,82 \pm 22,17 | 56,4 \pm 8,38 | 0,04113 |
| Leucina + isoleucina, $\mu\text{mol/l}$ | 181,44 \pm 53,02 | 214,2 \pm 56,71 | 202,4 \pm 27,39 | 228,8 \pm 33,83 | 0,04536 |

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de la 1-O-alkil-2-acilglicerofosfocolina 42:4 (PC-O 42:4) como biomarcador para detectar y/o cuantificar la adiposidad visceral y/o sus variaciones.
- 10 2. Método para diagnosticar la adiposidad visceral en un sujeto, que consiste en
 - determinar el nivel de PC-O 42:4 en una muestra de fluido corporal previamente obtenida de un sujeto examinado y
 - comparar el nivel de PC-O 42:4 del sujeto con un valor de referencia predeterminado, el cual está basado en un nivel promedio de PC-O 42:4 en el mismo fluido corporal de una población de control, de modo que un nivel de PC-O 42:4 en la muestra menor que el valor de referencia predeterminado indica un aumento de la adiposidad visceral.
- 15 3. Método para diagnosticar una variación en la adiposidad visceral en un sujeto, que consiste en
 - determinar el nivel de PC-O 42:4 en una muestra de fluido corporal previamente obtenida de un sujeto examinado y
 - comparar el nivel de PC-O 42:4 del sujeto con un valor de referencia predeterminado, el cual está basado en un nivel de PC-O 42:4 en el mismo fluido corporal obtenido previamente del mismo sujeto, de modo que un nivel de PC-O 42:4 en la muestra menor que el valor de referencia predeterminado indica un aumento de la adiposidad visceral.
- 20 4. Método para diagnosticar el efecto de un cambio de estilo de vida en la adiposidad visceral en un sujeto, que consiste en
 - determinar el nivel de PC-O 42:4 en una muestra de fluido corporal previamente obtenida de un sujeto examinado y
 - comparar el nivel de PC-O 42:4 del sujeto con un valor de referencia predeterminado, el cual está basado en un nivel de PC-O 42:4 en el mismo fluido corporal obtenido previamente del mismo sujeto, de manera que un nivel de PC-O 42:4 en la muestra mayor que el valor de referencia predeterminado indica un efecto positivo del cambio de estilo de vida en la adiposidad visceral.
- 25 5. El método según la reivindicación 4, en el cual el cambio de estilo de vida es una variación en la dieta.
- 30 6. El método según la reivindicación 5, en el cual la variación dietética es el consumo de al menos un producto nutricional no consumido anteriormente o consumido en cantidades diferentes.
- 35 7. El método según una de las reivindicaciones 5 o 6 para probar la efectividad de un nuevo régimen nutricional.
- 40 8. El método según una de las reivindicaciones 2 a 7, que comprende adicionalmente las etapas de
 - determinar el nivel de al menos otro biomarcador seleccionado del grupo constituido por glutamina, tirosina, 1-O-alkil-2-acilglicerofosfocolina 44:4 (PC-O 44:4), 1-O-alkil-2-acilglicerofosfocolina 44:6 (PC-O 44:6), 1-O-alkil-2-acilglicerofosfocolina 40:4 (PC-O 40:4) y 1-O-alkil-2-acilglicerofosfocolina 40:3 (PC-O 40:3) en la muestra de fluido corporal y
 - comparar el nivel en el sujeto de al menos uno de los biomarcadores glutamina, tirosina, PC-O 44:4, PC-O 44:6, PC-O 40:4 y PC-O 40:3 con un valor de referencia predeterminado, el cual está basado en niveles promedio de glutamina, tirosina, PC-O 44:4, PC-O 44:6, PC-O 40:4 y/o PC-O 40:3 en una muestra de fluido corporal de una población de control sana normal o en niveles de glutamina, tirosina, PC-O 44:4, PC-O 44:6, PC-O 40:4 y/o PC-O 40:3 en el mismo fluido corporal obtenido anteriormente del mismo sujeto, de modo que un aumento del nivel de glutamina y/o tirosina y/o un descenso del nivel de PC-O 44:6, PC-O 44:4, PC-O 42:4, PC-O 40:4 y/o PC-O 40:3 en la muestra de fluido corporal respecto a los valores de referencia predeterminados, indica una mayor adiposidad visceral.
- 45 9. El método según una de las reivindicaciones 2 a 8, en el cual los niveles de los biomarcadores se determinan por RMN-H¹ y/o por espectrometría de masas en la muestra y en la referencia.
- 50 10. El método según una de las reivindicaciones 2 a 9, en el cual el fluido corporal es plasma o suero sanguíneo.
- 55 11. El método según una de las reivindicaciones 2 a 10, en el cual el grado de adiposidad visceral es indicativo de la probabilidad de desarrollar trastornos relacionados con el exceso de grasa visceral.
- 60 12. El método según la reivindicación 11, en el cual los trastornos relacionados con el exceso de grasa visceral son enfermedades cardiometabólicas y/o desregulaciones metabólicas.
- 65 13. El método según una de las reivindicaciones 2 a 12, para ser aplicado a sujetos normales, con sobrepeso u obesos.
14. El método según una de las reivindicaciones 2 a 13, en el cual el sujeto es un humano o un animal de compañía tal como un gato o un perro.

Figura 1

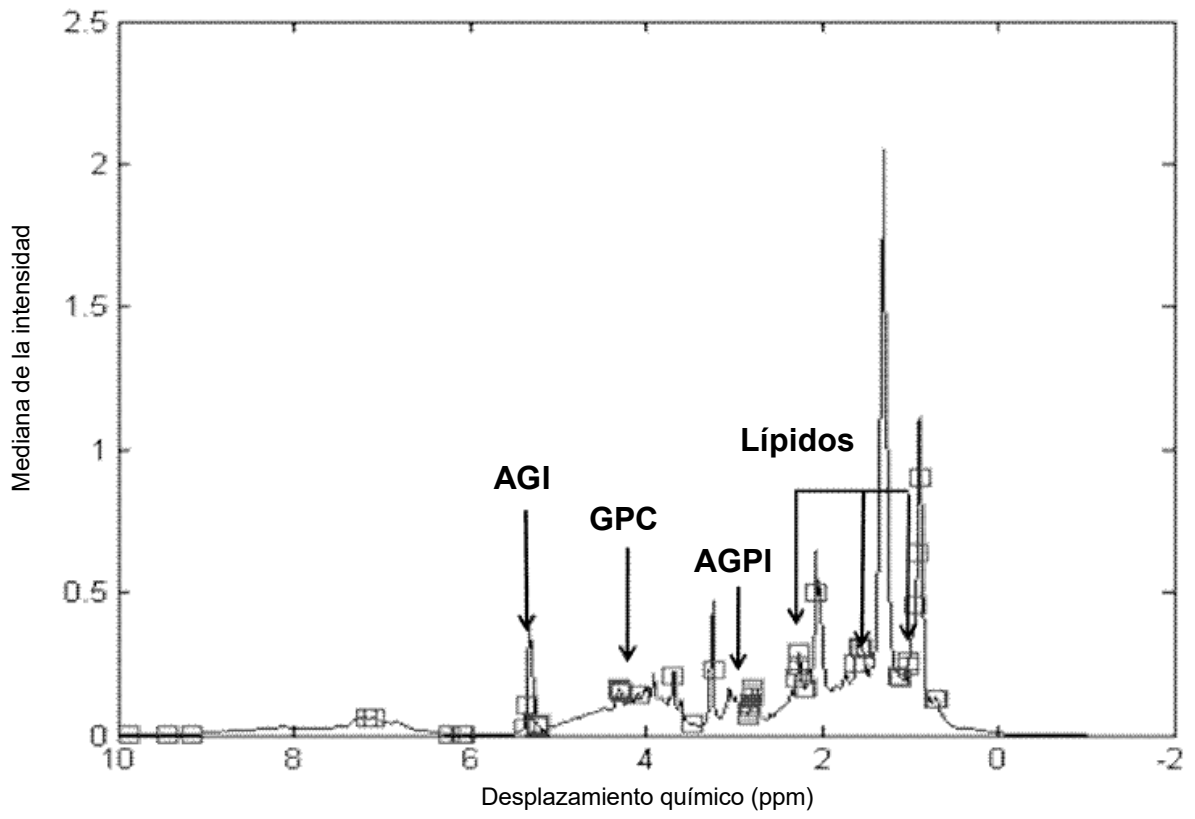


Figura 2

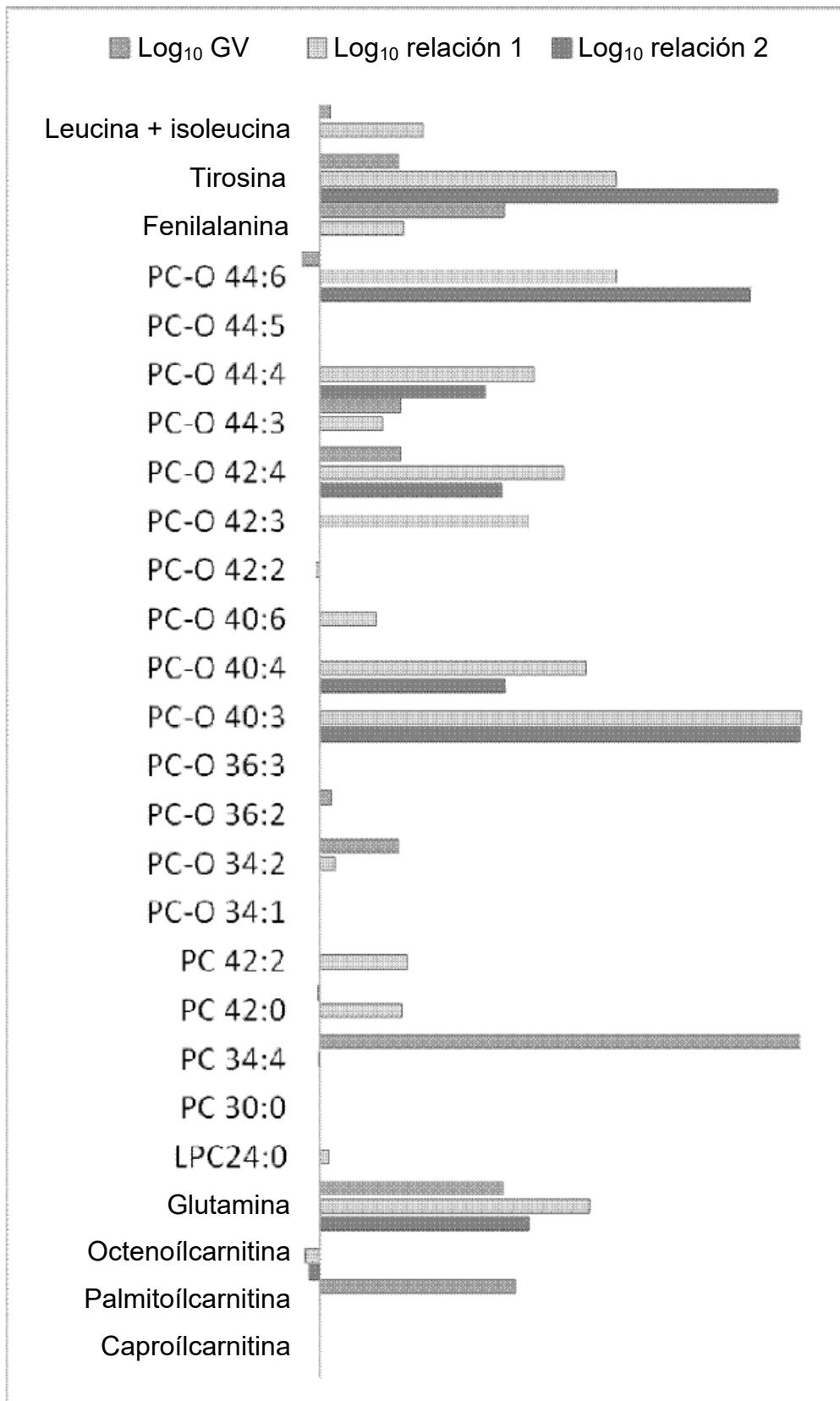


Figura 3-1

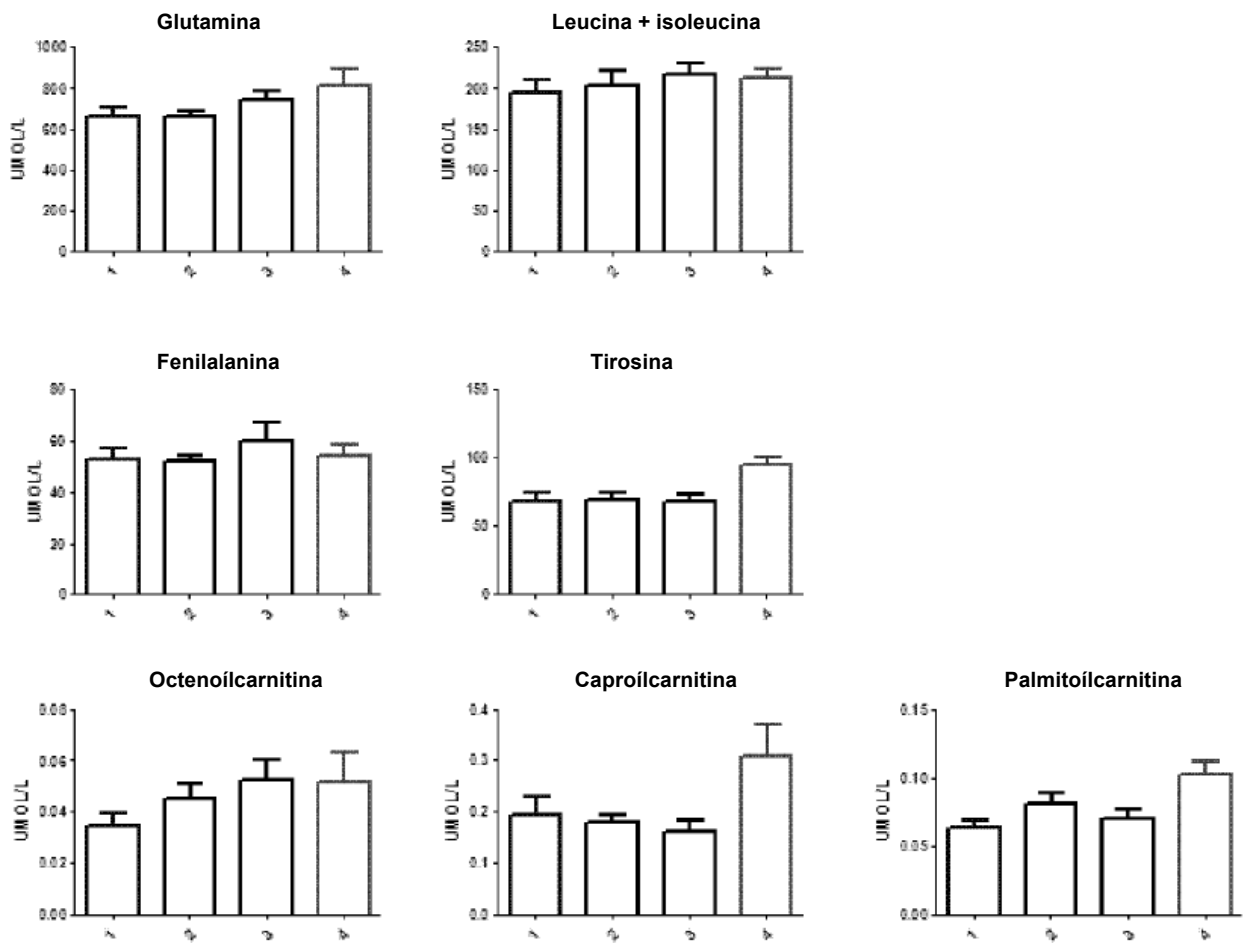


Figura 3-2

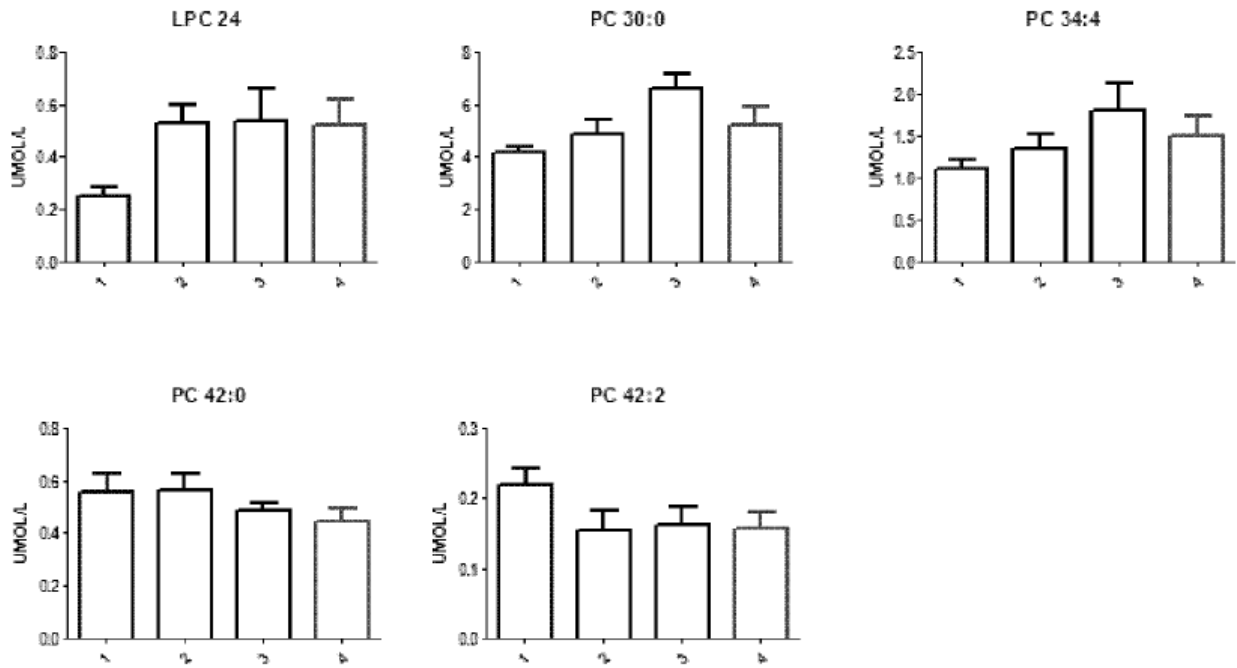


Figura 3-3

