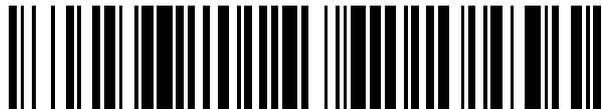


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 589 759**

51 Int. Cl.:

G01N 33/92 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.06.2013 PCT/EP2013/061874**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.12.2013 WO13186149**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.06.2013 E 13727621 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.07.2016 EP 2867680**

54 Título: **PC-O 44:6 - Un biomarcador de la adiposidad visceral**

30 Prioridad:

12.06.2012 EP 12171569

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

16.11.2016

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 2 589 759 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 44:6 – 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) 44:6 que se pueden utilizar, por ejemplo, para detectar y/o cuantificar la adiposidad visceral y/o los cambios en la adiposidad visceral. Este biomarcador también puede usarse para diagnosticar el efecto de un cambio en el estilo de vida en la adiposidad visceral en un sujeto.

10 El continuo aumento de la epidemia de sobrepeso y obesidad, especialmente entre los niños, ha hecho que el desciframiento del genoma y sus fenotipos del metaboloma asociados se conviertan en uno de los mayores problemas de salud pública. Aunque la desnutrición y la obesidad, tal como se define por el índice de masa corporal (IMC), imponen una carga sustancial sobre la esperanza de vida, está claro que el IMC tiene limitaciones considerables en la evaluación de la composición corporal y carece de sensibilidad para evaluar los riesgos de enfermedades (Dulloo, A. G., et al. (2010) *Int. J. Obes. (Lond)* 34 Suppl 2, S4-17. Dulloo et al. recientemente han revisado los últimos avances en los conceptos acerca de los riesgos de salud relacionados con fenotipos de la composición corporal, incluyendo (i) la división de IMC en un índice de masa grasa (FM) (FM/H²) y un índice de masa libre de grasa (FFM) (FFM/H²), (ii) la división del FFM en masa de órganos y masa muscular esquelética, (iii) la división de la FM en grasas peligrosas y grasas protectoras y (iv) la interacción entre la capacidad de expansión del tejido adiposo y la deposición de grasa ectópica dentro o alrededor de los órganos/tejidos que constituyen la masa corporal magra (Dulloo, A. G., et al. (2010) *Int. J. Obes. (Lond)* 34 Suppl 2, S4-17)

25 Durante las últimas décadas, numerosas investigaciones usando el estado de las tecnologías más avanzadas de la técnica han identificado los genes y los factores de transcripción asociados con el almacenamiento de grasa y la obesidad (Viguerie, N., et al. (2005) *Diabetologia* 48, 123-131; Viguerie, N., et al. (2005) *Biochimie* 87, 117-123; Sorensen, T. I. et al. (2006) *PLoS. Clin. Trials* 1, e12; Klannemark, M., et al., (1998) *Diabetologia* 41, 1516-1522; Clement, K. et al. (2007) *J. Intern. Med.* 262, 422-430), genetic inheritability (Teran-Garcia, M. Et al. (2007) *Appl. Physiol Nutr. Metab* 32, 89-114) y han sugerido una influencia de la microbiota intestinal humana sobre la incidencia de la obesidad (Backhed, F., et al. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104, 979-984; Ley, R., et al. (2006) *Nature* 444, 1022-1023; Turnbaugh, P., et al. (2006) *Nature* 444, 1027-1031).

35 Sin embargo, en contextos obesogénicos y diabetogénicos similares, muchas personas siguen siendo metabólicamente sanas y resistentes a las enfermedades cardiovasculares (ECV) asociadas a la obesidad. Además de la observación de que los riesgos de enfermedades asociadas con la obesidad puedan no ser uniformes (Wildman, R. P., et al. (2008) *Arch. Inter. Med.* 168,1617-1624), un número creciente de individuos con peso normal (índice de masa corporal, IMC <25) expresan anomalías cardiovasculares y metabólicas que anteriormente se consideraban específicas de los estados con sobrepeso y obesidad. La evidencia más reciente indica cómo la composición corporal-regioespecífica puede determinar la predisposición individual a la enfermedad metabólica, estando correlacionada la grasa corporal y, en particular, la distribución de la grasa visceral, con un mayor riesgo de trastornos cardiometabólicos, diabetes, hipertensión, enfermedad del hígado graso no alcohólico y la mortalidad.

45 La adiposidad visceral se ha controlado clínicamente utilizando las medidas de la cintura y la cadera, (por ejemplo, > 0,9 para los hombres y > 0,85 para las mujeres, método que, sin embargo, tiene limitaciones similares sobre todo en poblaciones obesas. Los estudios de imagen por excelencia, como la resonancia magnética (MRI) y la tomografía computarizada (TC), generan ahora una cuantificación regio-específica y muy precisa de los depósitos de grasa visceral. Sin embargo, la evaluación del metabolismo asociado con la grasa visceral sigue siendo particularmente difícil debido a la falta de biomarcadores no invasivos, rápidos y fiables que se puedan utilizar en los estudios epidemiológicos y debido a las limitaciones de los métodos analíticos convencionales que no son adecuados para el análisis holístico del metabolismo.

55 El exceso de grasa almacenada en el tronco o en las regiones androides podría ser metabólicamente menos saludable que la grasa almacenada en el área ginoide, siendo la resistencia a la insulina un mecanismo causal clave. Por lo tanto, la estratificación del paciente es necesaria para la gestión nutricional y terapéutica personalizada, sin embargo, su aplicación es complicada cuando los sujetos tienen cocientes de cintura-cadera similares y el acceso a las instalaciones de estudio de imagen es limitado. Por tanto, existe una necesidad urgente de biomarcadores que permitan la evaluación de la presencia de grasa visceral, el metabolismo asociado con la grasa visceral y/o modificaciones del mismo de una manera sencilla y fiable.

60 Los presentes inventores han abordado esta necesidad.

Por lo tanto, fue el objetivo de la presente invención mejorar el estado de la técnica y proporcionar biomarcadores que cumplan el objetivo de la presente invención y/o que permitan superar al menos una de las desventajas del estado actual de la técnica.

65

El documento EP2249161 A1 da a conocer un método para el diagnóstico de la asfixia. Se divulga un gran número de compuestos endógenos específicos de la asfixia incluyendo fosfatidilcolina con la de suma residuo alquilo-acilo C44:6.

- 5 Oberbach et al; J. Proteome Res., 10(10), 2011, páginas 4769-4788 divulga un perfil proteómico y metabólico del suero para identificar marcadores de los cambios de masa corporal.

El documento EP 2172775 A1 identifica los aminoácidos que son útiles en la discriminación entre un grupo acumulación de grasa visceral y un grupo de sujetos libre de acumulación de grasa visceral.

- 10 Para identificar biomarcadores adecuados los inventores han utilizado un enfoque metabolómico.

La metabolómica se considera hoy un enfoque sistémico bien establecido para caracterizar el fenotipo metabólico, que comprende la influencia de varios factores como el medio ambiente, los fármacos, la dieta, el estilo de vida, la genética y los factores del microbioma. A diferencia de los datos de expresión génica y proteómica que indican el potencial de cambios fisiológicos, los metabolitos y sus cambios de concentración dinámicos dentro de las células, tejidos y órganos, representan los criterios de valoración reales de los procesos reguladores fisiológicos.

- 15

Recientemente, la metabolómica y los descubrimientos basados en la lipidómica han acelerado nuestra comprensión de los procesos patológicos y proporcionarán nuevas vías para la prevención y el tratamiento nutricional de los trastornos subclínicos asociados con el síndrome metabólico.

- 20

Los presentes inventores se han propuesto proporcionar un fenotipo metabólico completo de una composición corporal regio-específica: la adiposidad visceral. Esto ha permitido la identificación de marcadores biológicos específicos de la adiposidad visceral.

- 25

En el presente estudio, el metabolismo asociado con la adiposidad visceral se investigó en una cohorte de 40 mujeres obesas sanas mediante la medición de diversos criterios de valoración metabólicos en combinación con la cuantificación in vivo de la composición corporal utilizando absorciometría dual de rayos X (DXA) y la distribución de grasa abdominal mediante tomografía computarizada (TC).

- 30

Usando una combinación de resonancia magnética nuclear de protones (RMN de ^1H) y los perfiles de LC-MS/MS selectivos de muestras de plasma y de orina de 24 horas recogidas a lo largo del tiempo, los inventores han identificado nuevos biomarcadores metabólicos de la distribución de la grasa visceral en esta cohorte obesos bien definida con diferentes patrones de deposición de grasa visceral.

- 35

Como tal, los inventores han identificado un biomarcador, PC-O 44:6.

PC-O es 1-O-alquil-2-acilglicerofosfolina.

- 40

Las especies de lípidos individuales fueron indicadas de la siguiente manera: [clase de lípidos] [número total de átomos de carbono]: [número total de enlaces dobles]. Por ejemplo, PC 34:1 refleja una especie de fosfatidilcolina que comprende 34 átomos de carbono y 1 doble enlace.

- 45

PC-O 44:6 es, por lo tanto, 1-O-alquil-2-acilglicerofosfolina 44:6.

Los inventores han encontrado además que PC-O 44:6 puede usarse como un biomarcador para la detección y/o cuantificación de la adiposidad visceral y/o de los cambios en la adiposidad visceral. Este método de diagnóstico se practica fuera del cuerpo humano o animal.

- 50

Esta detección y/o cuantificación del biomarcador puede llevarse a cabo en un líquido corporal. El líquido corporal puede ser sangre, plasma sanguíneo, suero sanguíneo u orina, por ejemplo.

Generalmente, la etapa de detección y/o cuantificación de biomarcadores se lleva a cabo en una muestra de fluido corporal que se obtuvo previamente del sujeto a analizar.

- 55

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

La grasa visceral puede estar compuesta de varios depósitos adiposos, incluyendo tejido mesentérico, tejido adiposo blanco epididimal (EWAT), y depósitos perirrenales, así como tejido adiposo epicárdico y grasa alrededor de hígado y estómago. Generalmente, la grasa en el abdomen es en su mayoría visceral, dando lugar a la famosa "barriga cervicera".

- 60

Demasiada grasa visceral tiene como resultado obesidad central, lo que a su vez está asociado con trastornos cardiovasculares, diabetes tipo 2, resistencia a la insulina o enfermedades inflamatorias, por ejemplo.

- 65

Estos son ejemplos de trastornos asociados a un exceso de grasa visceral.

5 La presente invención se refiere también a un método de diagnóstico de la adiposidad visceral en un sujeto, que comprende determinar el nivel de 1-O-alkil-2-acilglicerofosfolina (PC-O) 44:6 en una muestra de fluido corporal previamente obtenida de un sujeto a ser analizado y comparar el nivel de PC-O 44:6 del sujeto con un valor de referencia predeterminado, en el que el valor de referencia predeterminado se basa en un nivel promedio de PC-O 44:6 en el mismo fluido corporal en una población control, y en el que una disminución del nivel de PC-O 44:6 en la muestra en comparación con el valor de referencia predeterminado indica un aumento de la adiposidad visceral.

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

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

15 El suero sanguíneo y/o plasma sanguíneo tienen la ventaja de que la relación señal-ruido para el biomarcador a ensayar es particularmente alta.

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

20 Con independencia del fluido corporal seleccionado, el método de la presente invención tiene la ventaja de que la obtención de tales fluidos corporales de un sujeto es un procedimiento bien establecido.

El método de diagnóstico real se lleva a cabo a continuación, en una muestra de fluido corporal fuera del cuerpo.

25 El nivel de PC-O 44:6 en la muestra puede detectarse y cuantificarse mediante cualquier medio conocido en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar espectroscopia de masas, por ejemplo, UPLC-ESI-MS/MS. También se pueden utilizar otros métodos, tales como otros métodos espectroscópicos, métodos cromatográficos, técnicas de marcaje o métodos químicos cuantitativos.

30 Idealmente, el nivel de PC-O 44:6 en la muestra y el valor de referencia se determinan por el mismo método.

El valor de referencia predeterminado puede estar basado en un nivel medio de PC-O 44:6 en el fluido corporal analizado en una población control. La población de control puede ser un grupo de al menos 3, preferiblemente al menos 10, más preferiblemente al menos 50 personas con una constitución genética, edad y estado de salud medio similar.

35 La población de control también puede ser la misma persona, por lo que se obtiene el valor de referencia predeterminado previamente a partir del mismo sujeto. Esto permitirá una comparación directa del efecto de un estilo de vida actual con un estilo de vida anterior sobre la adiposidad visceral, por ejemplo, y se pueden evaluar directamente las mejoras.

40 La determinación de la adiposidad de grasa visceral permite concluir sobre la presencia de la adiposidad de grasa visceral y el riesgo de adquirir trastornos asociados.

45 La materia objeto de la presente invención también se refiere a un método de diagnóstico de un cambio en la adiposidad visceral en un sujeto, que comprende determinar el nivel de PC-O 44:6 en una muestra de fluido corporal previamente obtenida de un sujeto a analizar y comparar el nivel de PC-O 44:6 del sujeto con un valor de referencia predeterminado, en el que el valor de referencia predeterminado se basa en un nivel de PC-O 44:6 nivel en el mismo fluido corporal obtenido previamente del mismo sujeto y en el que una disminución del nivel de PC-O 44:6 en la muestra en comparación con el valor de referencia predeterminado, indica un incremento de adiposidad visceral.

50 Este método permite seguir la acumulación o la reducción de la grasa visceral a lo largo del tiempo y, por lo tanto, permite sacar conclusiones sobre el aumento o disminución de los riesgos de desarrollar trastornos asociados con la adiposidad visceral.

55 Esto tiene por ejemplo la ventaja de que los resultados inmediatos están disponibles, mucho antes de que se pueda determinar un aumento o disminución real de la grasa visceral. Esto es especialmente bueno para la motivación de las personas que tienen como objetivo reducir la grasa visceral. En particular, la reducción de la grasa visceral es una tarea difícil que a menudo requiere ejercicio intenso. Ohkawara et al. sugieren que se necesitan al menos 10 equivalentes metabólicos de tareas (MET)-horas por semana de ejercicio aeróbico para una reducción efectiva de la grasa visceral (Ohkawara, K.; et al, (2007), International Journal of Obesity (2005) 31 (12): 1786-1797).

60 La presente invención también se refiere a un método para diagnosticar el efecto de un cambio en el estilo de vida sobre la adiposidad visceral en un sujeto, que comprende determinar el nivel de PC-O 44:6 en una muestra de fluido corporal previamente obtenida de un sujeto a analizar y comparar el nivel de PC-O 44:6 del sujeto con un valor de referencia predeterminado, en el que el valor de referencia predeterminado se basa en un nivel de PC-O 44:6 en el

mismo fluido corporal obtenido previamente del mismo sujeto y en el que una disminución del nivel de PC-O 44:6 nivel en la muestra en comparación con el valor de referencia predeterminado, indica un incremento de adiposidad visceral.

5 Este método tiene el efecto de que permite controlar el efecto de los cambios de estilo de vida sobre la masa grasa visceral y sobre los riesgos de trastornos asociados.

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

10 Por ejemplo, el cambio en el estilo de vida puede ser un cambio en la dieta.

El cambio en la dieta puede ser un aumento o disminución del contenido de hidratos de carbono, lípidos y/o proteínas. Puede ser el cambio a una dieta regional diferente, como la dieta mediterránea, por ejemplo. También puede ser un cambio en la ingesta calórica total.

15 Como tal, el método de la presente invención se puede utilizar para probar la eficacia de un nuevo régimen nutricional, de productos nutricionales y/o de medicamentos.

20 Los productos nutricionales pueden ser, por ejemplo, productos que dicen tener un efecto sobre la grasa corporal, control de peso y/o la grasa visceral.

Generalmente, los productos nutricionales pueden ser productos alimenticios, bebidas, alimentos para mascotas, complementos alimenticios, nutracéuticos, aditivos alimentarios o fórmulas nutricionales.

25 Por ejemplo, el cambio en la dieta puede ser el uso de al menos un producto nutricional que previamente no se consumía o se consumía en cantidades diferentes.

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

PC-O 44:6 puede ser usado como el único marcador para el propósito de la presente invención.

35 Aunque PC-O 44:6 como único marcador es eficaz como una herramienta para el método de diagnóstico de la presente invención, mejorará la calidad y/o la capacidad de predicción de dicho diagnóstico, si el diagnóstico se basa en más de un marcador.

40 Por lo tanto, se puede usar uno o más otros marcadores en combinación con PC-O 44:6 para el diagnóstico de la adiposidad visceral y/o el riesgo de trastornos asociados en un sujeto.

Los inventores se sorprendieron al ver que también se pueden utilizar otros biomarcadores para detectar el diagnóstico de la adiposidad visceral y/o el riesgo de trastornos asociados.

45 Como tales, los inventores han identificado que la disminución de las concentraciones de fluidos corporales de PC-O 44:6, PC-O 44:4, PC-O 42:4, PC-O 40:4 y/o PC-O 40:3 y/o aumento de las concentraciones de fluidos corporales de tirosina y/o glutamina permiten el diagnóstico de un aumento de las cantidades de grasa visceral y/o un mayor riesgo del desarrollo de trastornos asociados con el exceso de grasa visceral.

50 Por el contrario, el aumento de las concentraciones de fluidos corporales de PC-O 44:6, PC-O 44:4, PC-O 42:4, PC-O 40:4 y/o PC-O 40:3 y/o la disminución de las concentraciones de fluidos corporales de tirosina y/o glutamina permiten el diagnóstico de una disminución de las cantidades de grasa visceral y/o un menor riesgo de desarrollo de trastornos asociados con el exceso de grasa visceral.

55 Los métodos de la presente invención pueden, por lo tanto, comprender además las etapas de determinar el nivel de al menos un biomarcador adicional seleccionado de entre el grupo que consiste en glutamina y/o tirosina, PC-O 44:4, PC-O 42:4, PC-O 40:4 y/o PC-O 40:3 en la muestra de fluido corporal y comparar el nivel del sujeto de al menos uno de glutamina y/o tirosina, PC-O 44:4, PC-O 42:4, PC-O 40:4 y/o PC-O 40:3 con un valor de referencia predeterminado, en el que el valor de referencia predeterminado se basa en los niveles promedio de glutamina, tirosina, PC-O 44:4, PC-O 42:4, 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 los niveles de glutamina, tirosina, PC-O 44:4, PC-O 42:4, PC-O 40:4 y/o PC-O 40:3 en el mismo fluido corporal obtenido previamente del mismo sujeto y en el que un aumento del nivel de glutamina y/o tirosina y/o una disminución 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 un aumento de la adiposidad visceral .

65

El método de la presente invención puede comprender la evaluación de al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, o al menos 7 biomarcadores.

Por ejemplo, PC-O 44:6 puede ser evaluada junto con PC-O 44:4.

- 5 PC-O 44:6 también puede ser evaluada junto con PC-O 42:4.
- PC-O 44:6 también puede ser evaluada junto con PC-O 40:4.
- 10 PC-O 44:6 también puede ser evaluada junto con PC-O 40:3.
- PC-O 44:6 también puede ser evaluada junto con PC-O 44:4 y PC-O 42:4.
- PC-O 44:6 también puede ser evaluada junto con PC-O 44:4, PC-O 42:4 y PC-O 40:4.
- 15 PC-O 44:6 también puede ser evaluada junto con PC-O 44:4, PC-O 42:4 y PC-O 40:3.
- PC-O 44:6 también puede ser evaluada junto con PC-O 44:4, PC-O 42:4, PC-O 40:3 y PC-O 40:4.
- 20 PC-O 44:6 también puede ser evaluada junto con PC-O 44:4, PC-O 42:4, PC-O 40:3, PC-O 40:4 y glutamina.
- PC-O 44:6 también puede ser evaluada junto con PC-O 44:4, PC-O 42:4, PC-O 40:3, PC-O 40:4 glutamina y tirosina.
- 25 La ventaja de la evaluación de más de un biomarcador es que cuantos más biomarcadores se evalúan más fiable llega a ser el diagnóstico. Si, por ejemplo, más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, o 7 biomarcadores exhiben las elevaciones o disminuciones en la concentración como se describe anteriormente, el poder predictivo de la presencia o ausencia y el grado de obesidad visceral, así como la riesgo de trastornos asociados es más fuerte.
- 30 De acuerdo con estos inventores, se han identificado aún más biomarcadores que se pueden utilizar para predecir la adiposidad visceral y el riesgo de desarrollar trastornos asociados.
- Por ejemplo, se encontró que el aumento de las concentraciones de fenilalanina, leucina, isoleucina, palmitoilcarnitina (C16), caproilcarnitina (C10) octenoilcarnitina (C8:1), lisofosfatidilcolina (LPC) 24:0, fosfatidilcolina (PC) PC 30:0 y/o PC 34: 4 en los fluidos corporales o la disminución de las 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 en comparación con los correspondientes valores de referencia obtenidos previamente indican un mayor adiposidad visceral y un mayor riesgo de trastornos asociados.
- 35 PC es fosfatidilcolina. LPC es lisofosfatidilcolina. C es acilcarnitina.
- Por el contrario, la disminución de las concentraciones de fenilalanina, leucina, isoleucina, C10 (decanoil carnitina), C16 (palmitoilcarnitina), C8:1 (octenoil-carnitina) LPC 24:0, PC 30:0 y/o PC 34:4 en los fluidos corporales o el aumento de las 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 en comparación con los correspondientes valores de referencia obtenidos previamente indica una disminución de la adiposidad visceral y un riesgo reducido de trastornos asociados.
- 45 Por lo tanto, los métodos de la presente invención pueden, comprender además las etapas de determinar el nivel de al menos un biomarcador adicional seleccionado del grupo que consiste en fenilalanina, leucina, isoleucina, C10 (decanoil carnitina), C16 (palmitoilcarnitina), C8:1 (octenoil-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 fluido corporal de la muestra y comparar el nivel del sujeto de al menos uno de 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 con un valor de referencia predeterminado, en el que el valor de referencia predeterminado se basa en los niveles promedio de 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 los niveles de fenilalanina, leucina, isoleucina, C10 (decanoil carnitina), C16 (palmitoilcarnitina), C8:1 (octenoil-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 y en el que un aumento del 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 una disminución 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 en comparación con los valores de referencia predeterminados indica un aumento de la adiposidad visceral.
- 50
- 55
- 60
- 65

Un aumento de la adiposidad visceral aumenta el riesgo de desarrollar trastornos asociados con el exceso de grasa visceral.

5 En consecuencia, en los métodos de la presente invención, el grado de adiposidad visceral se puede utilizar como indicación de la probabilidad de desarrollar trastornos asociados con el exceso de grasa visceral.

Además, los cambios en la adiposidad visceral se pueden utilizar como indicación de una probabilidad mayor o menor de desarrollar trastornos asociados con el exceso de grasa visceral.

10 Los trastornos asociados con la adiposidad visceral son por ejemplo trastornos cardiometabólicos.

Por lo tanto, los métodos de la presente invención se pueden usar para determinar el riesgo de desarrollar trastornos cardiometabólicos.

15 Otros trastornos asociados con la adiposidad visceral son, por ejemplo, alteraciones metabólicas. Alteraciones metabólicas típicas son las siguientes obesidad, resistencia a la insulina, diabetes tipo 2, síndrome metabólico, enfermedades vasculares (hipertensión, cardiopatía coronaria), esteatohepatitis en la enfermedad metabólica del hígado, lipodistrofias, función pulmonar, trastornos inflamatorios y otros trastornos relacionados con la obesidad.

20 Los métodos de la presente invención pueden llevarse a cabo con cualquier sujeto.

Ventajosamente, el método de la presente invención puede llevarse a cabo en sujetos con riesgo de desarrollar adiposidad visceral y/o trastornos asociados con la adiposidad visceral.

25 Por ejemplo, los métodos de la presente invención pueden llevarse a cabo con sujetos normales, con sobrepeso u obesos.

30 En un ser humano adulto, el "sobrepeso" se define como un IMC entre 25 y 30. Un "índice de masa corporal" o "IMC" significa la relación entre el peso en kg dividido entre la altura en metros al cuadrado. La "obesidad" es una condición en la que la reserva de energía natural, almacenada en el tejido graso de los animales, en particular seres humanos y otros mamíferos, se incrementa hasta un punto donde está asociado con ciertas afecciones de salud o aumento de la mortalidad. En un ser humano adulto, "obeso" se define como un índice de masa corporal mayor que 30.

35 El valor de referencia para PC-O 44:6 y, opcionalmente, para los otros biomarcadores se mide preferiblemente usando las mismas unidades utilizadas para caracterizar el nivel de PC-O 44:6 y, opcionalmente, los otros biomarcadores obtenidos del sujeto a analizar. Por lo tanto, si el nivel de PC-O 44:6 y, opcionalmente, los otros biomarcadores es un valor absoluto, tal como las unidades de PC-O 44:6 en mol/l (μM) el valor de referencia se basa también en las unidades de PC-O 44:6 en $\mu\text{mol/l}$ (μM) en los individuos de la población general o de una población de control seleccionada de sujetos.

40 Por otra parte, el valor de referencia puede ser un único valor de corte, tal como la mediana o la media. Los valores de referencia de PC-O 44:6 y, opcionalmente, los otros biomarcadores en muestras de fluidos corporales obtenidos, tales como los niveles medios, los niveles de la mediana o los niveles de "corte", pueden establecerse mediante el análisis de una muestra grande de individuos en la población general o la población seleccionada y el uso de un modelo estadístico, como el método de valor predictivo para la selección de un criterio de positividad o curva característica del operador receptor que define la especificidad óptima (la tasa negativa real más alta) y sensibilidad (la tasa positiva real más alta) como se describe en Knapp, R. G., and Miller, M. C. (1992). Clinical Epidemiology and Biostatistics. William and Wilkins, Harual Publishing Co. Malvern, Pa., que se incorporan en el presente documento por referencia.

45 Los expertos cualificados sabrán cómo asignar valores de referencia correctos, ya que variarán con el género, la raza, la herencia genética, el estado de salud o la edad, por ejemplo.

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

60 En consecuencia, los valores medios de referencia predeterminados para los sujetos obesos pueden ser de aproximadamente

65 68,71 μM de fluido corporal para tirosina,
662,67 μM de fluido corporal para glutamina,
1,47 μM de fluido corporal para PC-O 44:6,
0,84 μM de fluido corporal para PC-O 44:4,
1,27 μM de fluido corporal para PC-O 42:4,
2,65 μM de fluido corporal para PC-O 40:4,

- 1,37 μM de fluido corporal para PC-O 40:3,
- 52,97 μM de fluido corporal para fenilalanina,
- 193,56 μM de fluido corporal para leucina+isoleucina,
- 0,19 μM de fluido corporal para C10,
- 5 0,06 μM de fluido corporal para C16,
- 0,03 μM de fluido corporal para C8:1,
- 0,25 μM de fluido corporal para LPC 24:0,
- 4,18 μM de fluido corporal para PC 30:0,
- 1,11 μM de fluido corporal para PC 34:4,
- 10 9,84 μM de fluido corporal para PC-O 34:1,
- 11,49 μM de fluido corporal para PC-O 34:2,
- 11,79 μM de fluido corporal para PC-O 36:2,
- 7,20 μM de fluido corporal para PC-O 36:3,
- 3,68 μM de fluido corporal para PC-O 40:6,
- 15 0,56 μM de fluido corporal para PC-O 42:2,
- 0,89 μM de fluido corporal para PC-O 42:3,
- 0,21 μM de fluido corporal para PC-O 44:3,
- 2,17 μM de fluido corporal para PC-O 44:5,
- 0,56 μM de fluido corporal para PC 42:0,
- 20 0,22 μM de fluido corporal para PC 42:2,

En sujetos normales los valores medios de referencia predeterminados pueden ser aproximadamente

- 75,00 μM de fluido corporal para tirosina,
- 25 748,27 μM de fluido corporal para glutamina,
- 1,21 μM de fluido corporal para PC-O 44:6,
- 0,50 μM de fluido corporal para PC-O 44:4,
- 1,12 μM de fluido corporal para PC-O 42:4,
- 3,24 μM de fluido corporal para PC-O 40:4,
- 30 2,10 μM de fluido corporal para PC-O 40:3,
- 49,17 μM de fluido corporal para fenilalanina,
- 197,52 μM de fluido corporal para leucina+isoleucina,
- 0,29 μM de fluido corporal para C10,
- 0,09 μM de fluido corporal para C16,
- 35 0,04 μM de fluido corporal para C8:1,
- 0,77 μM de fluido corporal para LPC 24:0,
- 4,10 μM de fluido corporal para PC 30:0,
- 1,42 μM de fluido corporal para PC 34:4,
- 8,20 μM de fluido corporal para PC-O 34:1,
- 40 9,26 μM de fluido corporal para PC-O 34:2,
- 12,67 μM de fluido corporal para PC-O 36:2,
- 5,83 μM de fluido corporal para PC-O 36:3,
- 4,45 μM de fluido corporal para PC-O 40:6,
- 0,82 μM de fluido corporal para PC-O 42:2,
- 45 1,08 μM de fluido corporal para PC-O 42:3,
- 0,22 μM de fluido corporal para PC-O 44:3,
- 1,82 μM de fluido corporal para PC-O 44:5,
- 0,65 μM de fluido corporal para PC 42:0,
- 50 0,35 μM de fluido corporal para PC 42:2.

Los sujetos a analizar con el método de la presente invención pueden ser, por ejemplo, un ser humano o un animal, en particular un mamífero. Animales típicos pueden ser, por ejemplo, animales de compañía, como gatos o perros o animales de granja.

55 Los expertos en la técnica entenderán que todas las características de la presente invención descritas en la presente memoria se pueden combinar libremente sin apartarse del alcance de la invención como se divulga. En particular, las características descritas para los métodos de la presente invención pueden aplicarse a otros métodos y al uso de la presente invención y viceversa.

60 Otras ventajas y características de la presente invención son obvias a partir de los siguientes Ejemplos y Figuras.

La Tabla 1 muestra las características clínicas de la cohorte reclutada estratificada en cuatro cuartiles en función de su contenido de grasa visceral según lo evaluado por el valor \log_{10} de la relación grasa intraperitoneal/abdominal mediante tomografía computarizada.

65

Los valores se presentan como la media (\pm DE). ALAT = alanina aminotransferasa, AST = aspartato aminotransferasa, IMC = índice de masa corporal, GGT = gamma-glutamyl transpeptidasa, C-HDL = colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad, HOMA-IR = modelo de homeostasis de resistencia a la insulina, C-LDL = colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad, MAP = presión arterial media, NEFA = ácidos grasos no esterificados, TG = triglicéridos.

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

La Figura 1 muestra la reconstrucción estadística de los perfiles de RMN de ^1H en plasma sanguíneo mediante el análisis de selvas aleatorias para identificar patrones metabólicos asociados con la adiposidad visceral (identificada por los cuadrados). CPM = glicerofosfolípidos, PUFA = ácidos grasos poliinsaturados, UFA = ácidos grasos insaturados.

La Figura 2 muestra la importancia de los metabolitos y la robustez en la predicción de la adiposidad de grasa visceral evaluado mediante análisis de selvas aleatorias. Disminución media agrupada en la eficacia después de $n = 10000$ generaciones de selvas aleatorias. Una mayor importancia variable se corresponde con los valores más altos de disminución media agrupada en la precisión.

Las Figuras 3-1, 3-2 y 3-3 muestran las diferencias en los metabolitos entre los sujetos con alta y baja grasa visceral para cada metabolito seleccionado. Los datos se trazan para cada cuartil en función de su contenido de grasa visceral evaluado por el valor de \log_{10} del volumen de grasa intraperitoneal medido por tomografía computarizada, 1 = cuartil 1, 2 = cuartil 2, 3 = cuartil 3, 4 = 4 cuartil

Ejemplos

Sujetos y diseño experimental

El ensayo clínico fue un estudio observacional realizado en 40 mujeres caucásicas obesas sanas en el Centro Hospitalario Universitario de Vaud (CHUV, Lausana, Suiza). El protocolo de estudio fue aprobado por un comité de ética independiente con sede en el CHUV. Las participantes tenían un IMC entre 28 y 40, con edades comprendidas entre los 25 y los 45 años de edad y no mostraban rasgos de la enfermedad metabólica (diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares o síndrome metabólico). Las muestras biológicas resultantes (plasma sanguíneo y muestras de orina de 24 horas) se almacenaron a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su análisis metabólico.

Evaluación de la composición corporal

Se realizó la exploración del cuerpo completo para determinar tanto la distribución de la grasa abdominal como de la composición corporal total. Las exploraciones corporales totales se hicieron en un sistema de GE Lunar iDXA (versión de software: enCORE 12.10.113) con modo de exploración determinada automáticamente por el dispositivo. Para la medición DXA, todos los sujetos llevaban una bata de hospital y se habían quitado todos los artefactos de metal. La unidad iDXA se calibró diariamente con el cuerpo de calibración GE Lunar. Un operador entrenado llevó a cabo todos los análisis siguiendo el manual del operador para la colocación del paciente y la adquisición de datos. Durante la cita de una hora, se realizaron las exploraciones de cuerpo completo de cada sujeto dos veces con el reposicionamiento entre exploraciones. Las exploraciones se analizaron con el software enCORE (versión 14.00.207). Las regiones de interés se determinaron automáticamente con el software enCORE (Auto ROI) para todo el cuerpo, brazos, piernas, tronco, regiones androide y ginoide. Un operador con experiencia en el DXA también verificó y, cuando estaba indicado, volvió a posicionar las regiones de interés (regiones de interés expertas). Además de la exploración iDXA, se realizaron mediciones de cintura y cadera.

Se llevaron a cabo las medidas de TC en un escáner de TC 64 multi-detector (VCT LightSpeed, GE Medical Systems, Milwaukee, EE.UU.). Los sujetos estaban colocados en posición supina con los brazos por encima de su cabeza y las piernas elevadas con un cojín. Una sola exploración (10 mm) del abdomen se adquiere a nivel de las vértebras L4-L5 y se analiza para un área de sección transversal de tejido adiposo, expresada en centímetros cuadrados. Se utilizaron los siguientes parámetros de adquisición: 120 Kv, 100-200 mA con modulación de dosis del eje Z y un campo de visión de 500 mm. Las imágenes transversales axiales de grosor de corte de 5 mm se reconstruyen utilizando un núcleo estándar. El proceso de cuantificación utiliza un algoritmo semi interactivo disponible en el mercado para la segmentación de la grasa subcutánea e intra-abdominal en la estación de trabajo Advantage Wiindow (GE Medical Systems).

Bioquímica clínica

Las concentraciones de plasma total, colesterol HDL y LDL, triglicéridos, uratos, creatinina, sodio y potasio, ALAT, ASAT, GGT, glucosa, ácidos grasos no esterificados, insulina y presión arterial media (MAP) se determinaron utilizando métodos de laboratorio de rutina. El estado de resistencia a la insulina se evaluó como modelo de

evaluación de la homeostasis de la resistencia a la insulina (HOMA-IR) de acuerdo con la fórmula descrita previamente (Mathews et al., 1985): $\text{insulina } (\mu\text{U/ml}) \times \text{glucosa } (\text{mmol/l})/22,5$.

Preparación de la muestra y análisis espectroscópico de RMN de ^1H

Las muestras de plasma sanguíneo con heparina (400 μl) se introdujeron en tubos de RMN de 5 mm con 200 μl de solución de tampón fosfato deuterado (KH_2PO_4 con una concentración final de 0,2 M). El deuterio se emplea como sustancia de bloqueo. Los perfiles metabólicos se midieron en un espectrómetro Bruker Avance III de 600 MHz equipado con una sonda criogénica inversa de 5 mm a 300 K (Bruker Biospin, Rheinstetten, Alemania). La secuencia de pulso unidimensional de RMN de ^1H estándar con supresión de agua (RD = 4s), la secuencia de eco de espín con supresión de agua Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) (RD = 4s) y la secuencia editada por difusión (RD = 4s) fueron adquiridas para cada muestra de plasma. Para cada uno de los experimentos monodimensionales se recogieron 32 barridos utilizando puntos de datos de 98K. Los espectros de RMN de ^1H fueron procesados mediante el paquete de software TOPSPIN (versión 2.1, Bruker, Alemania) antes de la transformación de Fourier. Los espectros de RMN adquiridos fueron determinados en la fase de forma manual y corregidos para el basal y se hizo referencia al desplazamiento químico del protón anomérico de α -glucosa a δ 5,2396 para los espectros de plasma. La asignación de las resonancias de la RMN de ^1H a metabolitos específicos se logró haciendo coincidir la base de datos de RMN de desarrollo propio de compuestos puros y usando los datos de la literatura (Fan, T. W. (1996) *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 28, 161-219; Nicholson, J. K., et al. (1995) *Anal. Chem.* 67, 793-811). La identificación de los metabolitos fue confirmada por las técnicas de RMN espectroscopía de correlación 2D ^1H - ^1H (COSY) (Hurd, R. E. (1990) *J. Magn. Reson.* 87,422-428), espectroscopía de correlación ^1H - ^1H (TOCSY) (Bax, A. & Davis (1985) *J. Magn. Reson.* 65,355-360) y correlación cuántica simple heteronuclear ^1H - ^{13}C (HSQC) (Bodenhausen, G. & Ruben (1980) *Chemical Physics Letters* 69, 185-189).

Preparación de la muestra para el análisis con el kit Biocrates Life Sciences AbsoluteIDQTM

El kit Biocrates Life Sciences AbsoluteIDQTM se utilizó para las muestras de plasma con EDTA como se publicó anteriormente (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 metabolomics. *Metabonomics*, 2011. Publicado primero en internet). La preparación de las placas con pocillos y la aplicación de la muestra y la extracción se llevaron a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se cargó un volumen final de 10 μl de plasma en la placa de 96 pocillos proporcionada, la cual contiene patrones internos marcados isotópicamente. La cromatografía líquida se realizó en un sistema Dionex Ultimate 3000 de cromatografía líquida a ultra alta presión (UHPLC) (Dionex AG, Olten, Suiza) acoplado a un espectrómetro de masas de 3200 Q TRAP (AB Sciex; Foster City, CA, EE.UU.) equipado con una fuente de iones TurboV que funciona en modo de ionización por electronebulización (ESI). Los extractos de las muestras (20 μl) se inyectaron dos veces (en los modos ESI positivo y negativo) a través de infusión directa utilizando un caudal de gradiente de 0-2,4 min: 30 $\mu\text{l}/\text{min}$, 2,4-2,8 min: 200 $\mu\text{l}/\text{min}$, 2,9-3 min: 30 $\mu\text{l}/\text{min}$. Los parámetros de la fuente EM se fijaron en: temperatura de desolvatación (TEM): 200 $^\circ\text{C}$, alto voltaje: -4500 V (ESI -), 5500 V (ESI+), cortina (CUR) y gases nebulizadores (GS1 y GS2): nitrógeno; 20, 40 y 50 psi; respectivamente, presión de gas de colisión con nitrógeno: 5 mTorr. La adquisición de MS/MS se realizó en el modo de monitorización de la reacción programada (SRM) con una optimización de los valores de potencial desagrupados para los 163 metabolitos cribados en el ensayo. Los archivos de datos brutos (software Analyst, versión 1.5.1; AB Sciex, Foster City, CA, EE.UU.) se importaron en el software de análisis MetIQ proporcionado para calcular las concentraciones de metabolitos. La lista de todos los metabolitos detectables está disponible de Biocrates Life Sciences, Austria, Austria (<http://biocrates.com>).

Análisis multivariante de datos

Los espectros de RMN de plasma se convirtieron en 22K puntos de datos en el intervalo de 0,2-10,0 δ utilizando una rutina de MATLAB desarrollada internamente con exclusión de la señal de residuo de agua entre δ 4,68-5,10. Las intensidades de desplazamiento químico se normalizaron para la suma de todas las intensidades dentro del intervalo especificado antes del análisis quimiométrico. El análisis quimiométrico se realizó utilizando el paquete de software SIMCA-P+ (versión 12.0.1, Umetrics AB, Umea, Suecia) y las rutinas de desarrollo propio MATLAB (The MathWorks Inc., Natick, MA, EE.UU.). Con el fin de detectar la presencia de similitudes entre los perfiles metabólicos, se usó el Análisis de componentes principales (PCA) (Wold, S., et al. (1987) *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 2,37-52), la proyección de estructuras latentes (PLS) (Wold, S., et al. (1987) Congreso del PLS, Frankfurt) y la proyección ortogonal a estructuras latentes (O-PLS) (Trygg, J. y Wold (2003) *J. Chemom.* 17,53-64). Se utilizó la validación cruzada siete veces para evaluar la validez del modelo (Cloarec, O., et al. (2005) *Anal. Chem.* 77,517-526). La precisión de la clasificación del modelo O-PLS-DA se estableció a partir de las muestras predichas en el ciclo de validación cruzada de 7 veces.

Los datos de MS dirigidos fueron analizados mediante selvas aleatorias con el paquete 'randomForest' (A. Liaw and M. Wiener (2002). *Classification and Regression by randomForest*. *R News* 2(3), 18-22.) que se ejecuta en el entorno R (R Development Core Team (2011). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>). También se realizaron pruebas de significación monovariantes para la confirmación en R.

Debido a la distribución no normal de la adiposidad visceral, se emplearon los siguientes parámetros para el análisis posterior de la metabolómica: valor transformado logarítmicamente del contenido de grasa visceral, de la proporción de grasa intraperitoneal/subcutánea (relación 1), o de la proporción de grasa intraperitoneal/abdominal (relación 2).

5 Las características antropométricas y bioquímicas de la cohorte se muestran en la Tabla 1, según la estratificación en cuatro cuartiles (Q1-4, n = 10) basado en el valor \log_{10} de la relación de grasa intraperitoneal/ abdominal (relación 2) medida mediante TC. La glucosa en ayunas ($p < 0,10$) y la insulina ($p < 0,05$), así como el HOMA-IR ($p < 0,05$) fueron mayores en los sujetos con la adiposidad visceral más alta (Q4) en comparación con (Q1). Los valores transformados logarítmicamente de la proporción de grasa intraperitoneal/subcutánea o de la proporción de grasa intraperitoneal/abdominal fueron utilizados preferentemente para estratificar a los sujetos en función de su adiposidad visceral, ya que se demostró que estos parámetros eran independientes del IMC, cadera, cintura, ALAT, MAP y los índices colorimétricos, que no fue el caso para el valor transformado logarítmicamente del volumen de grasa intraperitoneal. Curiosamente, en su cohorte, HDL, LDL y el colesterol total no fueron estadísticamente diferentes entre los grupos.

15 Con el fin de identificar las firmas fenotípicas de la acumulación de grasa visceral, las muestras de plasma se analizaron utilizando RMN de ^1H y un enfoque metabolómico LC-MS/MS dirigido. Los análisis se llevaron a cabo en las muestras de plasma en ayunas. El análisis OPLS de las muestras recogidas mostró algunas asociaciones sutiles pero significativas entre los lípidos plasmáticos de la sangre y la acumulación de grasa visceral ($R^2\text{X}$: 0,68; $R^2\text{Y}$: 0,506; $Q^2\text{Y}$: 0,167). También se empleó el análisis de selvas aleatorias para confirmar la asociación estadística entre los lípidos plasmáticos específicos y el estado de la grasa visceral (Figura 1), lo que sugiere una remodelación de lípidos plasmáticos específica marcada por cambios en los glicerofosfolípidos y el patrón de saturación de ácido

20 grasa. Por lo tanto, se empleó la metabolómica LC-MS/MS dirigida para proporcionar información estructural y medidas cuantitativas de 163 metabolitos, incluyendo aminoácidos, azúcares, acilcarnitinas, esfingolípidos y glicerofosfolípidos. Utilizando el análisis de OPLS, fue posible determinar una firma metabólica de la adiposidad de grasa visceral ($R^2\text{X}$: 0,29; $R^2\text{Y}$: 0,68; $Q^2\text{Y}$: 0,32).

25 Para seleccionar los marcadores más contundentes, se utilizó la media del porcentaje de la exactitud de la disminución de los datos "de validación" como función de importancia de la variable. De esta manera, fue posible determinar las variables que discriminan mejor a los sujetos en función de su estado de grasa visceral (Q1 frente Q4). Tanto Q1 como Q4 se evaluaron utilizando el valor transformado logarítmicamente del volumen de grasa intraperitoneal, relación de 1 y 2. El modelado también se ensayó para evaluar las variaciones metabólicas entre días, considerando cada visita por separado (datos no mostrados). Por último, 26 metabolitos fueron considerados como de importancia para clasificar a los sujetos en función de su adiposidad de grasa visceral (Figuras 2, 3-1, 3-2, 3-3). La adiposidad visceral se asoció con el aumento de las concentraciones circulantes de aminoácidos, incluyendo glutamina, leucina/isoleucina, fenilalanina y tirosina. Estos patrones se asociaron con concentraciones más altas 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. Además, la adiposidad visceral se caracterizó por una disminución de los éteres de acilo 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 dos diacil fosfocolinas (PC 42:0 y PC 42:2). Para evaluar la capacidad discriminante individual de cada componente de la firma, se realizaron pruebas de la suma de rangos de Wilcoxon entre los grupos de adiposidad de grasa visceral (todos los metabolitos se enumeran en la Tabla 2 según el descriptor de la prueba, es decir, de la relación de valor \log_{10} 2).

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

Tabla 1:

Factor	Primer cuartil Q1	Segundo cuartil Q2	Tercer cuartil Q3	Cuarto cuartil Q4	Valores P de 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
Log10 proporción de 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	0,56498
Cintura, cm	97,8 ± 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

ES 2 589 759 T3

Factor	Primer cuartil Q1	Segundo cuartil Q2	Tercer cuartil Q3	Cuarto cuartil Q4	Valores P de Mann-Whitney (Q1-Q4)
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	0,87656
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
Proporción HDL/Col	3,77 ± 1,07	4,42 ± 1,22	3,99 ± 0,97	4,24 ± 0,95	0,28901
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
Uratos, 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 ± 3,24	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	27,10 ± 13,28	0,13971
Proporción ALAT/ASAT	0,86 ± 0,25	0,91 ± 0,21	0,99 ± 0,3	1,08 ± 0,34	0,12066
MAP, mmHg	57,80 ± 18,6	71,10 ± 19,75	62,40 ± 20,97	57,80 ± 14,15	0,8796
GGT, U/L	20,00 ± 11,86	17,50 ± 6,88	21,10 ± 4,84	25,44 ± 11,26	0,19122
Calorimetría, kcal/24h	1357,00 ± 191,78	1434,00 ± 142,61	1469,00 ± 152,49	1433,00 ± 210,82 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
NEFA, 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 de Mann-Whitney (Q1-Q4)
Glutamina, µmol/l	615,56 ± 107,95	748 ± 193,49	792,1 ± 260,61	714 ± 94,03	0,02468
Tirosina, µmol/l	61,97 ± 11,02	80,54 ± 22,21	75,91 ± 21,83	80,99 ± 24,69	0,05347
Caproilcarnitina, µmol/l	0,22 ± 0,1	0,2 ± 0,09	0,14 ± 0,06	0,3 ± 0,19	0,40018
Palmitoilcarnitina, µmol/l	0,07 ± 0,02	0,07 ± 0,03	0,07 ± 0,03	0,1 ± 0,04	0,12065
Octenoilcarnitina, µmol/l	0,04 ± 0,02	0,05 ± 0,02	0,05 ± 0,04	0,05 ± 0,02	0,25258
LPC 24:0, µmol/l	0,36 ± 0,25	0,51 ± 0,24	0,52 ± 0,36	0,46 ± 0,31	0,21613
PC 30:0, µmol/l	4,43 ± 1,48	5,17 ± 2,35	5,75 ± 1,98	5,57 ± 1,76	0,1564
PC 34:4, µmol/l	1,3 ± 0,46	1,53 ± 1,14	1,41 ± 0,52	1,55 ± 0,75	0,31537
PC 42:0, µmol/l	0,65 ± 0,23	0,48 ± 0,16	0,47 ± 0,08	0,48 ± 0,14	0,07889
PC 42:2, µmol/l	0,2 ± 0,06	0,19 ± 0,11	0,13 ± 0,05	0,17 ± 0,08	0,40018
PC-O 34:1, µmol/l	9,94 ± 2,22	9,78 ± 3,84	8,48 ± 2,15	8,53 ± 0,99	0,17752
PC-O 34:2, µmol/l	10,66 ± 3,5	9,31 ± 3,51	9,38 ± 4,57	8,77 ± 1,76	0,21102
PC-O 36:2, µmol/l	11,29 ± 2,64	11,86 ± 2,68	10,38 ± 3,08	9,17 ± 2,09	0,07865
PC-O 36:3, µmol/l	7,04 ± 1,68	6,7 ± 2,61	7,11 ± 1,82	5,5 ± 1,24	0,02792
PC-O 40:3, µmol/l	1,41 ± 0,27	1,46 ± 0,38	1,27 ± 0,3	0,86 ± 0,42	0,00421
PC-O 40:4, µmol/l	2,79 ± 0,56	2,9 ± 0,73	2,47 ± 0,69	2,02 ± 0,83	0,01784
PC-O 40:6, µmol/l	3,81 ± 0,86	3,27 ± 1,09	2,8 ± 0,84	2,74 ± 1,09	0,06525
PC-O 42:2, µmol/l	0,66 ± 0,23	0,56 ± 0,14	0,53 ± 0,16	0,45 ± 0,18	0,05347
PC-O 42:3, µmol/l	0,89 ± 0,2	0,92 ± 0,14	0,9 ± 0,27	0,63 ± 0,26	0,06525

ES 2 589 759 T3

Metabolitos	Primer cuartil Q1	Segundo cuartil Q2	Tercer cuartil Q3	Cuarto cuartil Q4	Valores P de Mann-Whitney (Q1-Q4)
PC-O 42:4, μmol/l	1,34 ± 0,33	1,09 ± 0,28	1,09 ± 0,37	0,82 ± 0,22	0,00298
PC-O 44:3, μmol/l	0,21 ± 0,06	0,2 ± 0,04	0,15 ± 0,06	0,17 ± 0,05	0,1564
PC-O 44:4, μmol/l	0,8 ± 0,3	0,67 ± 0,24	0,63 ± 0,19	0,51 ± 0,18	0,01721
PC-O 44:5, μmol/l	2,29 ± 0,74	2,03 ± 0,55	1,9 ± 0,74	1,71 ± 0,7	0,04113
PC-O 44:6, μmol/l	1,52 ± 0,56	1,22 ± 0,3	1,11 ± 0,5	1,03 ± 0,32	0,01013
Fenilalanina, μmol/l	49,9 ± 14,16	50,47 ± 8,45	62,82 ± 22,17	56,42 ± 8,38	0,04113
Leucina + isoleucina, μmol/l	181,44 ± 53,02	214,2 ± 56,71	202,4 ± 27,39	228,8 ± 33,83	0,04536

REIVINDICACIONES

1. Uso de 1-O-alkuil-2-acilglicerofosfocolina 44:6 (PC-O 44:6) como un biomarcador para la detección y/o cuantificación de la adiposidad visceral y/o cambios en la adiposidad visceral.
- 5 2. Método de diagnóstico de la adiposidad visceral en un sujeto, que comprende
- determinar el nivel de PC-O 44:6 en una muestra de fluido corporal previamente obtenida de un sujeto a analizar,
 - y
 - 10 - comparar el nivel de PC-O 44:6 del sujeto con un valor de referencia predeterminado,
- en el que el valor de referencia predeterminado se basa en un nivel de PC-O 44:6 promedio en el mismo fluido corporal en una población control, y
- 15 en el que una disminución del nivel de PC-O 44:6 en la muestra en comparación con el valor de referencia predeterminado indica un aumento de la adiposidad visceral.
3. Método de diagnóstico de un cambio en la adiposidad visceral en un sujeto, que comprende
- determinar el nivel de PC-O 44:6 en una muestra de fluido corporal previamente obtenida de un sujeto a analizar,
 - 20 y
 - comparar el nivel de PC-O 44:6 del sujeto con un valor de referencia predeterminado,
- en el que el valor de referencia predeterminado se basa en un nivel de PC-O 44:6 promedio en el mismo fluido corporal obtenido previamente del mismo sujeto, y
- 25 en el que una disminución del nivel de PC-O 44:6 en la muestra en comparación con el valor de referencia predeterminado indica un aumento de la adiposidad visceral.
4. Método de diagnóstico del efecto de un cambio en el estilo de vida en la adiposidad visceral en un sujeto, que comprende
- 30 - determinar el nivel de PC-O 44:6 en una muestra de fluido corporal previamente obtenida de un sujeto a analizar,
- y
 - comparar el nivel de PC-O 44:6 del sujeto con un valor de referencia predeterminado,
- 35 en el que el valor de referencia predeterminado se basa en un nivel de PC-O 44:6 promedio en el mismo fluido corporal obtenido previamente del mismo sujeto, y
- en el que una disminución del nivel de PC-O 44:6 en la muestra en comparación con el valor de referencia predeterminado indica un efecto positivo del cambio en el estilo de vida en la adiposidad visceral.
- 40 5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el cambio en el estilo de vida es un cambio en la dieta.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el cambio en la dieta es el uso de al menos un producto nutricional que previamente no se consumía o se consumía en cantidades diferentes.
- 45 7. El método de acuerdo con una de las reivindicaciones 5 o 6 para probar la eficacia de un nuevo régimen nutricional.
8. El método de acuerdo con una de las reivindicaciones 2 a 7, que comprende además las etapas de
- 50 - determinar el nivel de al menos un biomarcador adicional seleccionado del grupo que consiste en glutamina, tirosina, PC-O 44:4, PC-O 42:4, PC-O 40:4 y PC-O 40:3 en la muestra de fluido corporal, y
- comparar el nivel del sujeto de al menos uno de glutamina, tirosina, PC-O 44:4, PC-O 42:4, PC-O 40:4 y PC-O 40:3 con un valor de referencia predeterminado,
- 55 en el que el valor de referencia predeterminado se basa en los niveles promedio de glutamina, tirosina, 1-O-alkuil-2-acilglicerofosfocolina 44:4 (PC-O 44:4), 1-O-alkuil-2-acilglicerofosfocolina 42:4 (PC-O 42:4), 1-O-alkuil-2-acilglicerofosfocolina 40:4 (PC-O 40:4) y/o 1-O-alkuil-2-acilglicerofosfocolina 40:3 (PC-O 40:3) en una muestra de fluido corporal de una población de control sana normal o en los niveles de glutamina, tirosina, PC-O 44:4, PC-O 42:4, PC-O 40:4 y/o PC-O 40:3 en el mismo fluido corporal obtenido previamente del mismo sujeto y en el que un
- 60 aumento del nivel de glutamina y/o de tirosina y/o una disminución 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 un aumento de la adiposidad visceral.
9. El método de acuerdo con una de las reivindicaciones 2 a 8, en el que los niveles de los biomarcadores se
- 65 determinan por RMN de ¹H y/o espectrometría de masas en la muestra y en la referencia.

10. El método de acuerdo con una de las reivindicaciones 2 a 9, en el que el fluido corporal es plasma o suero sanguíneo.
- 5 11. El método de acuerdo con una de las reivindicaciones 2 a 10, en el que el grado de adiposidad visceral es indicativo de la probabilidad de desarrollar trastornos asociados con el exceso de grasa visceral.
12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en el que los trastornos asociados con el exceso de grasa visceral son enfermedades cardiometabólicas y/o alteraciones metabólicas.
- 10 13. El método de acuerdo con una de las reivindicaciones 2 a 12, para llevarse a cabo en sujetos normales, con sobrepeso u obesos.
- 15 14. El método de acuerdo con una de las reivindicaciones 2 a 13, en el que el sujeto es un ser humano o un animal de compañía tal como un gato o un perro.

Figura 1:

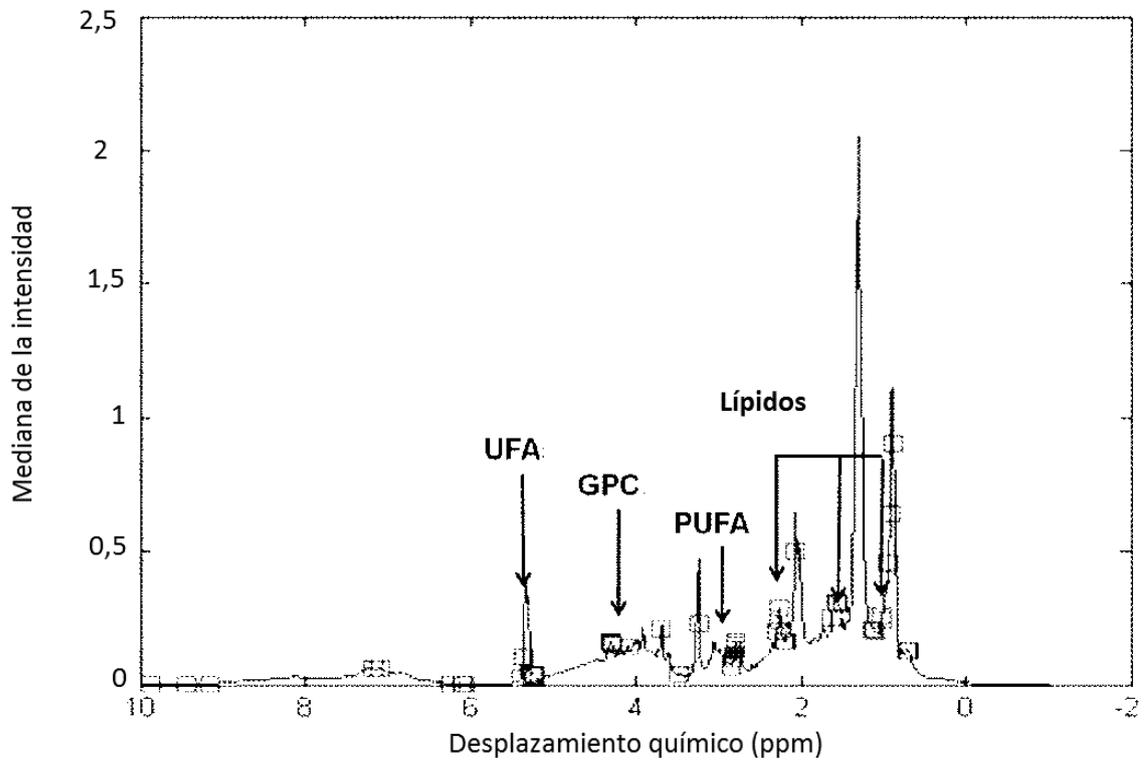


Figura 2:

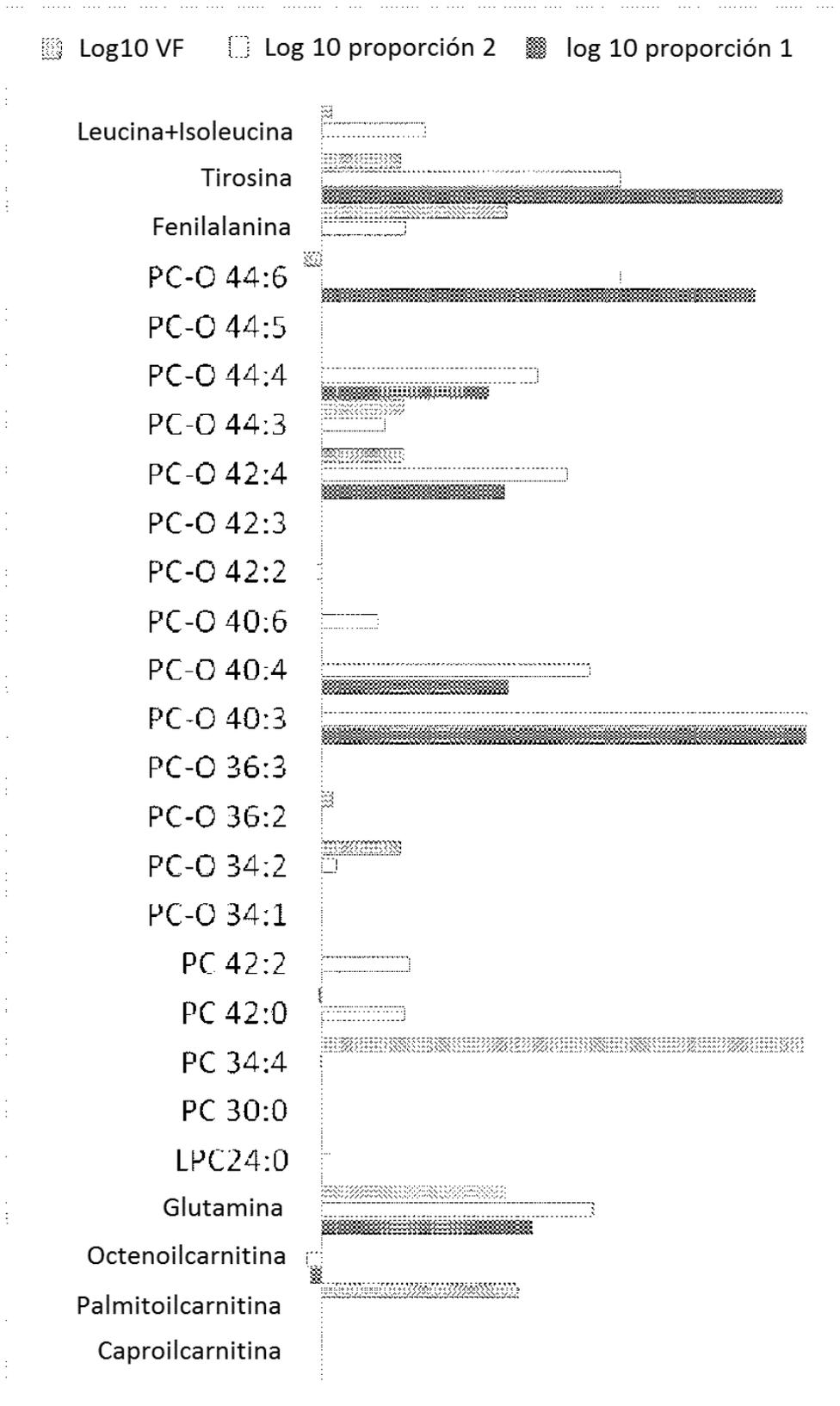


Figura 3-1:

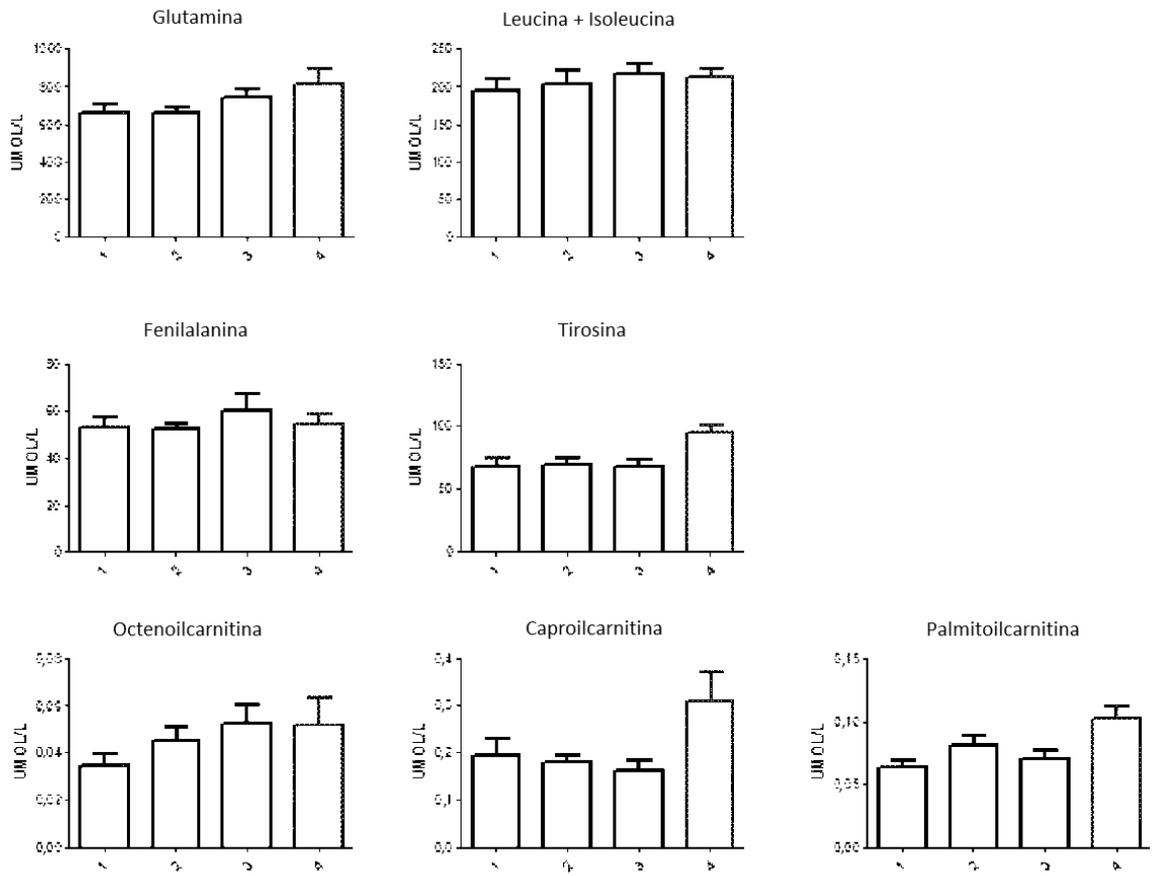


Figura 3-2:

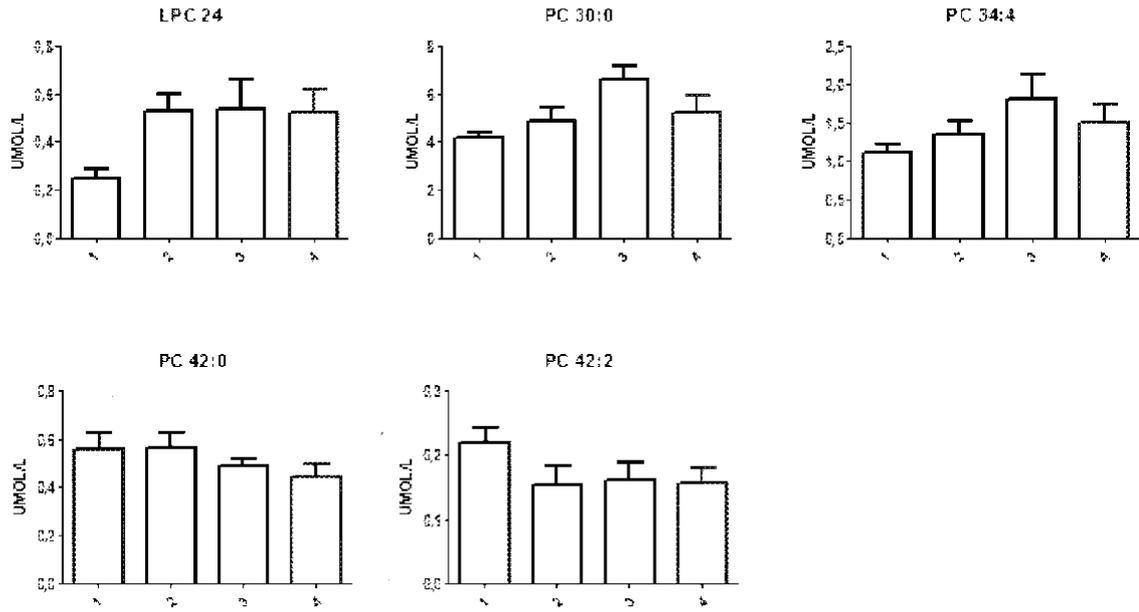


Figura 3-3:

