

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 633 769**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.11.2013 PCT/EP2013/074566**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.06.2014 WO14086603**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.11.2013 E 13795246 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.05.2017 EP 2929353**

54 Título: **Hexanoilglicina como biomarcador para la predisposición al aumento de peso y a la obesidad**

30 Prioridad:

04.12.2012 EP 12195487

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

25.09.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MARTIN, FRANÇOIS-PIERRE;
BOULANGE, CLAIRE L.;
MONTOLIU ROURA, IVAN;
COLLINO, SEBASTIANO;
DUMAS, MARC-EMMANUEL;
HOLMES, ELAINE;
REZZI, SERGE ANDRÉ DOMINIQUE;
NICHOLSON, JEREMY y
KOCHHAR, SUNIL**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 633 769 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

Hexanoilglicina como biomarcador para la predisposición al aumento de peso y a la obesidad

- 5 La presente invención se refiere, en general, al campo de la nutrición y de la salud. En particular, la presente invención se refiere a un nuevo biomarcador, a su uso y a un método que permita diagnosticar la probabilidad de oponer resistencia al aumento de peso inducido por la dieta y/o de ser susceptible a un aumento de peso inducido por la dieta. Por ejemplo, el biomarcador puede ser hexanoilglicina. Este biomarcador también puede usarse para diagnosticar/controlar el efecto de un cambio en el estilo de vida sobre el riesgo de aumento de peso en un sujeto.
- 10 La obesidad se ha convertido en uno de los problemas más importantes de la salud global en el siglo XXI, ya que aumenta el riesgo de desarrollar otras enfermedades como la diabetes de tipo 2, la esteatosis hepática (NAFLD), cánceres, artritis y enfermedades cardiovasculares (ECV). La etiología de la obesidad es el resultado de una compleja interacción entre factores genéticos y ambientales como la dieta alta en calorías, la falta de actividad física y el comportamiento. La flora (*microbiota*) intestinal que participa en diversas funciones fisiológicas tales como la maduración del sistema inmune innato del intestino y la digestión/absorción de nutrientes también influye en el desarrollo de varias enfermedades metabólicas, y parece tener un impacto significativo en la obesidad. Por lo tanto, la predisposición individual de la obesidad en desarrollo varía de acuerdo con estas causas multifactoriales.
- 15 La ingestión de una dieta desequilibrada rica en grasas y/o en hidratos de carbono se ha asociado con una mayor tasa de almacenamiento de triglicéridos en los tejidos adiposos, así como en los tejidos magros tales como el hígado, los músculos y el corazón. Esta lipotoxicidad inducida por la deposición de grasa ectópica también se correlaciona con una selección de trastornos metabólicos tales como hipertrigliceridemia, hipertensión, alto nivel de glucosa en ayunas y resistencia a la insulina (RI). Sin embargo, algunas personas con sobrepeso u obesidad pueden desarrollar diversos trastornos metabólicos, mientras que otras se mantienen sanas. Por ejemplo, la ubicación de la deposición de grasa en el cuerpo influye en el desarrollo de trastornos metabólicos. La grasa epicárdica, que es eficiente para liberar adiponectinas proaterógenas y procesar los ácidos grasos, se ha correlacionado positivamente con los marcadores de la ECV en los seres humanos. Por el contrario, la grasa intrahepática se ha asociado con la inflamación y la resistencia a la insulina. Wildman *et al.* también destacaron que las diferencias raciales-étnicas en las mujeres sanas de mediana edad se asocian con la actividad metabólica diferencial de los tejidos adiposos viscerales y subcutáneos que podrían influir en la predisposición étnica para desarrollar obesidad y ECV. Como resultado de ello, es relevante identificar la probabilidad de desarrollar trastornos metabólicos relacionados con la obesidad en una etapa temprana, con el fin de evaluar el estado metabólico individual y prevenir eficazmente el desarrollo de enfermedades metabólicas.
- 20 La ingestión de una dieta desequilibrada rica en grasas y/o en hidratos de carbono se ha asociado con una mayor tasa de almacenamiento de triglicéridos en los tejidos adiposos, así como en los tejidos magros tales como el hígado, los músculos y el corazón. Esta lipotoxicidad inducida por la deposición de grasa ectópica también se correlaciona con una selección de trastornos metabólicos tales como hipertrigliceridemia, hipertensión, alto nivel de glucosa en ayunas y resistencia a la insulina (RI). Sin embargo, algunas personas con sobrepeso u obesidad pueden desarrollar diversos trastornos metabólicos, mientras que otras se mantienen sanas. Por ejemplo, la ubicación de la deposición de grasa en el cuerpo influye en el desarrollo de trastornos metabólicos. La grasa epicárdica, que es eficiente para liberar adiponectinas proaterógenas y procesar los ácidos grasos, se ha correlacionado positivamente con los marcadores de la ECV en los seres humanos. Por el contrario, la grasa intrahepática se ha asociado con la inflamación y la resistencia a la insulina. Wildman *et al.* también destacaron que las diferencias raciales-étnicas en las mujeres sanas de mediana edad se asocian con la actividad metabólica diferencial de los tejidos adiposos viscerales y subcutáneos que podrían influir en la predisposición étnica para desarrollar obesidad y ECV. Como resultado de ello, es relevante identificar la probabilidad de desarrollar trastornos metabólicos relacionados con la obesidad en una etapa temprana, con el fin de evaluar el estado metabólico individual y prevenir eficazmente el desarrollo de enfermedades metabólicas.
- 25 Newgard *et al.* 2009, *Cell Metabolism*, 9, 311-326, identificaron a los aminoácidos de cadena ramificada (BCCA) como un tipo de marcador para la diferenciación de los individuos obesos frente a los individuos delgados, en los que el aumento del distintivo de BCCA, en particular, valina y leucina/isoleucina, en los individuos obesos se correlaciona con la resistencia a la insulina.
- 30 Por lo tanto, sería deseable aportar a la técnica un método que permitiera la identificación precoz de los sujetos – lo ideal sería que fuera antes de que subieran de peso – con probabilidad de aumentar de peso al consumir dietas ricas en grasas.
- 35 Cualquier referencia a los documentos de la técnica anterior que se realice en la presente memoria descriptiva no debe considerarse una admisión de que dicha técnica anterior sea ampliamente conocida o forme parte del conocimiento general común en el campo.
- 40 El objeto de la presente invención es mejorar el estado de la técnica y, en particular, proporcionar un método que permita estratificar eficazmente a las personas precozmente, sea o no probable que respondan a una dieta rica en grasas con aumento de peso.
- 45 Como se usan en la presente memoria descriptiva, el término "comprende", la expresión "que comprende" y los términos similares, no se interpretarán en un sentido exclusivo ni exhaustivo. En otras palabras, pretenden significar "incluyendo, pero sin limitación".
- 50 Los inventores han usado una metodología de metabonómica para alcanzar el objetivo de la presente invención. La metabonómica se considera hoy en día una metodología de sistema bien establecido para caracterizar el fenotipo metabólico, que comprende la influencia de diversos factores tales como el medio ambiente, los fármacos, la dieta, el estilo de vida, la genética y los factores microbiómicos. A diferencia de la expresión génica y de los datos proteómicos que indican el potencial de cambios fisiológicos, los metabolitos y sus cambios dinámicos de concentración dentro de las células, de los tejidos y de los órganos representan los criterios de valoración reales de los procesos de regulación fisiológica.
- 55 Por lo tanto, es una metodología adecuada investigar los cambios metabólicos graduales relacionados con diversas intervenciones en la dieta y el desarrollo de enfermedades. Recientemente, los descubrimientos basados en la

metabolómica y 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. En particular, los datos "ómicos" han puesto de relieve la contribución del metabolismo energético (ciclo de Krebs), el procesamiento de los lípidos y de los aminoácidos, así como las señales inflamatorias al inicio de la obesidad y la IR.

Los inventores han identificado nuevos biomarcadores metabólicos de aumento de peso gradual inducido por una dieta rica en grasas en un modelo de ratón C57BL/6J bien definido usando una combinación de espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protones (RMN de ^1H) de muestras de orina recogidas a lo largo del tiempo y el control del aumento de peso. Este modelo animal es muy conocido para mostrar fenotipos extremos entre animales isogénicos, es decir, animales resistentes o propensos a la distribución del aumento de peso inducida con alto contenido de grasas. Los presentes inventores han caracterizado la adaptación metabólica a corto plazo (7 días) y a largo plazo (60 días) de ratones C57BL/6 alimentados con una dieta rica en grasas (DRG) y han establecido los distintivos metabólicos específicos asociados con la variabilidad fenotípica en ratones alimentados con DRG, es decir, animales resistentes o propensos al aumento de peso inducido con un alto contenido de grasas. Mediante el uso de una metodología metabonómica, los inventores han demostrado que las vías metabólicas mitocondriales (oxidación β de ácidos grasos, catabolismo de aminoácidos de cadena ramificada, metabolismo del butanoato, vía del dinucleótido nicotinamida adenina y ciclo de Krebs) son rápidamente reguladas por aumento mediante la alimentación rica en grasas, lo que podría reflejar una saturación de los ácidos grasos de las mitocondrias y un deterioro del metabolismo energético.

Los inventores podrían mostrar que los ratones resistentes a la obesidad sometidos a una DRG están asociados con una activación específica de las vías oxidativas mitocondriales (oxidación β , metabolismo del butanoato y catabolismo de la leucina) que puede ser un mecanismo protector contra la sobrecarga de ácidos grasos.

Estos resultados enfatizan el papel de las mitocondrias en el desarrollo de la obesidad y permiten concluir que la probabilidad de desarrollar trastornos metabólicos, tales como la obesidad, puede determinarse a partir de un distintivo metabólico precoz usando un conjunto específico de biomarcadores identificados por los inventores.

Los inventores pudieron demostrar que la respuesta metabólica de la orina tras una semana de alimentación rica en grasas (Día 7) no solo permite predecir el aumento de peso final para cada individuo (Día 60), sino también estratificar los animales de acuerdo con su predisposición a ser resistentes o propensos al aumento de peso inducido por un alto contenido de grasas.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un nuevo biomarcador, la hexanoilglicina.

La invención se refiere además al uso de la hexanoilglicina como biomarcador en la orina para detectar y/o cuantificar la probabilidad de oponer resistencia al aumento de peso inducido por la dieta rica en grasas. De forma similar, la invención también se refiere al uso de hexanoilglicina como un biomarcador en la orina para detectar y/o cuantificar la probabilidad de ser susceptible al aumento de peso inducido por la dieta rica en grasas.

La invención también se refiere a un método de diagnóstico de la probabilidad de oponer resistencia a un aumento de peso inducido por una dieta rica en grasas en un sujeto, que comprende determinar el nivel de hexanoilglicina de una muestra de orina obtenida previamente de un sujeto que se va a analizar y comparar el nivel de hexanoilglicina del sujeto con un valor de referencia predeterminado, en el que el valor de referencia predeterminado se basa en un nivel medio de hexanoilglicina en la orina en una población de control, y en el que un aumento del nivel de hexanoilglicina en la muestra en comparación con el valor de referencia predeterminado indica un aumento de la probabilidad de oponer resistencia al aumento de peso inducido por una dieta rica en grasas. De igual manera, la invención también se refiere a un método de diagnóstico de la probabilidad de ser susceptible a un aumento de peso inducido por una dieta rica en grasas en un sujeto, que comprende determinar el nivel de hexanoilglicina de una muestra de orina obtenida previamente de un sujeto que se va a analizar y comparar el nivel de hexanoilglicina del sujeto con un valor de referencia predeterminado, en el que el valor de referencia predeterminado se basa en un nivel medio de hexanoilglicina en la orina en una población de control, y en el que una reducción del nivel de hexanoilglicina o la ausencia de cambio en la muestra en comparación con el valor de referencia predeterminado indica un aumento de la probabilidad de ser susceptible al aumento de peso inducido por una dieta rica en grasas.

Este biomarcador de la presente invención también puede usarse para diagnosticar y/o controlar el efecto de un cambio en el estilo de vida sobre el riesgo de aumento de peso en un sujeto. Para ello, se puede evaluar el nivel de biomarcador antes del cambio de estilo de vida, y se puede comparar el nivel resultante con el nivel de dicho biomarcador después del cambio de estilo de vida.

Figura 1: Variabilidad del aumento de peso corporal en una población de $n = 56$ ratones alimentados con una DRG. (A) Diseño experimental. (B) Distribución del peso corporal de los ratones después de 7 días y 60 días de alimentación con la DRG. (C) Identificación de ratones que no responden (NR) y de ratones de alta respuesta (AR) a la obesidad en cada punto de tiempo. Se observaron varios ratones NR y AR en 2 puntos de tiempo o en el transcurso general del experimento. (D) Control del peso de los ratones de control ($n = 24$), NR ($n = 30$) y AR ($n =$

29) antes de la dieta (t0), después de 7 días (t1) y 60 días (t2) de alimentación con una DRG. s ($n = \text{media} \pm \text{error típico}$, valor de p para la prueba no paramétrica de Mann y Whitney; * < 0,05; ** < 0,001, *** < 0,0001).

5 Figura 2: Perfil metabólico de la orina según la RMN de ^1H de ratones C57BL/6 alimentados con una DRG o alimentados con una DBG 7 días y 60 días después del cambio de dieta. (A) Espectro de RMN de ^1H medio de la orina de los ratones alimentados con una DBG o (B) ratones alimentados con una DRG. (C) gráfico de puntuación de OPLS-DA del perfil metabólico de la orina de ratones alimentados con una DBG y una DRG a los 7 días. (D) gráfico de puntuación de OPLS-DA del perfil metabólico de la orina de ratones alimentados con una DBG y una DRG a los 60 días. (E) El mapa de calor obtenido a partir de los gráficos de coeficientes de OPLS-DA mostró que los metabolitos resultaron ser significativamente diferentes en los ratones alimentados con una DRG y con una DBG. Los valores de correlación de los metabolitos se muestran mediante un código de colores. (El gradiente del color rojo para los metabolitos se correlacionó positivamente con los ratones alimentados con la DRG y el gradiente de los colores azules para los metabolitos se correlacionó negativamente).

15 Figura 3: Distintivo metabólico específico de ratones NR y AR. (A) Media de los espectros de RMN de ^1H de la orina de los ratones NR o (B) de los ratones AR. (C) gráfico de puntuación de OPLS-DA del perfil metabólico de la orina de ratones NR y AR a los 7 días y (D) a los 60 días. (E) El mapa de calor obtenido a partir de los gráficos de coeficientes de OPLS-DA mostró que los metabolitos resultaron ser significativamente diferentes en los ratones NR y AR. Los valores de correlación de los metabolitos se muestran mediante un código de colores. (El gradiente del color rojo para los metabolitos se correlacionó positivamente con los ratones AR y el gradiente de los colores azules para los metabolitos se correlacionó negativamente).

25 Figura 4: Cartografía del patrón de excreción urinaria de los metabolitos implicados en el metabolismo de los BCAA, del butanoato, del dinucleótido nicotinamida adenina, en el ciclo de Krebs y en la oxidación β . Las gráficas de barras mostraron la relación media con el error típico de las integrales de los metabolitos del día 7 al día 0 o del día 60 al día 0. El eje Y indica el valor de la media para los ratones BG, RG, NR y AR (unidad arbitraria). Se calcularon diferencias significativas entre las relaciones medias de BG y RG o NR y AR con la prueba no paramétrica de Mann Whitney: * < 0,05; ** < 0,001; *** < 0,0001 (valores de la media, errores típicos y valor p en las tablas suplementarias 3 y 4). Las reacciones metabólicas indirectas se destacan con las flechas discontinuas.

30 La Figura 5 muestra la importancia de los metabolitos y la consistencia de la predicción de NR y AR evaluados mediante análisis de bosques aleatorios.

35 La presente invención se refiere, en parte, a un biomarcador, siendo el biomarcador la hexanoilglicina.

En los experimentos descritos en el presente documento, los ratones alimentados con una DRG mostraron un aumento en orina de la hexanoilglicina a lo largo del tiempo. Sin pretender limitarse a la teoría, los inventores creen actualmente que la hexanoilglicina se obtiene *in vivo* a partir de la conjugación de la hexanoil-CoA con la glicina en el hígado y luego se excreta en la orina. La hexanoil-CoA es un metabolito intermedio de la oxidación β , y la carnitina es responsable de la captación de los ácidos grasos en las mitocondrias, que es una etapa inicial clave en el proceso de la oxidación β . Por consiguiente, estos resultados sugieren una regulación por aumento de la descomposición de los ácidos grasos a través de la oxidación β y enfatizan la saturación del combustible oxidativo en las mitocondrias, lo que podría alterar la homeostasis energética. El aumento de varios productos intermedios del ciclo de Krebs y productos finales de las vías del dinucleótido nicotinamida adenina en la orina de los ratones con una DRG se puede considerar la evidencia de una sobreproducción de energía. Se considera que el aumento crónico de las vías oxidativas de las mitocondrias es perjudicial para las mitocondrias, conduciendo a un deterioro de las vías oxidativas y del metabolismo energético. Además, el exceso de ácidos grasos libres se puede almacenar en forma de triglicéridos en los tejidos adiposos, así como en los tejidos magros, lo que puede potenciar la disfunción de órganos y enfermedades metabólicas tales como la esteatosis hepática o enfermedades cardiovasculares.

50 Los inventores han descubierto que la hexanoilglicina se puede usar como biomarcador en un fluido corporal para detectar y/o cuantificar la probabilidad de oponer resistencia al aumento de peso inducido por una dieta rica en grasas. El líquido corporal puede ser orina. El uso de orina como fluido corporal tiene la ventaja de que puede obtenerse con regularidad, de forma no invasiva y sin la ayuda de personal médico.

55 Este método de diagnóstico se pone en práctica fuera del cuerpo humano o animal. Por lo general, la etapa de detección y/o cuantificación del biomarcador se lleva a cabo en una muestra de fluido corporal que se obtuvo previamente del sujeto que se iba a analizar.

60 Aunque la presente invención se describe con vistas a cuantificar la probabilidad de oponer resistencia al aumento de peso inducido por la dieta rica en grasas, es evidente para los expertos en la materia que ese mismo método también se puede usar para cuantificar la probabilidad de ser susceptible a un aumento de peso inducido por una dieta rica en grasas. Los expertos en la materia comprenden que si un aumento del nivel de un biomarcador es indicativo de una mayor probabilidad de oponer resistencia al aumento de peso inducido por la dieta rica en grasas, una reducción del nivel de un biomarcador es indicativo de un aumento de la probabilidad de ser susceptible a un aumento de peso inducido por una dieta rica en grasas, y viceversa.

Por consiguiente, la presente invención también se refiere al uso de la hexanoilglicina como biomarcador en la orina para detectar y/o cuantificar la probabilidad de ser susceptible al aumento de peso inducido por una dieta rica en grasas.

5 La presente invención también se refiere a un método de diagnóstico de la probabilidad de un sujeto a oponer resistencia a un aumento de peso inducido por una dieta rica en grasas, que comprende determinar el nivel de hexanoilglicina de una muestra de orina obtenida previamente de un sujeto que se va a analizar y comparar el nivel de hexanoilglicina del sujeto con un valor de referencia predeterminado, en el que el valor de referencia predeterminado se basa en un nivel medio de hexanoilglicina en la orina en una población de control, y en el que un
10 aumento del nivel de hexanoilglicina en la muestra en comparación con el valor de referencia predeterminado indica un aumento de la probabilidad de oponer resistencia al aumento de peso inducido por una dieta rica en grasas.

La presente invención también se refiere a un método de diagnóstico de la probabilidad de ser susceptible a un aumento de peso inducido por una dieta rica en grasas en un sujeto, que comprende determinar el nivel de hexanoilglicina de una muestra de orina obtenida previamente de un sujeto que se va a analizar y comparar el nivel de hexanoilglicina del sujeto con un valor de referencia predeterminado, en el que el valor de referencia predeterminado se basa en un nivel medio de hexanoilglicina en la orina en una población de control, y en el que una reducción del nivel de hexanoilglicina en la muestra en comparación con el valor de referencia predeterminado indica un aumento de la probabilidad de ser susceptible al aumento de peso inducido por una dieta rica en grasas.
15

20 El uso de orina como muestra tiene la ventaja de que puede obtenerse de forma no invasiva usando un procedimiento bien establecido. El método de diagnóstico real se lleva a cabo fuera del cuerpo.

25 El nivel de hexanoilglicina en la muestra se puede detectar y cuantificar mediante cualquier medio conocido en la técnica. Por ejemplo, puede usarse RMN de ¹H, espectroscopia de masas, por ejemplo, UPLC-ESI-MS/MS. También se pueden usar otros métodos, tales como otros métodos espectroscópicos, métodos cromatográficos, técnicas de marcaje o métodos químicos cuantitativos. Lo ideal es determinar el nivel de hexanoilglicina en la muestra y el valor de referencia mediante el mismo método.

30 El valor de referencia predeterminado puede basarse en un nivel medio de hexanoilglicina en el fluido corporal analizado de una población de control. La población control puede ser un grupo de al menos 3, preferentemente al menos 10, más preferentemente al menos 50 personas con antecedentes genéticos, edad y estado de salud medio similares.

35 La presente invención permite, por ejemplo, estratificar los sujetos precozmente, antes de que suban de peso, lo que puede dar lugar a riesgos para la salud. Al ser consciente de si uno es susceptible al aumento de peso inducido por una dieta rica en grasas, se puede ajustar el estilo de vida y la dieta de forma correspondientemente precoz. Un estilo de vida adecuado, idealmente acompañado de un régimen nutricional personalizado, permite mantener un estado físico sano y evita que se tengan que hacer esfuerzos significativos en términos de restricciones calóricas y/o
40 ejercicio para recuperar ese estado físico saludable.

Aunque la hexanoilglicina como único marcador es eficaz como herramienta para el método de diagnóstico de la presente invención, se mejorará la calidad y/o el poder predictivo de dicho diagnóstico si el diagnóstico se basa en más de un marcador.
45

Por consiguiente, se pueden usar en combinación con la hexanoilglicina uno o más marcadores para el diagnóstico de un aumento de la probabilidad de oponer resistencia al aumento de peso inducido por la dieta rica en grasas y/o para el diagnóstico de un aumento de la probabilidad de ser susceptible al aumento de peso inducido por una dieta rica en grasas.
50

Los inventores se sorprendieron al ver que también se pueden usar otros biomarcadores para detectar un aumento de la probabilidad de oponer resistencia al aumento de peso inducido por la dieta rica en grasas y/o para el diagnóstico de un aumento de la probabilidad de ser susceptible al aumento de peso inducido por una dieta rica en grasas.
55

Como tales, los inventores han identificado que el aumento de las concentraciones en orina de isovalerilglicina, leucina, isobutirato, acetato, y la reducción de la concentración en orina de trimetilamina-*N*-óxido, guanidoacetato, sacarosa, ácido tartárico, ácido hipúrico e hidroxifenilacetilglicina permiten diagnosticar una mayor probabilidad de oponer resistencia al aumento de peso inducido por una dieta rica en grasas.
60

Los métodos de la presente invención pueden, por lo tanto, comprender las etapas de determinar el nivel de al menos un biomarcador adicional seleccionado del grupo que consiste en trimetilamina-*N*-óxido, isovalerilglicina, leucina, isobutirato, acetato, guanidoacetato, sacarosa, ácido tartárico, ácido hipúrico e hidroxifenilacetilglicina en la muestra de orina y comparar el nivel en el sujeto del al menos un biomarcador adicional con un valor de referencia predeterminado, en el que el valor de referencia predeterminado se basa en niveles medios de ese al menos un biomarcador adicional en una muestra de orina de una población de control normal y sana, y en el que una
65

- reducción de trimetilamina-*N*-óxido, guanidoacetato, sacarosa, ácido tartárico, ácido hipúrico y/o hidroxifenilacetilglicina, y un aumento del nivel de isovalerilglicina, leucina, isobutirato, acetato en la muestra de orina en comparación con valores de referencia predeterminados indica un aumento de la probabilidad de oponer resistencia al aumento de peso inducido por la dieta rica en grasas. Por consiguiente, una reducción del nivel de
- 5 isovalerilglicina, leucina, isobutirato, acetato, y un aumento del nivel de trimetilamina-*N*-óxido, guanidoacetato, sacarosa, ácido tartárico, ácido hipúrico y/o hidroxifenilacetilglicina en la muestra de orina en comparación con los valores de referencia predeterminados indica una mayor probabilidad de ser susceptible al aumento de peso inducido por la dieta rica en grasas.
- 10 Además, los biomarcadores adicionales se pueden detectar y cuantificar mediante RMN de ¹H o espectroscopia de masas, por ejemplo, UPLC-ESI-MS/MS. También se pueden usar otros métodos, tales como otros métodos espectroscópicos, métodos cromatográficos, técnicas de marcaje o métodos químicos cuantitativos.
- 15 Lo ideal es evaluar todos los biomarcadores mediante la misma tecnología. Pueden evaluarse simultáneamente.
- 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.
- 20 Por ejemplo, la hexanoilglicina puede evaluarse junto con la trimetilamina-*N*-óxido. La hexanoilglicina también se puede evaluar junto con la isovalerilglicina. La hexanoilglicina también se puede evaluar junto con la leucina. La hexanoilglicina también se puede evaluar junto con el acetato. La hexanoilglicina también se puede evaluar junto con la trimetilamina-*N*-óxido y la isovalerilglicina. La hexanoilglicina también se puede evaluar junto con la trimetilamina-*N*-óxido, la isovalerilglicina y la leucina. La hexanoilglicina también se puede evaluar junto con la trimetilamina-*N*-óxido, la isovalerilglicina y el acetato. La hexanoilglicina también se puede evaluar junto con la trimetilamina-*N*-óxido,
- 25 la isovalerilglicina, el acetato y la leucina. La hexanoilglicina también se puede evaluar junto con la trimetilamina-*N*-óxido, la isovalerilglicina, el acetato, la leucina y el guanidoacetato. La hexanoilglicina también se puede evaluar junto con la trimetilamina-*N*-óxido, la isovalerilglicina, el acetato, la leucina, el guanidoacetato y el ácido hipúrico.
- 30 La ventaja de evaluar más de un biomarcador es que cuanto más biomarcadores se evalúen, más fiable será el diagnóstico. Si, por ejemplo, más de 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 biomarcadores presentan las elevaciones o disminuciones en la concentración como se ha descrito anteriormente, la potencia predictiva para detectar y/o cuantificar la probabilidad de ser resistente y/o ser susceptible al aumento de peso inducido por un adieta rica en grasas es mayor.
- 35 El valor de referencia para la hexanoilglicina y, opcionalmente, de los otros biomarcadores se mide preferentemente usando las mismas unidades usadas para caracterizar el nivel de hexanoilglicina y, opcionalmente, los otros biomarcadores obtenidos del sujeto de ensayo. Por lo tanto, si el nivel de hexanoilglicina y, opcionalmente, los otros biomarcadores es un valor absoluto tal como las unidades de hexanoilglicina en $\mu\text{mol/l}$ (μM), el valor de referencia también se basa en las unidades de hexanoilglicina en $\mu\text{mol/l}$ (μM) en individuos de la población general o de una
- 40 población de control seleccionada de sujetos.
- Además, el valor de referencia puede ser un valor de corte único, tal como una mediana o una media. Los valores de referencia de la hexanoilglicina y, opcionalmente, de los otros biomarcadores en muestras de fluidos corporales obtenidas, tales como niveles medios, mediana de los niveles o niveles de "corte", pueden establecerse ensayando
- 45 una gran muestra de individuos de la población general o la población seleccionada y usando un modelo estadístico tal como el método del valor predictivo para seleccionar un criterio de positividad o una curva de característica operativa del receptor que defina la especificidad óptima (tasa verdadera negativa más alta) y la sensibilidad (tasa verdadera positiva más alta) como se describe en Knapp R. G., y Miller, M. C. (1992). "Clinical Epidemiology and Biostatistics". William and Wilkins, Harual Publishing Co. Malvern, Pa., que se incorpora en el presente documento
- 50 por referencia.
- Los expertos en la materia sabrán cómo asignar valores de referencia correctos, ya que variarán, por ejemplo, con el género, la raza, el patrimonio genético, el estado de salud o la edad.
- 55 En el método de la presente invención, una menor probabilidad de oponer resistencia al aumento de peso inducido por la dieta rica en grasas es indicativa de la probabilidad de desarrollar trastornos asociados con el sobrepeso y/o la obesidad.
- 60 El "sobrepeso" se define para un ser humano adulto con un IMC entre 25 y 30. El "índice de masa corporal" o "IMC" significa la relación del peso en kg dividido entre la altura en metros al cuadrado. La "obesidad" es una afección en la que la reserva de energía natural, almacenada en el tejido graso de los animales, en particular, de los seres humanos y de otros mamíferos, se aumenta hasta un punto en el que se asocia con ciertas afecciones o con el aumento de la mortalidad. "Obeso" se define para un ser humano adulto con un IMC superior a 30.
- 65 Los trastornos asociados con el sobrepeso y/o la obesidad pueden ser enfermedades cardiometabólicas y/o irregularidades metabólicas.

5 El método de la presente invención permite, por ejemplo, determinar el grado de susceptibilidad de los sujetos al aumento de peso inducido por la dieta. Por consiguiente, el método puede permitir la estratificación de los pacientes de acuerdo con su probabilidad de subir de peso basándose en una dieta de alto nivel de calorías, en particular, rica en grasas, independientemente de si tienen un nivel inferior al normal, un peso normal, sobrepeso u obesidad. Las personas adultas se consideran de peso inferior al normal si tienen un IMC igual o inferior a 18,5.

10 El método de la presente invención también se puede llevar a cabo en sujetos de peso inferior al normal, de peso normal, con sobrepeso u obesos. En particular, en el caso de los sujetos con un peso inferior al normal, con sobrepeso u obesos, el método de la presente invención puede ayudar a dilucidar la predisposición genética del sujeto. Basándose en ello - e idealmente bajo un mayor examen de su estado general de salud y estilo de vida - se pueden desarrollar regímenes nutricionales personalizados que puedan ayudar a mantener o recuperar un estado saludable.

15 El método de la presente invención no se limita a los seres humanos. También puede usarse en animales tales como, por ejemplo, animales de compañía. Se pueden analizar animales de compañía tales como gatos o perros. Basándose en ello, se pueden diseñar regímenes nutricionales que contribuyan a una larga vida del animal de compañía en buen estado de salud.

20 El estudio presentado en la presente solicitud proporciona una visión de los mecanismos fisiológicos relacionados con el desarrollo de la obesidad inducida por un DRG (dieta rica en grasas) y, en particular, destaca las adaptaciones metabólicas específicas asociadas con la variabilidad del fenotipo obeso. La alta ingesta de grasas provoca una regulación por aumento rápida y sistemática de las vías metabólicas mitocondriales que genera una mayor producción de energía y un aumento de la saturación de los ácidos grasos mitocondriales. Entre los ratones alimentados con DRG, se identificaron ratones resistentes a la obesidad (NR), que activaron, en particular, vías metabólicas mitocondriales específicas (oxidación β , metabolismo del butanoato y catabolismo de la leucina) y parecían mantener la homeostasis energética (actividad del ciclo de Krebs comparable a la DBG). Por consiguiente, los resultados del inventor sugieren que una activación específica de las vías oxidativas mitocondriales podría permitir conservar la homeostasis energética y proteger las mitocondrias contra la sobrecarga de combustible. Por lo tanto, el papel de las mitocondrias parece ser crucial en el desarrollo de la obesidad y sus trastornos metabólicos asociados. Por consiguiente, este análisis exhaustivo de los mecanismos subyacentes de la adaptación heterogénea a la alimentación con una DRG proporciona nuevas y prometedoras perspectivas para los programas de control de peso y las soluciones nutricionales personalizadas.

35 Por consiguiente, si el método de la presente invención permite identificar una reducción de la probabilidad de oponer resistencia al aumento de peso inducido por la dieta rica en grasas o un aumento de la probabilidad de ser susceptible al aumento de peso inducido por la dieta rica en grasas, esto puede ser indicativo de una falta de activación específica de las vías oxidativas mitocondriales.

40 Por el contrario, si el método de la presente invención permite identificar un aumento de la probabilidad de oponer resistencia al aumento de peso inducido por la dieta rica en grasas o una reducción de la probabilidad de ser susceptible al aumento de peso inducido por la dieta rica en grasas, esto puede ser indicativo de una activación específica de las vías oxidativas mitocondriales.

45 Las vías oxidativas mitocondriales pueden seleccionarse del grupo que consiste en oxidación β , metabolismo del butanoato y catabolismo de la leucina.

50 Como el método de la presente invención permite la estratificación del sujeto sin la necesidad de tener visibles los síntomas de las predisposiciones, es adecuado, por ejemplo, para niños, adolescentes, adultos jóvenes y/o sujetos con riesgo de desarrollar sobrepeso u obesidad.

Mediante la sensibilización, dicho riesgo se puede abordar satisfactoriamente en términos de dieta y estilo de vida, y se pueden eliminar los posibles riesgos que puedan derivar del sobrepeso o de la obesidad más adelante en la vida.

55 Por consiguiente, el método puede usarse para idear una dieta estratificada para un grupo específico de sujetos o una dieta personalizada para un sujeto específico.

60 Los expertos en la materia entenderán que pueden combinar libremente todas las características de la presente invención desveladas en el presente documento. En particular, las características descritas para el uso de la presente invención pueden combinarse con el método de la presente invención y viceversa. Además, las características descritas para diferentes realizaciones de la presente invención pueden combinarse.

Aunque la invención se ha descrito a modo de ejemplo, debe apreciarse que pueden realizarse variaciones y modificaciones sin apartarse del alcance de la invención como se define en las reivindicaciones.

Además, cuando existen equivalentes conocidos a características específicas, dichos equivalentes se incorporan como si se refirieran específicamente a la presente memoria descriptiva. Otras ventajas y características de la presente invención son evidentes a partir de las figuras y ejemplos no limitantes.

5 Ejemplos

Procedimiento de manipulación de los animales y preparación de las muestras:

El experimento se llevó a cabo de conformidad con las directrices nacionales apropiadas en el Centro de Investigación de Nestlé (NRC, Suiza). Los ratones se mantuvieron en jaulas individuales bajo un régimen de luz-oscuridad de 12 h–12 h, y se alimentaron a voluntad durante el experimento general. Un total de 80 ratones C57BL/6 recibió en primer lugar una DP (dieta de pienso) convencional (línea basal de 3.437) durante varias semanas, y se llevó a cabo una primera recogida de orina después de este tratamiento (t0). Los ratones se dividieron entonces en 2 grupos: 24 ratones fueron alimentados con una DP diferente (D12450B baja en grasas, para la composición véanse las figuras complementarias), en la que la proporción de proteínas, vitaminas, minerales e hidratos de carbono era diferente de la primera dieta convencional. Otros 56 ratones fueron alimentados con una DRG (D12492 rica en grasas), en la que la composición de la dieta aparte del nivel de hidratos de carbono y grasas, era comparable a la segunda DP. Estos dos grupos se caracterizaron respectivamente como grupos de control y grupos OID. Una vez más, se recogieron muestras de orina 7 días (t1) y 60 días (t2) después del cambio de dieta. Se congelaron instantáneamente todas las muestras a -80 °C hasta su análisis. También se pesaron todos los ratones en t0, t1, t2 con el fin de controlar el aumento de peso tanto en la DRG como en los grupos de control. La diferencia en el aumento de peso de la DRG y la DBG, así como NR y AR se evaluó mediante la prueba no paramétrica (prueba U de Wilcoxon-Mann-Whitney). También se registró la ingesta de comida (IC) de cada ratón en t1 y t2. Hay una reducción significativa de la IC en los ratones alimentados con la DRG en comparación con los ratones alimentados con la DBG a lo largo del tiempo. Los ratones AR también tienen una IC más alta que los ratones NR en ambos puntos de tiempo. La diferencia en la IC entre los grupos se calculó mediante la prueba U de Wilcoxon-Mann-Whitney.

Espectroscopia de RMN de ¹H

Se diluyó un volumen de 40 µl de orina en 20 µl de solución tampón (NaHPO₄, 0,6 M pH = 7) que contenía azida sódica (3 mM) y TSP (0,5 mM). Tras la centrifugación, se transfirieron las muestras a tubos de RMN de 1,7 mm de diámetro usando una jeringa. Los espectros de RMN de ¹H se registraron entonces en un espectrómetro de 600,13 MHz, realizando 64 exploraciones de una secuencia convencional con 64K puntos de datos. La temperatura del experimento de RMN se mantuvo a 26,85 °C (300 K). El procesamiento de los espectros de orina se llevó a cabo usando el software TOPSPIN 2.0 (Bruker Biospin, Rheinstetten, Alemania). Para cada espectro, se multiplicaron los FID por una función exponencial correspondiente a una ampliación de la línea de 1 Hz, antes su transformación en el espectro por un transformador de Fourier. A continuación, se corrigieron la fase y la línea basal de los espectros manualmente. El desplazamiento químico se calibró usando la señal TSP a δ 0. Las asignaciones espectrales se obtuvieron mediante el uso de STOCSY (Statistical TOtal Correlation Spectroscopy), bases de datos espectrales y la asignación publicada.

Procesamiento de datos y análisis de datos de múltiples variables:

Los datos espectrales (desde δ 0,2 hasta δ 9,5) fueron finalmente importados al software Matlab (versión, the mathworks Inc, Natwick MA) y se transformaron en 22K puntos de datos. Se eliminó la resonancia del pico del agua (δ 4,7-5,05) de cada espectro para eliminar la variabilidad ligada a la presaturación de resonancia del agua. Los espectros de RMN de ¹H se normalizaron entonces sobre la superficie total y se aplicaron diferentes estadísticas de múltiples variables (PCA, OPLS y OPLSDA) usando escalado de "varianza unitaria". El coeficiente de regresión OPLS se puede mostrar usando un método de regresión. De esta manera, se puede estimar la proporción de varianza de cada variable de RMN responsable de la diferenciación grupal en el modelo. La construcción de mapas de calor que muestran los metabolitos con valores de coeficientes más altos proporciona una comparación fácil de las respuestas metabólicas a corto y largo plazo con la alimentación mediante una DRG. Los mapas de calor se generaron tomando los valores del coeficiente de correlación de los metabolitos diferenciadores de DRG/DBG o AR/NR. Los coeficientes de correlación por encima del punto de corte de 0,3 se muestran mediante un mapa de color (gradientes desde el rojo al azul de acuerdo con el valor de la covarianza en cada metabolito). Por consiguiente, mapas de calor proporcionan una fácil comparación de las respuestas metabólicas a corto y largo plazo al desarrollo de la obesidad.

60 Análisis de datos con una variable

Se integraron los metabolitos intermedios de la oxidación β, la oxidación BCAA, el ciclo de Krebs y las vías del dinucleótido nicotinamida adenina asignables a los espectros de RMN de ¹H de la orina para evaluar la excreción urinaria de estos metabolitos 7 días y 60 días después del cambio de dieta en los grupos de DBG, DRG, NR y AR. Para cada metabolito, se dividió la integral a los 7 días y 60 días entre la integral al día 0 (durante el periodo previo a la intervención) con el fin de normalizar la excreción urinaria de estos metabolitos de acuerdo con la línea basal. Se

comparó la proporción obtenida para cada metabolito entre los grupos de DBG, DRG, NR y AR en cada punto de tiempo usando la prueba no paramétrica de Mann y Whitney.

Principales hallazgos y aspectos destacados:

5

Variabilidad del aumento de peso en ratones C57BL/6J alimentados con una DRG

10 Para estudiar la contribución de las dietas al desarrollo de la obesidad, se alimentaron 60 ratones C57BL/6J con una dieta de pienso (DP) durante un período previo a la intervención de 1 semana, seguido de un cambio de la dieta donde los ratones fueron alimentados con una DBG (n = 20) o una DRG (n = 40) durante 60 días. Se midió el peso corporal durante el período previo a la intervención, y 7 y 60 días después del cambio en la dieta (Figura 1.A). El control del peso mostró un aumento significativo del peso en los ratones alimentados con la DRG en comparación con los ratones alimentados con la DBG a lo largo del experimento. En particular, el peso medio de los ratones alimentados con la DRG fue 1,5 g superior ($p = 3,9 \times 10^{-7}$) a los 7 días y 4,5 g superior ($p = 2,36 \times 10^{-8}$) a los 60 días que los ratones de control. La distribución del peso también reveló una fuerte heterogeneidad entre el grupo de DRG a los 7 días (coeficiente de variación CV = 0,05), que fue aún más notable a los 60 días (CV = 0,120). (Figura 1.B). Dicha observación pone de relieve la existencia de una fuerte variabilidad fenotípica dentro del grupo de DRG, y sugiere la existencia de firmas metabólicas específicas asociadas a estos fenotipos sub-obesos.

20 Para caracterizar a los ratones de "Alta Respuesta" (AR) y a los que "No Responden" (NR) a la alimentación RG, se estratificó la población de ratones de acuerdo con el aumento de peso corporal (APC) tras 7 días y 60 días de alimentación RG. Los ratones que estaban sistemáticamente en los tercios parte e inferior de la distribución del APC se designaron como ratones NR y AR, respectivamente, a excepción de los 3 ratones AR que estaban en la mitad superior de la distribución del APC a los 60 días. Este umbral se seleccionó con el fin de obtener suficientes muestras en cada grupo (ratones NR n = 10; ratones AR = 14) y realizar pruebas estadísticas de gran alcance, así como para identificar diferencias significativas en los distintivos metabólicos entre estos dos grupos. La trayectoria del peso medio de los ratones NR, AR y alimentados con DBG a lo largo del tiempo (Figura 1.D) reveló que los ratones AR ganaron significativamente más peso que los ratones NR y los ratones alimentados con DBG durante el experimento. Curiosamente, no hubo diferencias significativas en el peso corporal entre el grupo NR y el grupo de DBG a los 7 días ($p = 0,10$), pero se identificó una variación significativa en el peso corporal a los 60 días ($p = 7,67 \times 10^{-5}$). Además, la trayectoria de aumento de peso corporal de los ratones NR (coeficiente de regresión = 3,85) fue similar con los ratones alimentados con DBG, resaltando que el comportamiento de aumento de peso de los ratones NR era comparable al de los ratones de DBG a lo largo del tiempo, mientras que los ratones AR tendían a acumular peso más rápidamente. Esta inflexión temprana y sostenida de la trayectoria del aumento de peso corporal, que define los subgrupos de ratones de alta respuesta y que no responden sugiere la existencia de una predisposición diferencial a la obesidad inducida por la dieta (OID) en ratones C57BL/6J. Por consiguiente, en el presente estudio, se va a ensayar la capacidad de predecir las trayectorias de aumento de peso en ratones alimentados con DRG basándose en perfiles metabólicos precoces.

40 El perfil metabólico de la orina señala el distintivo metabólico sostenido asociado con la obesidad inducida por la dieta rica en grasas

45 Para investigar el distintivo metabólico específico asociado con el desarrollo de la obesidad inducida por la dieta, se adquirieron perfiles metabólicos de la orina 1 semana antes, 7 y 60 días después de la intervención con la dieta usando espectroscopia de RMN de ^1H (Figura 2.A, 2.B). Se compararon los perfiles metabólicos de la orina de los ratones alimentados con DBG y DRG en cada punto de tiempo usando modelos OPLS-DA. Cada modelo se calculó usando un componente predictivo y varios componentes ortogonales. El número óptimo de componentes ortogonales fue determinado por las estadísticas de bondad de ajuste $R^2\text{Y}$ y $Q^2\text{Y}$. Los gráficos de puntuación de OPLS-DA para los modelos a los 7 días (Figura 2.C) y 60 días (Figura 2.D) mostraron que la fuerte variación metabólica asociada con la alimentación mediante la DRG se destacó a lo largo del componente predictivo (T pred), mientras que el segundo eje que ilustra el primer componente ortogonal (T ort) refleja la variabilidad dentro del grupo vinculada a los efectos independientes de la dieta.

55 Para cada modelo, se identificaron los metabolitos con el mayor coeficiente de correlación y se resumieron en un mapa de calor (Figura 2.E), indicando las variaciones metabólicas urinarias entre los ratones BG y RG. En concreto, el nivel de carnitina, hexanoilglicina y los productos intermedios de oxidación de BCAA (isovalerilglicina, α -ceto- β -metilvalerato y α -cetovalerato) aumentaron significativamente en el grupo RG a los 7 días y 60 días. Por el contrario, los niveles de derivados de metilamina producidos a partir del metabolismo microbiano de la colina (trimetilamina (TMA) y trimetilamina-N-óxido (TMAO)), así como el producto final de la degradación de la fenilalanina por las bacterias intestinales (fenilacetilglicina) disminuyeron en el grupo de RG durante todo el experimento. En particular, el grado de variación en el nivel urinario de TMAO entre 7 días y 60 días sugiere un cambio dependiente del tiempo en la conversión de TMA en TMAO con la alimentación de DRG. Por consiguiente, el tratamiento de DRG puede implicar cambios significativos en la actividad de la flora intestinal. La adaptación metabólica dependiente del tiempo a la alimentación con la DRG también se caracterizó por una reducción significativa del indoxilsulfato en la orina de los ratones alimentados con una DRG durante 7 días. Los productos finales de las rutas de dinucleótido nicotinamida adenina (dinucleótido nicotinamida adenina) (N1-metil-2-piridon-5-carboxamida: 2PY y N1-metil-4-piridon-3-

65

carboxamida: 4PY) también se correlacionaron positivamente con los ratones alimentados con una DRG durante 60 días. La excreción de isovalerilglicina, α -ceto- β -metilvalerato y α -cetoisovalerato aumentó de forma significativa y constante en el grupo alimentado con la DRG en comparación con el grupo alimentado con la DBG a lo largo del tiempo, por lo que constituyen biomarcadores candidatos cualitativos y estables de la OID.

5 El perfil metabólico de la orina de ratones NR y AR destaca una adaptación metabólica específica asociada con el fenotipo de tendencia a la obesidad y de resistencia a la obesidad

10 El establecimiento de perfiles metabólicos de ratones AR y NR permitió identificar los metabolitos asociados con la mayor divergencia en el aumento de peso. Se realizaron comparaciones de los datos espectrales de RMN de ^1H entre los NR y AR usando modelos de OPLS-DA por parejas a los 7 días y 60 días (Figura 3.A, 3.B). El gráfico de puntuación de OPLS-DA a los 7 días (Figura 3.C) y a los 60 días (Figura 3.D) mostró una buena diferenciación entre los ratones NR y AR a lo largo del componente predictivo (T pred). El segundo eje ilustra la variación ortogonal a la potente respuesta asociada con la obesidad. Curiosamente, no se identificaron diferencias en los perfiles metabólicos urinarios de los ratones NR y AR antes del cambio de dieta, lo que pone de manifiesto que todos los ratones C57BL/6J tenían fenotipos y metabótipos similares cuando se alimentaron con una dieta de pienso.

15 El mapa de calor (Figura 3.E) que resume los metabolitos implicados en la separación grupal mostraron perfiles metabólicos diferenciales asociados con los ratones NR y AR durante un período de corta duración (7 días) y un período de larga duración (60 días) de la alimentación de RG. En particular, se asoció un distintivo metabólico específico, que implicaba catabolismo de leucina, oxidación β y producciones de ácidos grasos de cadena corta, con la gradación de la obesidad. De hecho, la hexanoilglicina, la isovalerilglicina, la leucina, el acetato y el isobutirato se correlacionaron negativamente con los ratones AR durante el experimento general. Debido a que estos metabolitos se regulan por disminución sistemáticamente en los ratones AR, constituyeron el marcador candidato estable del fenotipo resistente a la obesidad. La comparación de los perfiles metabólicos entre los ratones AR y NR a los 7 días y 60 días también mostró un distintivo metabólico dependiente del tiempo asociado con la variabilidad fenotípica. Se observó una menor excreción urinaria del acetato en los ratones AR después de 7 días de DRG. Por el contrario, se observó una mayor excreción urinaria de la sacarosa en los ratones AR en el mismo período. Sorprendentemente, la taurina se correlacionó positivamente con los ratones AR 7 días después de la alimentación con DRG y se correlacionó negativamente con los ratones AR después de 60 días. El perfil metabólico de la orina de los ratones AR después de 60 días de DRG también estuvo marcado por un aumento de la creatina, del guanidoacetato, del tartrato, del hipurato y de la hidroxifenilacetilglicina. Curiosamente, la hexanoilglicina y la isovalerilglicina, que se caracterizaron como marcadores candidatos cualitativos de la OID, también se identificaron como un marcador candidato estable del fenotipo resistente a la obesidad. Estos resultados señalaron que el catabolismo de la leucina y la oxidación β que tienen lugar en las mitocondrias se ven muy afectados por la alimentación RG, y su regulación específica podría contribuir al inicio de la obesidad.

20 Los patrones de esfuerzo urinario de varios metabolitos señalaron irregularidades específicas del metabolismo mitocondrial en ratones RG y ratones AR

25 La regulación del metabolismo mitocondrial en ratones alimentados con DRG se investigó en mayor profundidad con la ayuda de una metodología de análisis de datos con una variable complementario (véase el método). La excreción urinaria de los productos intermedios de la oxidación β : la hexanoilglicina, la carnitina y la acilcarnitina se aumentó sistemáticamente en la orina de los ratones alimentados con DRG en comparación con los ratones alimentados con DBG, lo que sugiere un aumento del exceso de flujo de ácidos grasos en la mitocondria y una activación de la oxidación β . El producto final de las vías del dinucleótido nicotinamida adenina (2PY, 4PY) también aumentó de manera constante en orina de los ratones tras la alimentación con la DRG, lo que indica una regulación por aumento de la oxidación β y de los proliferadores de peroxidomas. Las integraciones confirmaron que la leucina, la valina, la isoleucina, así como los productos intermedios del catabolismo de los BCAA (isovalerilglicina, α -ceto- β -metilvalerato y α -cetovalerato) aumentaron de manera significativa y sistemática en los ratones alimentados con la DRG, apoyando la hipótesis de la regulación por aumento asociada con la DRG del catabolismo de los BCAA. El ciclo de Krebs también se reguló parcialmente en los ratones alimentados con DRG, pues se observó un aumento en la orina a corto plazo del succinato en el ratón 7 días después de la DRG, comparando la orina de los ratones alimentados con la DRG con la de los ratones alimentados con la DBG. Estos resultados apoyan la hipótesis de que el catabolismo de la valina y la isoleucina se regula por aumento induciendo la formación de succinil-CoA y la producción de los siguientes productos intermedios del ciclo de Krebs. Sorprendentemente, los otros productos intermedios del ciclo Krebs (citrato, *cis*-aconitasa, α -cetoglutarato) no fueron significativamente diferentes entre los ratones alimentados con DBG y DRG, sugiriendo una desconexión entre el catabolismo de la leucina y la oxidación β productora de acetil-CoA y el ciclo de Krebs. Las regulaciones metabólicas específicas podrían desviar el flujo de acetil-CoA hacia otras vías metabólicas. En particular, el aumento del nivel de vinilacetilglicina en la orina de los ratones alimentados con la DRG sugiere que la acetil-CoA podría ser redirigida hacia la acetoacetil-CoA, lo que se relaciona con el metabolismo del butanoato y la formación de vinilacetilglicina. Estos resultados confirman que la DRG induce una regulación por aumento de las vías oxidativas mitocondriales y el ciclo de Krebs, lo que podría conducir a un aumento de la producción de energía.

65

El análisis de datos con una variable también permitió comprender mejor la relación entre la oxidación β , el catabolismo de los BCAA y el ciclo de Krebs en el contexto de la variabilidad del fenotipo. Las integraciones de los productos intermedios del catabolismo de los BCAA mostraron que solo la isovalerilglicina fue significativamente mayor en la orina de los ratones NR en comparación con los ratones AR o los ratones BG indicando que los ratones resistentes a la obesidad estaban asociados con la interrupción del catabolismo de la leucina exclusivamente. La hexanoilglicina fue significativamente mayor en la orina de los ratones NR en comparación con los ratones AR durante el experimento general, mientras que la excreción urinaria de la carnitina y la acilcarnitina se mantuvo sin cambios. Por consiguiente, incluso aunque la oxidación β parecía verse afectada en los ratones NR, el flujo de ácidos grasos hacia la mitocondria es uniforme entre los ratones NR y AR. Además, se observó un aumento significativo de la vinilacetilglicina en la orina de los ratones NR sugiriendo una reorientación de la acetil-coA hacia el metabolismo del butanoato. Curiosamente, no se observaron diferencias en la actividad del ciclo de Krebs entre los ratones NR y AR después de 7 días de DRG. A los 60 días, el succinato fue significativamente superior en la orina de los ratones AR, destacando una regulación por aumento del ciclo de Krebs. Como se ha observado anteriormente, la excreción urinaria de otros productos intermedios del ciclo de Krebs (citrato, α -cetoglutaratato, *cis*-aconitato) permanecieron sin cambios entre los ratones NR y AR, apoyando la hipótesis de una regulación específica dentro del ciclo de Krebs. Los resultados de la presente invención indican que, tras un largo período de DRG, los ratones propensos a la obesidad se asocian con un deterioro del metabolismo energético que se caracteriza por una desregulación del ciclo de Krebs. La rápida activación de la oxidación β , el catabolismo de la leucina y el metabolismo del butanoato en ratones resistentes a la obesidad puede ser un mecanismo protector contra el flujo excesivo de ácidos grasos, permitiendo mantener la homeostasis energética.

Se evaluaron las relaciones de los metabolitos destacados con el aumento de peso usando la concentración urinaria de metabolitos (medida por espectroscopia de RMN de ^1H), el cambio con respecto a la línea basal (TO) y la relación con la creatina urinaria (medida por espectroscopia de RMN de ^1H). Se hizo hincapié en la capacidad para predecir el aumento de peso y estratificar a los individuos como NR o AR, basándose en la respuesta metabólica a corto plazo a la dieta a la que se expusieron (en concreto, en T7). Para seleccionar los marcadores más consistentes, se usó la precisión del % de reducción media de los datos de "fuera del casillero" como la característica de importancia de las variables. De esta manera, fue posible determinar las variables que mejor diferencian a los sujetos de acuerdo con su susceptibilidad al aumento de peso (fenotipos NR y AR, Figura 5), indicando la hexanoilglicina, la isovaleroilglicina, el TMAO y el acetato como los marcadores metabólicos más consistentes para estratificar sujetos como los fenotipos NR o AR.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método de diagnóstico de la probabilidad de un sujeto de oponer resistencia al aumento de peso inducido por una dieta rica en grasas, que comprende:
- determinar el nivel de hexanoilglicina en una muestra de orina obtenida previamente de un sujeto para su análisis; y
 - comparar el nivel de hexanoilglicina del sujeto con un valor de referencia predeterminado, en el que el valor de referencia predeterminado se basa en un nivel medio de hexanoilglicina en la orina en una población de control,
- 10 y
- en el que un aumento del nivel de hexanoilglicina de la muestra en comparación con el valor de referencia predeterminado, indica un aumento de la probabilidad de oponer resistencia al aumento de peso inducido por una dieta rica en grasas.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, que comprende además las etapas de:
- determinar el nivel de al menos un biomarcador adicional seleccionado del grupo que consiste en trimetilamina-*N*-óxido, isovalerilglicina, leucina, isobutirato, acetato, guanidoacetato, sacarosa, ácido tartárico, ácido hipúrico e hidroxifenilacetilglicina en la muestra de orina; y
 - comparar el nivel en el sujeto del al menos un biomarcador adicional con un valor de referencia predeterminado,
- 20 en el que el valor de referencia predeterminado, se basa en niveles medios de ese al menos un biomarcador adicional en una muestra de orina de una población de control normal y sana; y
- en el que un aumento del nivel de isovalerilglicina, leucina, acetato y/o una reducción del nivel de trimetilamina-*N*-óxido, guanidoacetato, sacarosa, ácido tartárico, ácido hipúrico y/o hidroxifenilacetilglicina en la muestra de orina, en comparación con los valores de referencia predeterminados, indica un aumento de la probabilidad de oponer resistencia al aumento de peso inducido por la dieta rica en grasas.
- 25 3. El método de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 2, en el que los niveles de los biomarcadores se determinan mediante RMN de ¹H y/o espectroscopia de masas en la muestra y en la referencia.
- 30 4. El método de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que una reducción de la probabilidad de oponer resistencia al aumento de peso inducido por la dieta rica en grasas, es indicativa de la probabilidad de desarrollar trastornos asociados con el sobrepeso y/o la obesidad.
- 35 5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que los trastornos asociados con el sobrepeso y/o la obesidad son enfermedades cardiometabólicas y/o irregularidades metabólicas.
- 40 6. El método de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5, que se llevará a cabo en sujetos de peso inferior al normal, de peso normal, con sobrepeso u obesos.
- 45 7. El método de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el sujeto es un ser humano o un animal de compañía tal como un gato o un perro.
- 50 8. El método de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6, en el que una reducción de la probabilidad de oponer resistencia al aumento de peso inducido por una dieta rica en grasas es indicativa de una falta de activación específica de las vías oxidativas mitocondriales.
- 55 9. El método de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6, en el que un aumento de la probabilidad de oponer resistencia al aumento de peso inducido por una dieta rica en grasas es indicativo de una activación específica de las vías oxidativas mitocondriales.
- 60 10. El método de acuerdo con una de las reivindicaciones 8-9, en el que las vías oxidativas mitocondriales se seleccionan del grupo que consiste en oxidación β, metabolismo del butanoato y catabolismo de la leucina.
11. El método de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el sujeto es un niño, un adolescente, un adulto joven y/o una persona en riesgo de desarrollar sobrepeso u obesidad.
12. El método de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el método se usa para idear una dieta estratificada para un grupo específico de sujetos o una dieta personalizada para un sujeto específico.

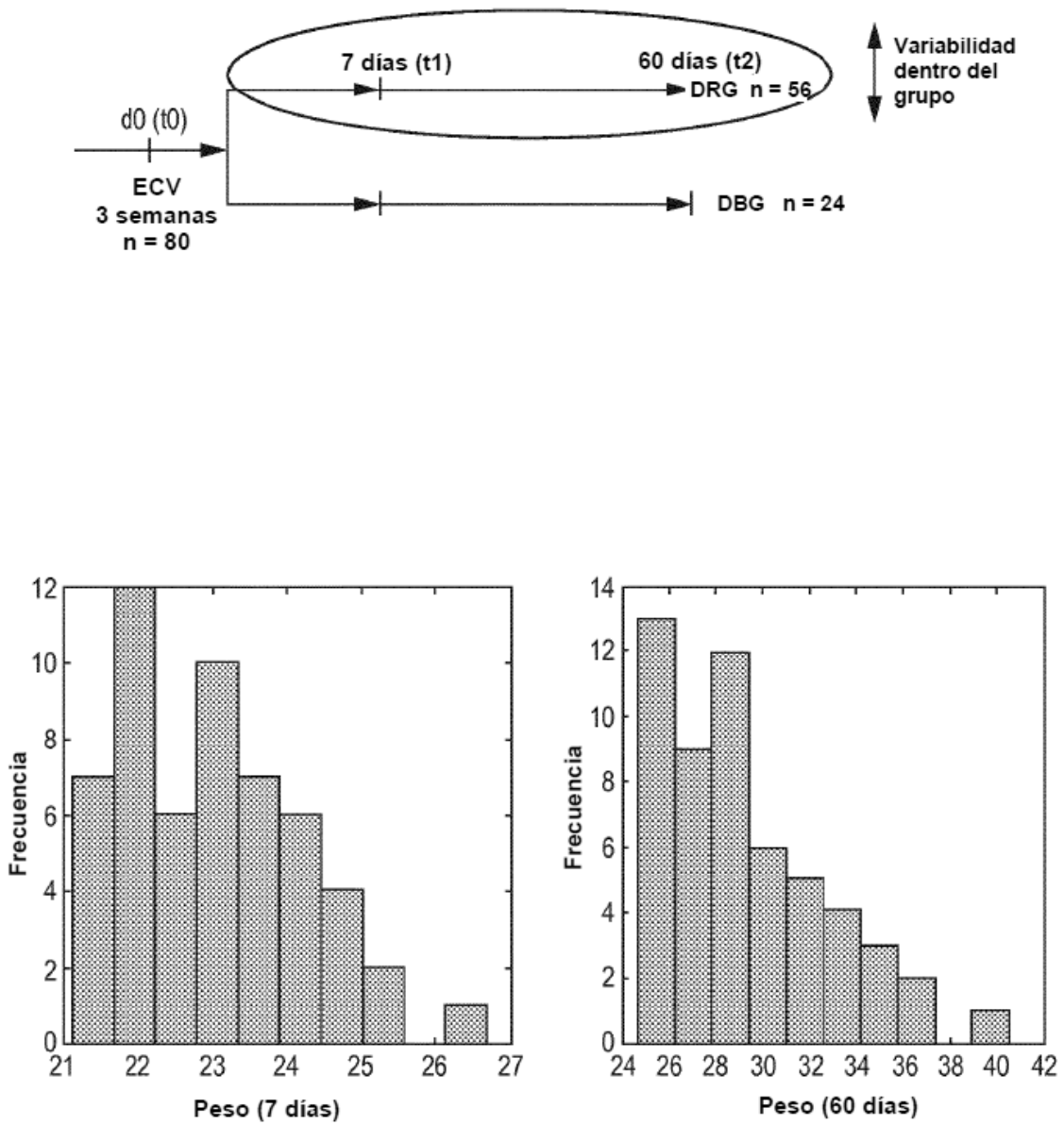


FIG. 1

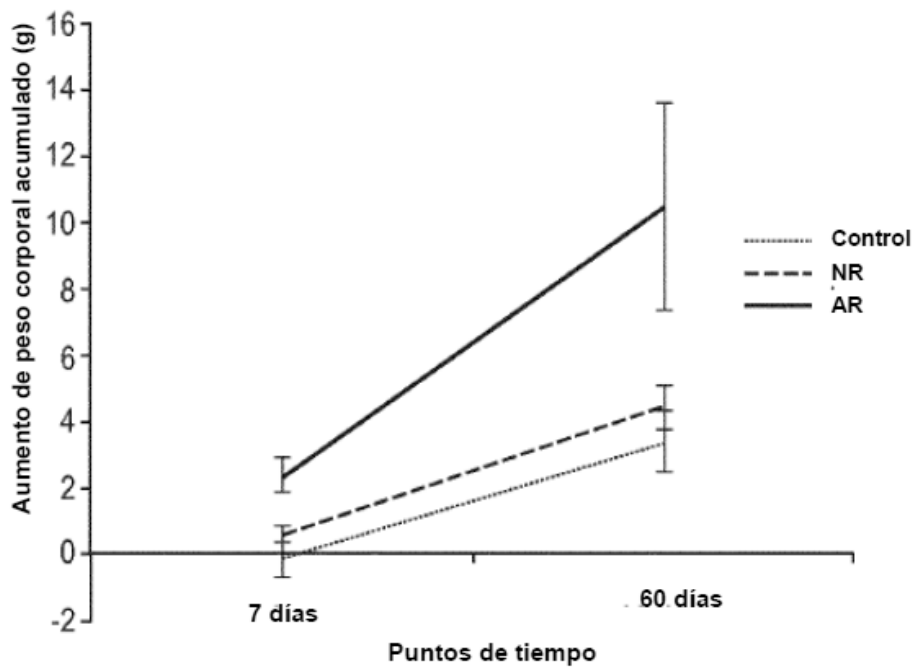
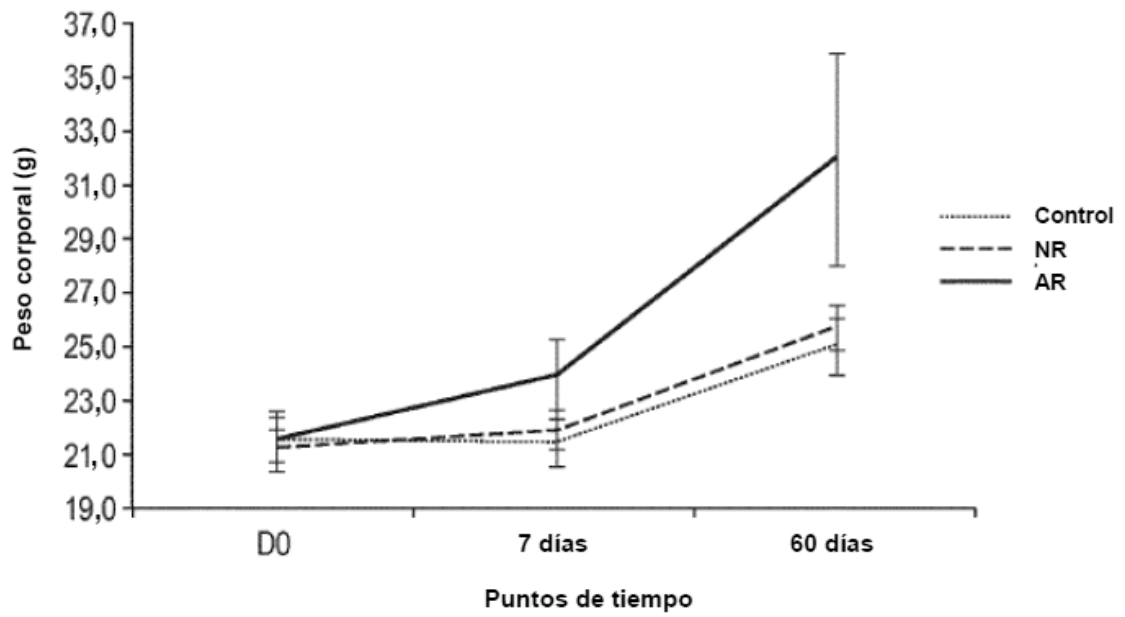


FIG. 1 continuación

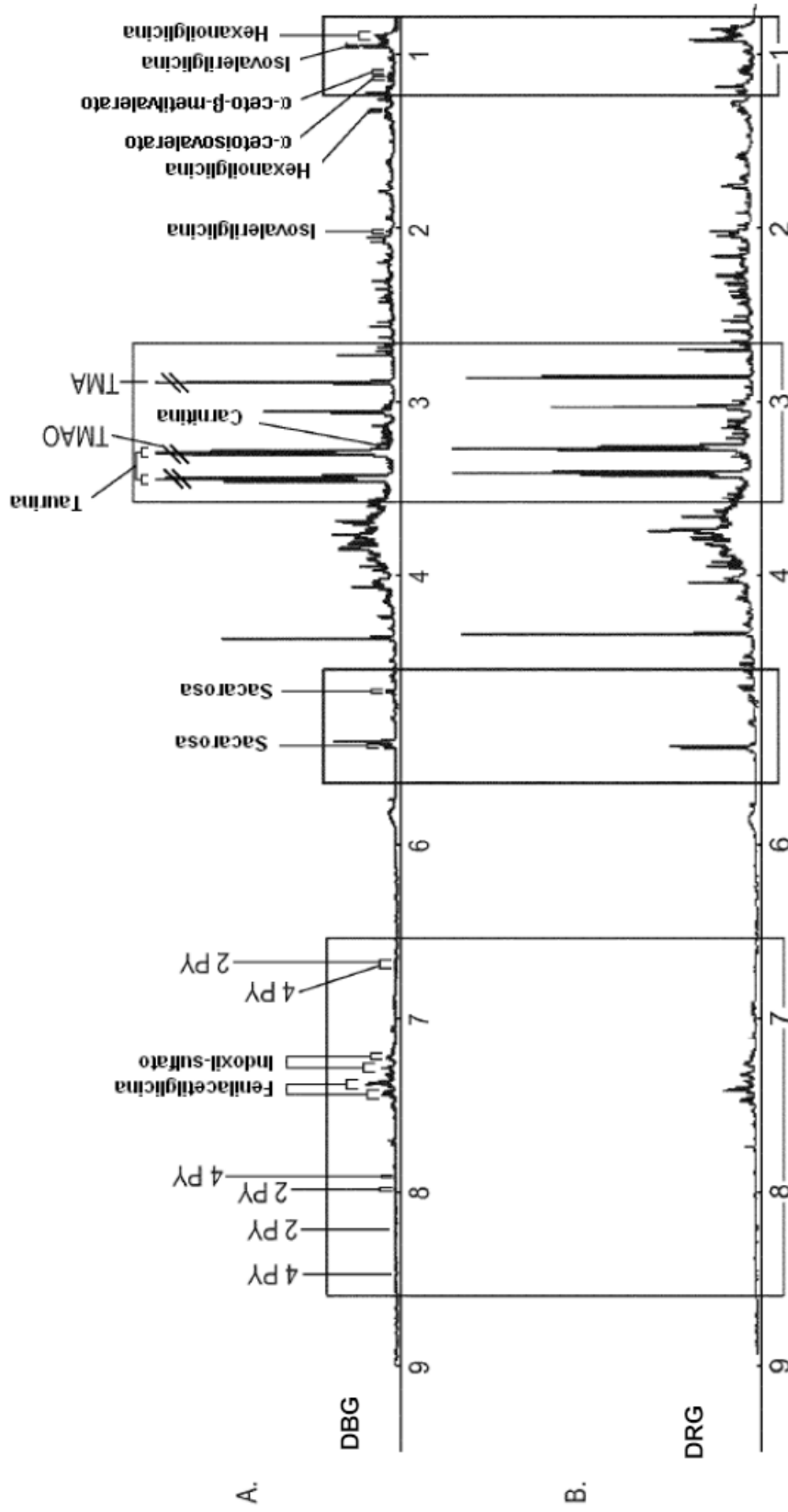


FIG. 2

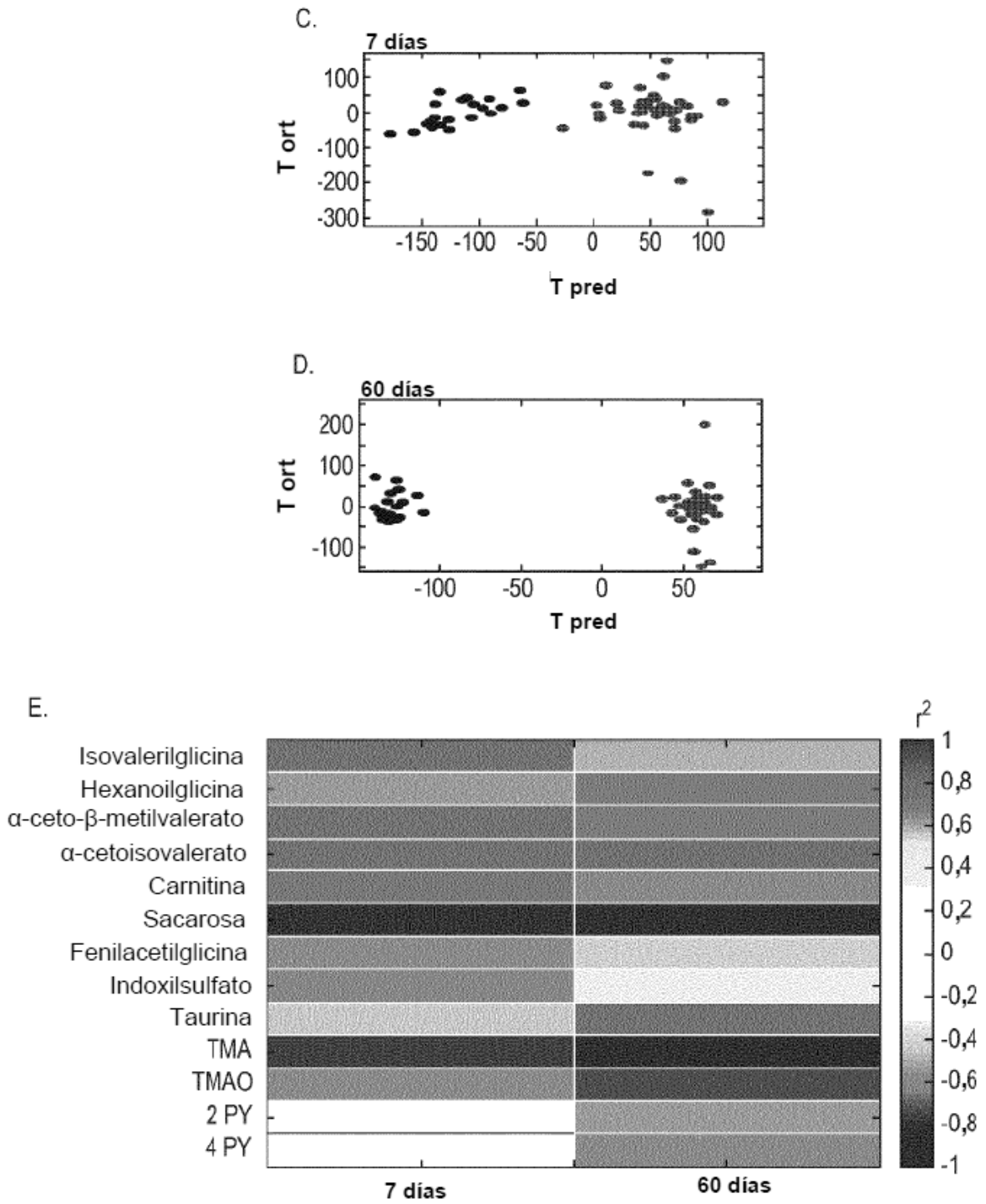


FIG. 2

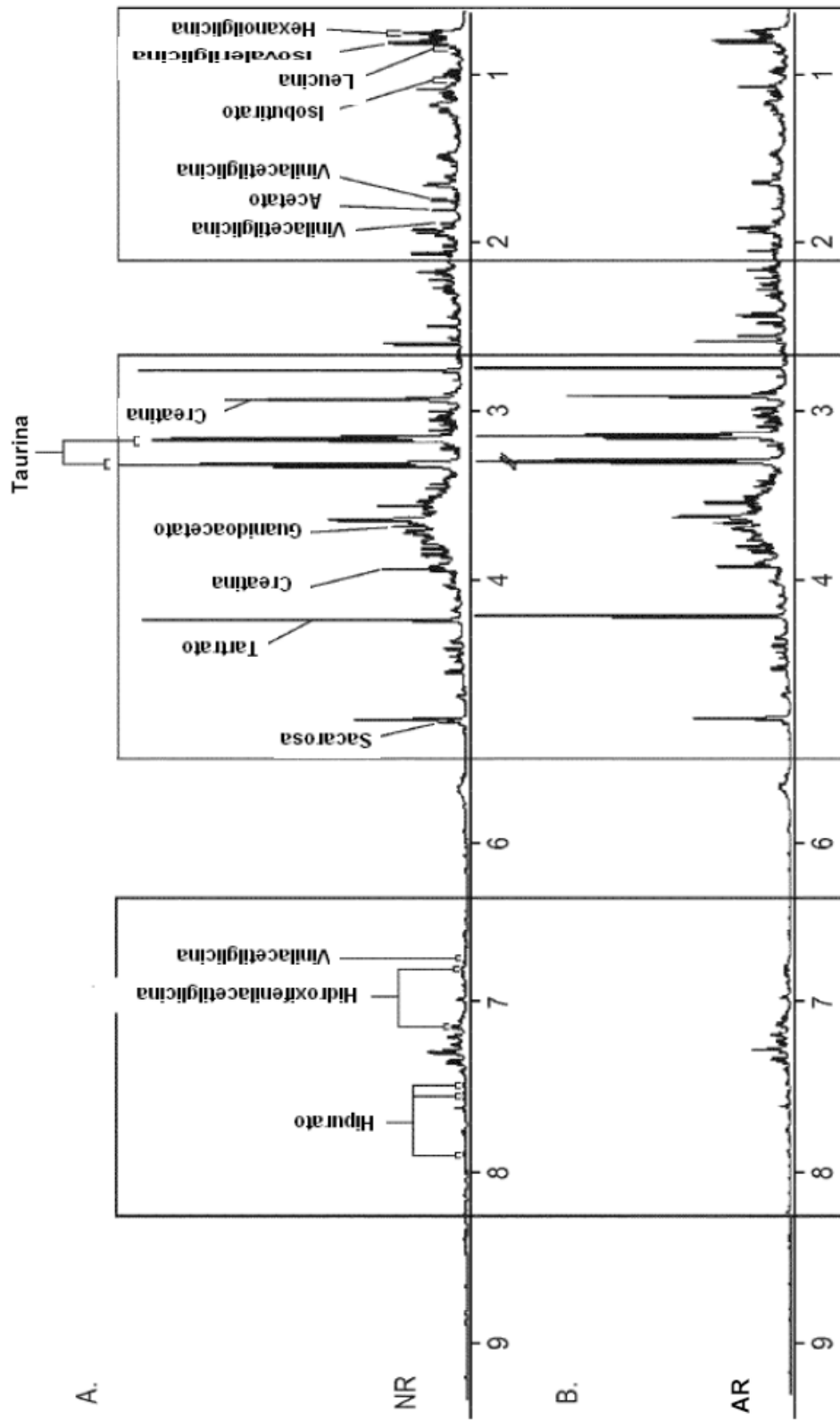


FIG. 3

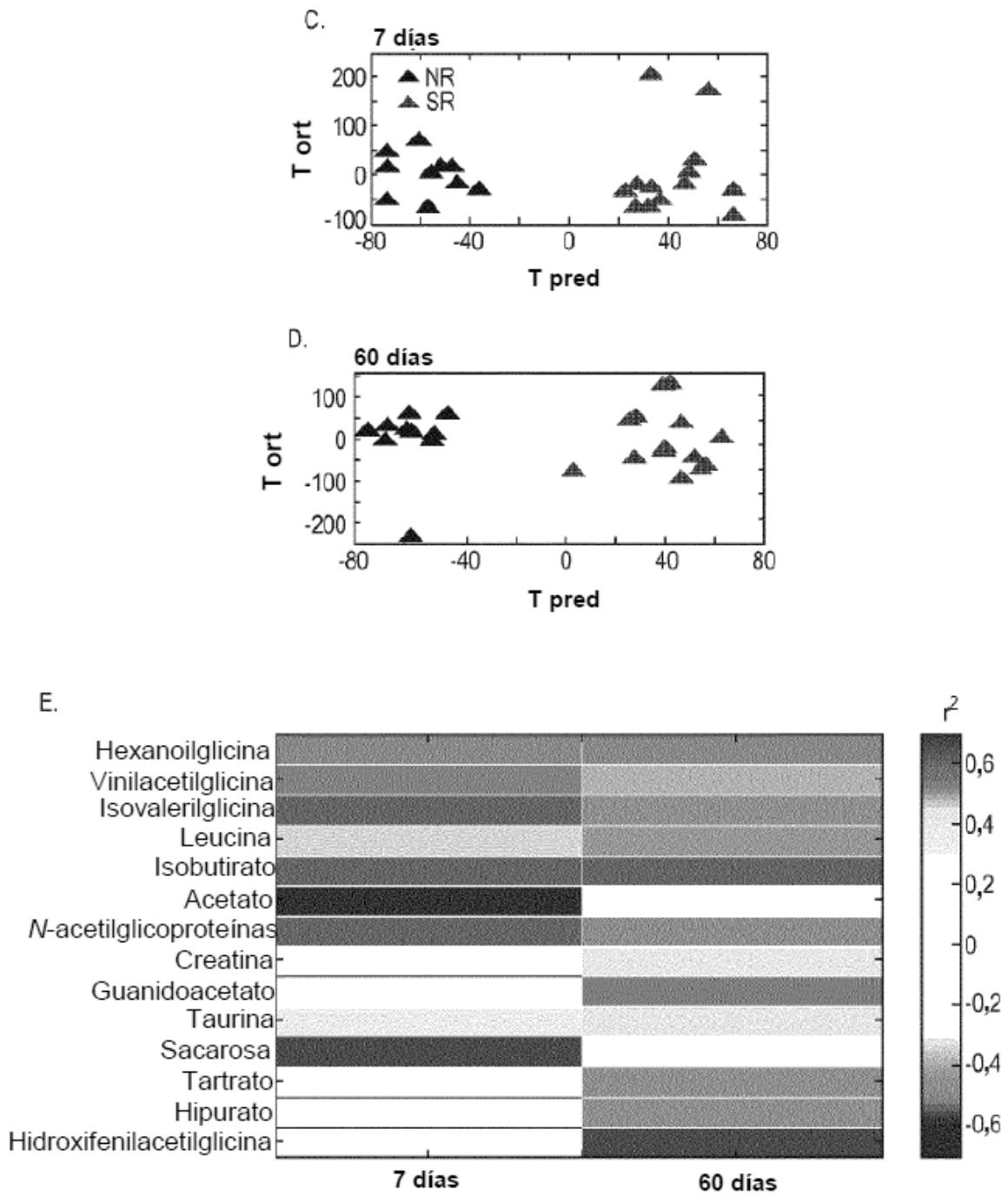


FIG. 3

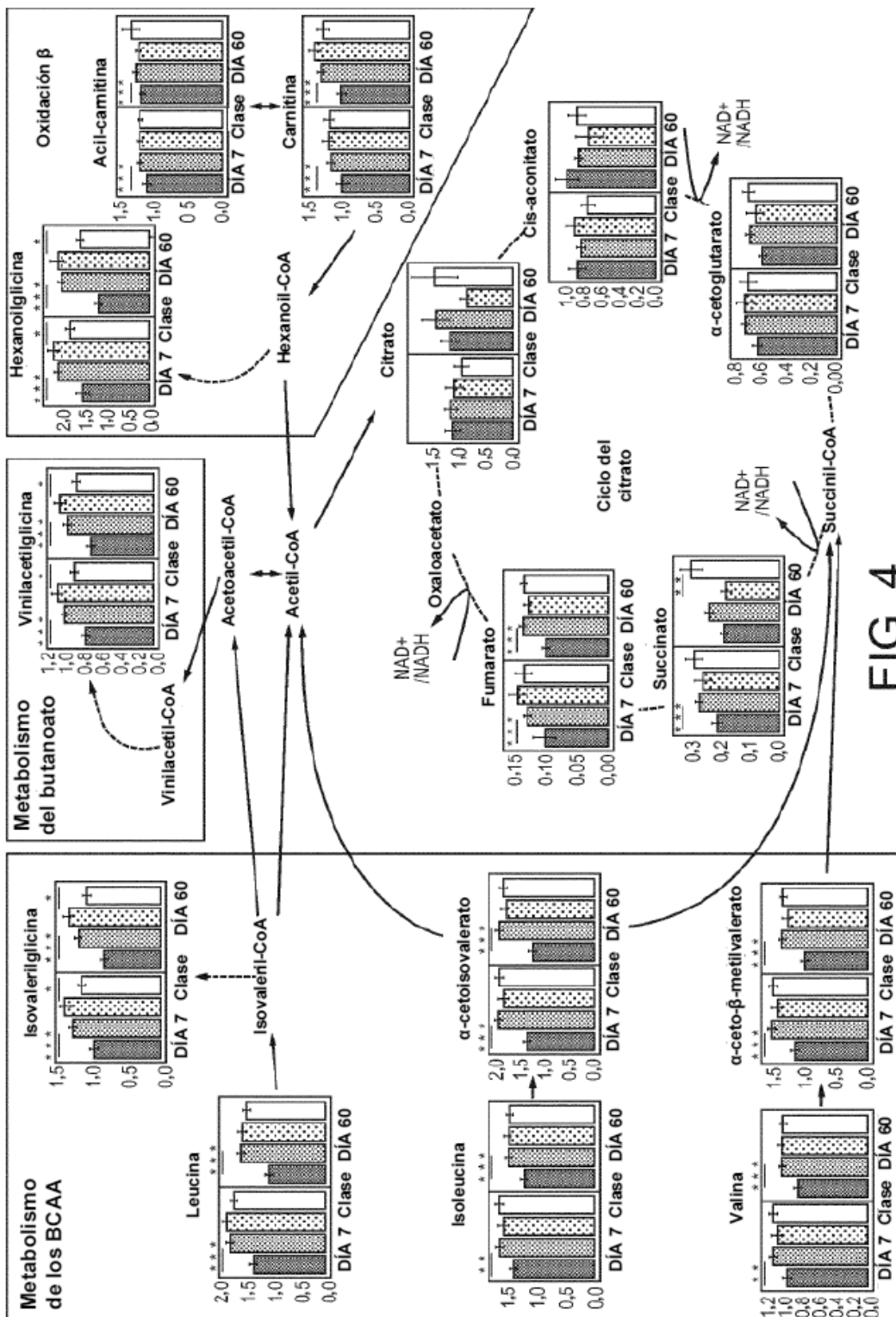


FIG. 4

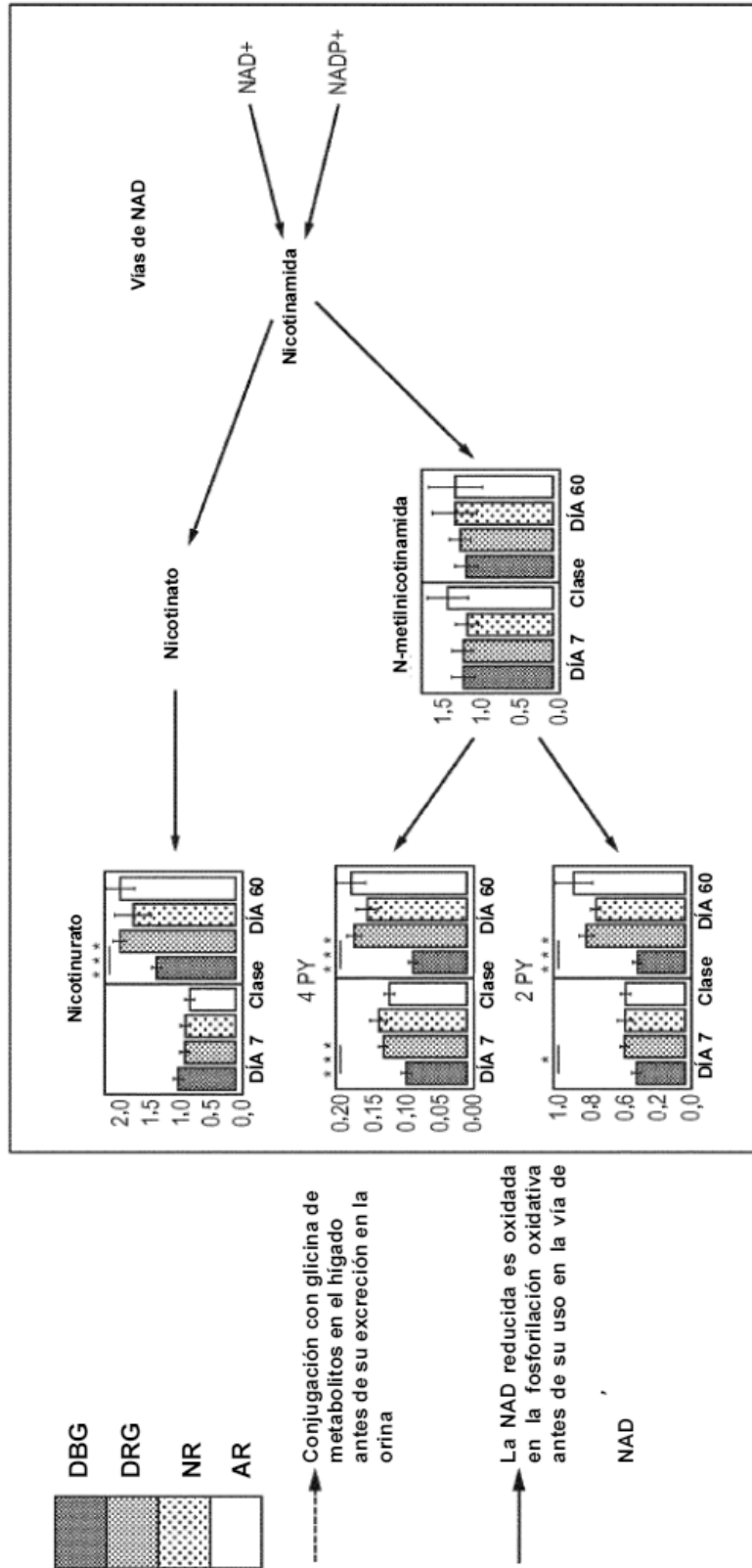


FIG. 4 Continuación

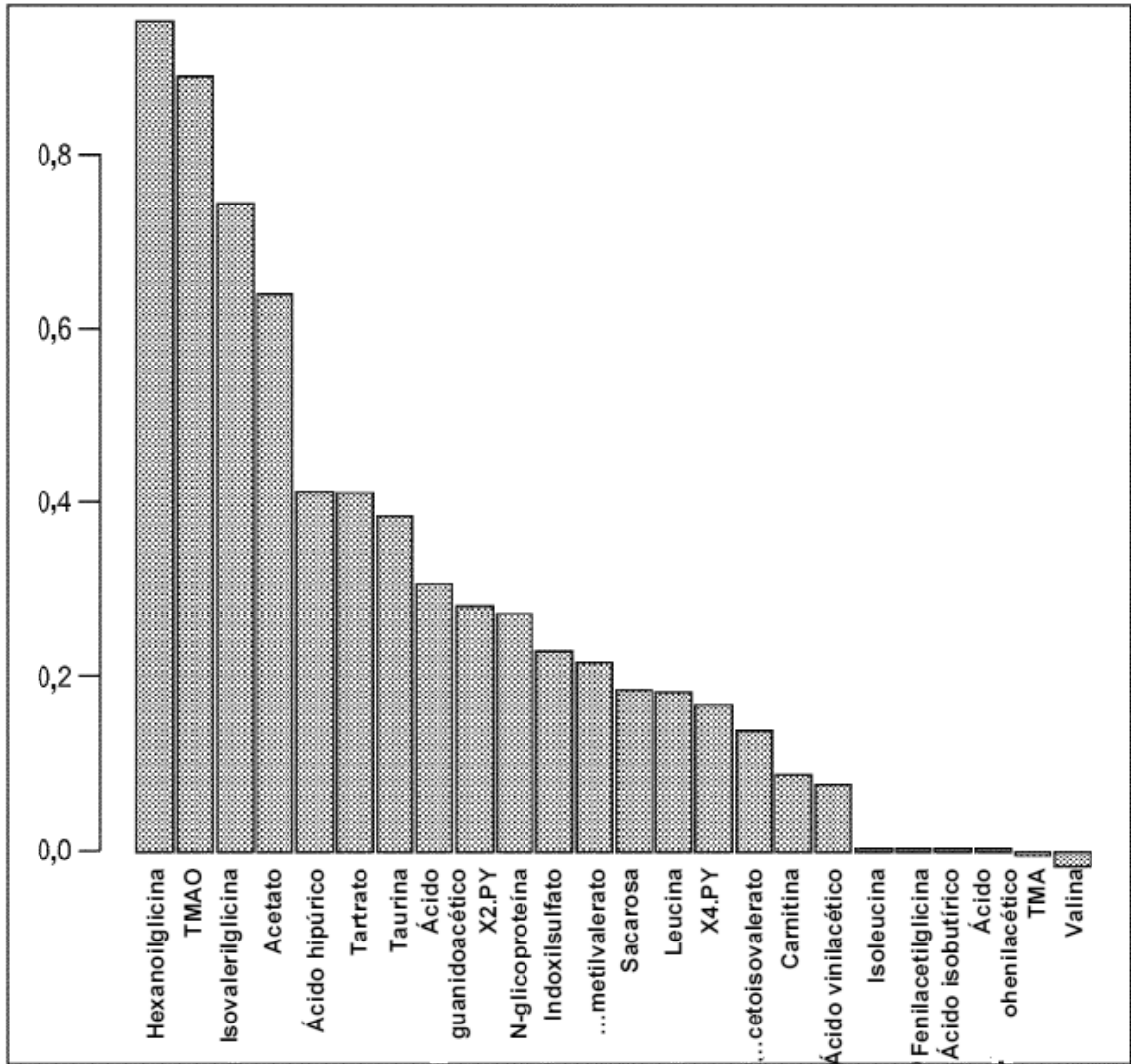


FIG. 5