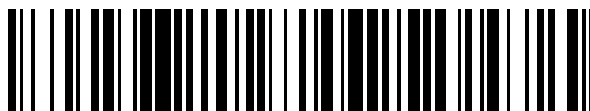


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 639 194**

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/EP2013/074570**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.06.2014 WO14086605**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.11.2013 E 13802275 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.07.2017 EP 2929355**

54 Título: **Isovalerilglicina como biomarcador de la predisposición a la ganancia de peso y a la obesidad**

30 Prioridad:

04.12.2012 EP 12195490

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

25.10.2017

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

ES 2 639 194 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

Isovalerilglicina como biomarcador de la predisposición a la ganancia de peso y a la obesidad

- 5 La presente invención se refiere en general al sector 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 permite diagnosticar la probabilidad de resistir y/o ser susceptible a una ganancia de peso inducida por la dieta. El biomarcador puede ser por ejemplo isovalerilglicina. Este biomarcador también se puede usar para diagnosticar/controlar el efecto de un cambio de estilo de vida sobre el riesgo de aumento de peso en un sujeto.
- 10 La obesidad ha llegado a ser uno de los problemas de atención sanitaria más importantes del siglo 21 a nivel global, ya que aumenta el riesgo de desarrollar otras enfermedades, incluyendo la diabetes de tipo 2, la esteatosis hepática (NAFLD), cánceres, artritis y enfermedades cardiovasculares (ECV). La etiología de la obesidad se explica por una interacción compleja entre factores genéticos y medioambientales, tales como una dieta alta en calorías, falta de actividad física y comportamiento. La microbiota intestinal, que interviene en varias funciones fisiológicas tales como la maduración del sistema inmunitario 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 a desarrollar obesidad varía en función de dichas causas multifactoriales.
- 15 La ingestión de una dieta no equilibrada rica en grasas y/o en hidratos de carbono se ha relacionado con una mayor tasa de almacenamiento de triglicéridos en los tejidos adiposos y también en tejidos magros como los hepáticos, los musculares y los cardíacos. Esta deposición de grasa ectópica inductora de lipotoxicidad también está relacionada con varios trastornos metabólicos, tales como hipertrigliceridemia, hipertensión, glucosa alta en ayunas y resistencia a la insulina (RI). Sin embargo hay algunas personas obesas o con sobrepeso que pueden padecer varios trastornos metabólicos, mientras que otras permanecen sanas. Por ejemplo, la localización del depósito de grasa en el cuerpo influye en el desarrollo de los trastornos metabólicos. La grasa epicárdica - que es eficaz para liberar adiponectinas proaterogénicas y procesar ácidos grasos - se ha relacionado positivamente con marcadores de ECV en humanos. En cambio la grasa intrahepática se ha relacionado con la inflamación y la resistencia a la insulina. Wildman y otros también han destacado que las diferencias étnico-raciales en mujeres sanas de media edad están relacionadas con una distinta actividad metabólica de los tejidos adiposos viscerales y subcutáneos, que influiría en la predisposición étnica a desarrollar obesidad y ECV. Por lo tanto es importante identificar precozmente la probabilidad de desarrollar trastornos metabólicos relacionados con la obesidad, a fin de valorar el estado metabólico del individuo y prevenir de forma efectiva el desarrollo de enfermedades metabólicas.
- 20 La ingestión de una dieta no equilibrada rica en grasas y/o en hidratos de carbono se ha relacionado con una mayor tasa de almacenamiento de triglicéridos en los tejidos adiposos y también en tejidos magros como los hepáticos, los musculares y los cardíacos. Esta deposición de grasa ectópica inductora de lipotoxicidad también está relacionada con varios trastornos metabólicos, tales como hipertrigliceridemia, hipertensión, glucosa alta en ayunas y resistencia a la insulina (RI). Sin embargo hay algunas personas obesas o con sobrepeso que pueden padecer varios trastornos metabólicos, mientras que otras permanecen sanas. Por ejemplo, la localización del depósito de grasa en el cuerpo influye en el desarrollo de los trastornos metabólicos. La grasa epicárdica - que es eficaz para liberar adiponectinas proaterogénicas y procesar ácidos grasos - se ha relacionado positivamente con marcadores de ECV en humanos. En cambio la grasa intrahepática se ha relacionado con la inflamación y la resistencia a la insulina. Wildman y otros también han destacado que las diferencias étnico-raciales en mujeres sanas de media edad están relacionadas con una distinta actividad metabólica de los tejidos adiposos viscerales y subcutáneos, que influiría en la predisposición étnica a desarrollar obesidad y ECV. Por lo tanto es importante identificar precozmente la probabilidad de desarrollar trastornos metabólicos relacionados con la obesidad, a fin de valorar el estado metabólico del individuo y prevenir de forma efectiva el desarrollo de enfermedades metabólicas.
- 25 Newgard y otros, en Cell Metabolism, 9, 311-326, 2009, han identificado unos aminoácidos de cadena ramificada (AACR) como un tipo de marcador para la diferenciación entre individuos obesos y esbeltos, relacionando un mayor valor de AACR, en particular de valina y leucina/isoleucina, en individuos obesos con la resistencia a la insulina.
- 30 Por lo tanto sería deseable aportar al estado técnico un método que permitiera identificar precozmente – de manera ideal antes de ganar peso – sujetos proclives a engordar por el consumo de dietas ricas en grasas.
- 35 En esta descripción, cualquier referencia a documentos del estado técnico previo no debe ser considerada como una aceptación de que dicho estado técnico previo sea ampliamente conocido o forme parte del conocimiento general en el sector.
- 40 La presente invención tiene por objeto mejorar el estado técnico y en particular proporcionar un método que permita distinguir precoz y efectivamente si las personas son proclives a responder con un aumento de peso a una dieta rica en grasas.
- 45 Tal como se usan en esta descripción, los términos “comprende”, “incluyendo” y análogos no deben interpretarse en sentido exclusivo o exhaustivo. En otras palabras, tienen el significado de “incluyendo, pero sin limitarse a”.
- 50 Los presentes inventores han empleado un método metabonómico para lograr el objetivo de la presente invención. Hoy en día la metabonómica se considera un sistema bien establecido para la identificación del fenotipo metabólico, que incluye la influencia de varios 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 genética y de los datos proteómicos, que indican el potencial de cambios fisiológicos, los metabolitos y su concentración dinámica cambian dentro de las células, de los tejidos y de los órganos, y representan realmente los puntos finales de los procesos fisiológicos de regulación.
- 55 Por tanto, un método apropiado es la investigación de los cambios metabólicos graduales relacionados con diversas intervenciones dietéticas y con el desarrollo de enfermedades. Los últimos hallazgos metabolómicos y lipodómicos han ido acelerando nuestra comprensión de los procesos patológicos y ofrecerán nuevas vías para la prevención y el control nutricional de los trastornos subclínicos relacionados con el síndrome metabólico. En particular, los datos “ómicos” han resaltado la contribución del metabolismo energético (ciclo de Krebs), del procesamiento de los lípidos y aminoácidos, así como de las señales inflamatorias, al inicio de la obesidad y de la resistencia a la insulina (RI).
- 60
- 65

Mediante una combinación de espectroscopia de resonancia magnética nuclear protónica (RMN-H¹) de muestras de orina recogidas a lo largo del tiempo y un control del incremento de peso, los presentes inventores han identificado nuevos biomarcadores metabólicos del incremento gradual de peso inducido por una dieta rica en grasas, utilizando un modelo murino C57BL/6 bien definido. Este modelo animal es bien conocido por mostrar fenotipos extremos de animales isogénicos, es decir, de animales resistentes o proclives a una distribución de la ganancia de peso inducida por una dieta rica en grasas. Los presentes inventores han caracterizado la adaptación metabólica a corto (7 días) y largo plazo (60 días) de ratones C57BL/6 alimentados con una dieta rica en grasas (DRG) y han establecido los marcadores metabólicos específicos asociados a la variabilidad fenotípica en los ratones alimentados con DRG, es decir, animales resistentes o propensos a una ganancia de peso inducida por una dieta rica en grasas. Mediante el uso de un método metabonómico los presentes inventores han demostrado que las vías metabólicas mitocondriales (oxidación β de ácidos grasos, catabolismo de aminoácidos de cadena ramificada, metabolismo de butanoato, vía de nicotinamida adenina dinucleótido y ciclo de Krebs) son reguladas rápidamente al alta por una alimentación rica en grasas, lo cual reflejaría una saturación de las mitocondrias con ácidos grasos y un empeoramiento del metabolismo energético.

Los presentes inventores pudieron demostrar que la resistencia a la obesidad de los ratones sometidos a una DRG está relacionada con una activación específica de las vías oxidativas mitocondriales (oxidación β, metabolismo de butanoato y catabolismo de leucina), lo cual sería un mecanismo protector contra la sobrecarga de ácidos grasos.

Estos resultados resaltan el papel de las mitocondrias en el desarrollo de la obesidad y permiten concluir que la posibilidad de sufrir trastornos metabólicos como la obesidad se puede determinar a partir de una marca metabólica temprana, usando una serie de biomarcadores identificados por los presentes inventores.

Los presentes inventores pudieron demostrar que la respuesta metabólica urinaria tras una semana de alimentación rica en grasas (día 7) no solo permite predecir la ganancia final de peso de cada individuo (día 60), sino también clasificar los animales según su predisposición a ser resistentes o propensos a una ganancia de peso inducida por una dieta rica en grasas.

En consecuencia la presente invención se refiere a un nuevo biomarcador, la isovalerilglicina.

La presente invención se refiere además al uso de isovalerilglicina como biomarcador en la orina, para detectar y/o cuantificar la probabilidad de resistir la ganancia de peso inducida por una dieta rica en grasas.

Análogamente la presente invención también se refiere al uso de isovalerilglicina como biomarcador en la orina, para detectar y/o cuantificar la probabilidad de ser susceptible a una ganancia de peso inducida por una dieta elevada en grasas.

La presente invención se refiere asimismo a un método para diagnosticar en un sujeto la probabilidad de resistir la ganancia de peso inducida por una dieta rica en grasas, que consiste en determinar el nivel de isovalerilglicina en una muestra de orina obtenida previamente de un sujeto examinado y comparar el nivel de isovalerilglicina del sujeto con un valor de referencia predeterminado que está basado en un nivel medio de isovalerilglicina en la orina de una población de control, de manera que un mayor nivel de isovalerilglicina en la muestra respecto al valor de referencia predeterminado indica una mayor probabilidad de resistir la ganancia de peso inducida por una dieta rica en grasas.

Análogamente, la presente invención también se refiere a un método para diagnosticar en un sujeto la probabilidad de ser susceptible a una ganancia de peso inducida por una dieta rica en grasas, que consiste en determinar el nivel de isovalerilglicina en una muestra de orina obtenida previamente de un sujeto examinado y comparar el nivel de isovalerilglicina del sujeto con un valor de referencia predeterminado, basado en un nivel medio de isovalerilglicina en la orina de una población de control, de manera que un menor nivel de isovalerilglicina o la ausencia de cambio en la muestra respecto al valor de referencia predeterminado indica una mayor probabilidad de ser susceptible a una ganancia de peso inducida por una dieta rica en grasas.

Este biomarcador de la presente invención también se puede emplear para diagnosticar y/o controlar el efecto de un cambio de estilo de vida en el riesgo de un sujeto a ganar peso. Para ello, el nivel del biomarcador se puede evaluar antes del cambio de estilo de vida y el resultado se puede comparar con el nivel de dicho biomarcador tras el cambio de estilo de vida.

Figura 1: variabilidad de la ganancia de peso corporal en una población de n = 56 ratones alimentados con DRG. (A) Diseño experimental. (B) Distribución del peso corporal de los ratones tras 7 y 60 días de alimentación con DRG. (C) Identificación de ratones no respondedores (NR) y fuertemente respondedores (FR) a la obesidad con el tiempo. Se observan varios ratones NR y FR en 2 intervalos de tiempo o a lo largo de todo el ensayo. (D) Observación del peso de ratones de control (n = 24), ratones NR (n = 30) y ratones FR (n = 29) antes de la dieta (t0), después de 7 días (t1) y después de 60 días (t2) de alimentación con DRG. s(n = promedio ± error estándar, valor p para la prueba no paramétrica de Mann y Whitney * < 0,05, ** < 0,001, *** < 0,0001.)

Figura 2: perfil metabólico urinario por RMN-H¹ de ratones C57BL/6 alimentados con DRG o DPG a los 7 y 60 días del cambio de dieta. (A) Espectro medio RMN-H¹ de la orina de ratones alimentados con DPG o (B) con DRG. (C) Gráfico score plot de un análisis OPLS-DA del perfil metabólico urinario de ratones alimentados con DRG y DPG a los 7 días. (D) Gráfico score plot de un análisis OPLS-DA del perfil metabólico urinario de ratones alimentados con DRG y DPG a los 60 días. (E) El mapa de calor obtenido a partir de las representaciones gráficas de los coeficientes del OPLS-DA evidenció el hallazgo de metabolitos significativamente diferentes en los ratones alimentados con DRG y DPG. Los valores de correlación de los metabolitos se presentan mediante un código de colores. (Gradiente de colores rojos para los metabolitos correlacionados positivamente con los ratones alimentados con DRG y gradiente de colores azules para los metabolitos correlacionados negativamente).

Figura 3: marca metabólica específica de los ratones NR y FR. (A) Promedio de los espectros RMN-H¹ de la orina de los ratones NR o (B) FR. (C) Gráfico score plot de un análisis OPLS-DA del perfil metabólico urinario de los ratones NR y FR a los 7 días y (D) a los 60 días. (E) El mapa de calor obtenido a partir de las representaciones gráficas de los coeficientes del OPLS-DA evidenció el hallazgo de metabolitos significativamente diferentes en los ratones NR y FR. Los valores de correlación de los metabolitos se presentan mediante un código de colores. (Gradiente de colores rojos para los metabolitos correlacionados positivamente con los ratones FR y gradiente de colores azules para los metabolitos correlacionados negativamente).

Figura 4: mapeo del patrón de excreción urinaria de los metabolitos implicados en el metabolismo de los AACR, del butanoato, de la nicotinamida y de la adenina dinucleótido, en el ciclo de Krebs y en la oxidación β . Los gráficos de barras mostraron la relación media con error estándar de las integrales de los metabolitos al día 7 respecto al día 0 o al día 60 respecto al día 0. El eje Y indica el valor de la media para los ratones PG, RG, NR y FR (unidad arbitraria). La diferencia significativa entre las relaciones medias de PG y RG o de NR y FR se calcularon mediante la prueba no paramétrica de Mann Whitney: * < 0,05, ** < 0,001, *** < 0,0001 (valores de la media, errores estándar y valor p en las tablas suplementarias 3 y 4). Las reacciones metabólicas indirectas están marcadas con flechas de trazos.

La figura 5 muestra la importancia y robustez de los metabolitos en la predicción de los NR y FR valorada por medio de un análisis de bosques aleatorios.

La presente invención se refiere en parte a un biomarcador, que es la isovalerilglicina.

En los ensayos aquí descritos los ratones alimentados con una DRG mostraron un incremento de isovalerilglicina en la orina a lo largo del tiempo. Sin pretender limitarse a la teoría, los presentes inventores creen realmente que el incremento en la orina de los ratones alimentados con DRG de varios productos intermedios del ciclo de Krebs y de productos finales de las vías de nicotinamida adenina dinucleótido se puede considerar como una evidencia de la sobreproducción de energía en las mitocondrias. Se considera que el aumento crónico de las vías oxidativas mitocondriales es dañino para las mitocondrias, porque empeora dichas vías y el metabolismo energético. Además el exceso de ácidos grasos se puede almacenar como triglicéridos en los tejidos adiposos y también en los tejidos magros, causando disfunciones orgánicas y trastornos metabólicos tales como esteatosis hepática o enfermedades cardiovasculares.

Los presentes inventores han encontrado que la isovalerilglicina se puede utilizar como biomarcador en un fluido corporal para detectar y/o cuantificar la probabilidad de resistir la ganancia de peso inducida por una dieta rica en grasas. El fluido corporal puede ser orina. El empleo de orina como fluido corporal es ventajoso porque se puede obtener con regularidad, de manera no invasiva y sin la ayuda de personal médico.

Este método diagnóstico se realiza fuera del cuerpo humano o animal. En la práctica, la etapa de detección y/o cuantificación del biomarcador se efectúa en una muestra de fluido corporal obtenida previamente del sujeto que debe analizarse.

Aunque la presente invención está descrita con el objetivo de cuantificar la probabilidad de resistir la ganancia de peso inducida por una dieta rica en grasas, para los expertos en la materia es evidente que el mismo método puede emplearse igualmente para cuantificar la probabilidad de ser susceptible a una ganancia de peso inducida por una dieta rica en grasas. Los expertos en la materia comprenden que si un mayor nivel de un biomarcador es indicativo de una mayor probabilidad de resistir la ganancia de peso inducida por una dieta rica en grasas, un menor nivel de un biomarcador es indicativo de una mayor probabilidad de ser susceptible a una ganancia de peso inducida por una dieta rica en grasas, y viceversa.

Por consiguiente la presente invención también se refiere al uso de isovalerilglicina como biomarcador en la orina para detectar y/o cuantificar la probabilidad de ser susceptible a una ganancia de peso inducida por una dieta rica en grasas.

La presente invención también se refiere a un método para diagnosticar la probabilidad de un sujeto de resistir la ganancia de peso inducida por una dieta rica en grasas, que consiste en determinar el nivel de isovalerilglicina en una muestra de orina obtenida previamente del sujeto que debe analizarse y en comparar el nivel de isovalerilglicina del sujeto con un valor de referencia prefijado, el cual está basado en un nivel promedio de isovalerilglicina en la

orina de una población de control, de modo que un mayor nivel de isovalerilglicina en la muestra respecto al valor de referencia prefijado indica una mayor probabilidad de resistir la ganancia de peso inducida por una dieta rica en grasas.

5 La presente invención se refiere asimismo a un método para diagnosticar la probabilidad de un sujeto de ser susceptible a una ganancia de peso inducida por una dieta rica en grasas, que consiste en determinar el nivel de isovalerilglicina en una muestra de orina obtenida previamente del sujeto que debe analizarse y en comparar el nivel de isovalerilglicina del sujeto con un valor de referencia prefijado, el cual está basado en un nivel promedio de isovalerilglicina en la orina de una población de control, de manera que un menor nivel de isovalerilglicina en la muestra respecto al valor de referencia prefijado indica una mayor probabilidad de ser susceptible a una ganancia de peso inducida por una dieta rica en grasas.

15 El empleo de orina como muestra es ventajoso porque se puede obtener de manera no invasiva, siguiendo un procedimiento bien establecido. Luego el verdadero método diagnóstico se realiza fuera del cuerpo.

El nivel de isovalerilglicina en la muestra se puede detectar y cuantificar por cualquier método conocido del estado técnico. Se puede usar, por ejemplo, RMN-H¹, espectroscopía de masas, p.ej. UPLC-ESI-MS/MS. También pueden utilizarse otros métodos espectroscópicos y cromatográficos, técnicas de marcaje o métodos químicos cuantitativos. Idealmente el nivel de isovalerilglicina en la muestra y el valor de referencia se determinan por el mismo método.

20 El valor de referencia prefijado puede estar basado en un nivel medio de isovalerilglicina en el fluido corporal de una población de control. La población de control puede ser un grupo de al menos 3, preferiblemente de al menos 10, con mayor preferencia de al menos 50 personas de similar contexto genético, edad y nivel medio de salud.

25 La presente invención permite, por ejemplo, clasificar tempranamente los sujetos antes de que engorden y puedan poner su salud en peligro. Sabiendo si es susceptible de engordar por efecto de una dieta rica en grasas, uno puede ajustar en consecuencia su estilo de vida y su dieta a tiempo. Un estilo de vida idóneo, acompañado idealmente de un régimen nutricional personalizado, permite mantener una constitución saludable y evita tener que hacer grandes esfuerzos de limitación de calorías y/o regímenes de ejercicio para recuperarla.

30 A pesar de que la isovalerilglicina como biomarcador único es una herramienta efectiva para el método diagnóstico de la presente invención, la calidad y/o el poder predictivo de dicho diagnóstico es mejor si está basado en más de un solo biomarcador.

35 Por tanto se puede usar uno o más marcadores adicionales, en combinación con isovalerilglicina, para diagnosticar una mayor probabilidad de resistir la ganancia de peso inducida por una dieta rica en grasas y/o para diagnosticar una mayor probabilidad de ser susceptible a una ganancia de peso inducida por una dieta rica en grasas.

40 Los presentes inventores se sorprendieron al ver que también se podían usar otros biomarcadores para detectar una mayor probabilidad de resistir la ganancia de peso inducida por una dieta rica en grasas y/o para diagnosticar una mayor probabilidad de ser susceptible a una ganancia de peso inducida por una dieta rica en grasas.

45 Así, los presentes inventores han comprobado que unas mayores concentraciones en la orina de hexanoílglicina, leucina, isobutirato, acetato y unas menores concentraciones en la orina de trimetilamina-N-óxido, guanidoacetato, sacarosa, ácido tartárico, ácido hipúrico e hidroxifenilacetilglicina permiten diagnosticar una mayor probabilidad de resistir la ganancia de peso inducida por una dieta rica en grasas.

50 Por tanto, los métodos de la presente invención pueden comprender además las etapas de determinar el nivel en la muestra de orina de al menos otro biomarcador elegido del grupo formado por hexanoílglicina, trimetilamina-N-óxido, leucina, isobutirato, acetato, guanidoacetato, sacarosa, ácido tartárico, ácido hipúrico e hidroxifenilacetilglicina y comparar el nivel en el sujeto de al menos otro biomarcador con un valor de referencia prefijado que está basado en niveles medios de al menos otro biomarcador en una muestra de orina de una población de control sana normal, de modo que un mayor nivel de hexanoílglicina, leucina, isobutirato, acetato y un menor nivel de trimetilamina-N-óxido, guanidoacetato, sacarosa, ácido tartárico, ácido hipúrico y/o hidroxifenilacetilglicina en la muestra de orina respecto a los valores de referencia prefijados indica una mayor probabilidad de resistir la ganancia de peso inducida por una dieta rica en grasas. Por lo tanto un menor nivel de hexanoílglicina, leucina, isobutirato, acetato y un mayor nivel de trimetilamina-N-óxido, guanidoacetato, sacarosa, ácido tartárico, ácido hipúrico y/o hidroxifenilacetilglicina en la muestra de orina respecto a los valores de referencia prefijados indica una mayor probabilidad de ser susceptible a una ganancia de peso inducida por una dieta rica en grasas.

60 Los otros biomarcadores también se pueden detectar y cuantificar por RMN-H¹ o espectroscopía de masas, p.ej. UPLC-ESI-MS/MS. También pueden usarse otros métodos espectroscópicos y cromatográficos, técnicas de marcaje o métodos químicos cuantitativos.

65 Todos los biomarcadores evaluados se determinan idealmente mediante la misma tecnología y se pueden medir simultáneamente.

Por ejemplo, la isovalerilglicina se puede determinar junto con la trimetilamina-N-óxido.

La isovalerilglicina también se puede determinar junto con la hexanoilglicina.

La isovalerilglicina también se puede determinar junto con la leucina.

La isovalerilglicina también se puede determinar junto con el acetato.

5 La isovalerilglicina también se puede determinar junto con la trimetilamina-N-óxido y la hexanoilglicina.

La isovalerilglicina también se puede determinar junto con la trimetilamina-N-óxido, la hexanoilglicina y la leucina.

La isovalerilglicina también se puede determinar junto con la trimetilamina-N-óxido, la hexanoilglicina y el acetato.

La isovalerilglicina también se puede determinar junto con la trimetilamina-N-óxido, la hexanoilglicina, el acetato y la leucina.

10 La isovalerilglicina también se puede determinar junto con la trimetilamina-N-óxido, la hexanoilglicina, el acetato, la leucina y el guanidoacetato.

La isovalerilglicina también se puede determinar junto con la trimetilamina-N-óxido, la hexanoilglicina, el acetato, la leucina, el guanidoacetato y el ácido hipúrico.

15 La ventaja de evaluar más de un biomarcador es que cuantos más biomarcadores se determinen, más fiable será el diagnóstico. Si p.ej. hay más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, o 7 biomarcadores cuya concentración aumenta o disminuye según lo descrito anteriormente, el poder predictivo de la detección y/o cuantificación de la probabilidad de resistir y/o ser susceptible a la ganancia de peso inducida por una dieta rica en grasas es mayor.

20 El valor de referencia para la isovalerilglicina y opcionalmente para los otros biomarcadores se mide preferiblemente con las mismas unidades usadas para indicar el nivel de isovalerilglicina y opcionalmente de los otros biomarcadores que se obtiene del sujeto examinado. Por consiguiente, si el nivel de isovalerilglicina y opcionalmente de los otros biomarcadores es un valor absoluto como las unidades de isovalerilglicina en $\mu\text{mol/l}$ (μM), el valor de referencia está también basado en las unidades de isovalerilglicina en $\mu\text{mol/l}$ (μM) de los individuos de la población general o de una población de sujetos escogidos de control.

El valor de referencia puede ser asimismo un valor límite único, tal como una mediana o un promedio. Los valores de referencia de la isovalerilglicina y opcionalmente de los otros biomarcadores en las muestras obtenidas de fluido corporal, tales como niveles medios, medianas o niveles límite, se pueden precisar ensayando una amplia muestra de individuos de la población general o de una población escogida y usando un modelo estadístico como el método del valor predictivo para seleccionar un criterio de positividad o una curva característica de receptor-operador que defina la especificidad (mayor proporción de negativos verdaderos) y la sensibilidad (mayor proporción de positivos verdaderos) óptimas, tal como está descrito en Knapp, R. G., y Miller, M. C. (1992). *Clinical Epidemiology and Biostatistics*. William y Wilkins, Harual Publishing Co. Malvern, Pa. Los expertos en la materia sabrán cómo asignar los valores de referencia correctos, ya que éstos pueden variar en función del género, de la raza, de la herencia genética, del estado de salud y de la edad, por ejemplo.

En el método de la presente invención una menor probabilidad de resistir la ganancia de peso inducida por una dieta rica en grasas indica la posibilidad de desarrollar trastornos relacionados con el sobrepeso y/o la obesidad.

40 Para un adulto humano "sobrepeso" se define por tener un IMC entre 25 y 30. El "índice de masa corporal" o "IMC" mide el cociente entre el peso en kg y la altura en metros cuadrados. La "obesidad" es un estado en que la reserva natural de energía almacenada en el tejido adiposo de los animales, en particular de los humanos y otros mamíferos, aumenta hasta un punto relacionado con ciertos problemas de salud o con una mayor mortalidad. Para un adulto humano "obeso" corresponde a un IMC superior a 30.

Los trastornos relacionados con el sobrepeso y/o la obesidad pueden ser enfermedades cardiometabólicas y/o desregulaciones metabólicas.

50 El método de la presente invención permite, por ejemplo, determinar el grado de susceptibilidad de los sujetos a la ganancia de peso inducida por la dieta. Por lo tanto el método permitiría discriminar pacientes según su probabilidad de engordar con una dieta muy calórica, en particular rica en grasas, independientemente de si en el presente tienen un peso inferior al idóneo, un peso normal, sobrepeso o son obesos. Se considera que las personas adultas tienen un peso menor que el normal si su IMC es igual o inferior a 18,5.

55 El método de la presente invención también se puede poner en práctica con sujetos de peso inferior al idóneo, peso normal, sobrepeso u obesos. En concreto, para los sujetos de peso inferior al idóneo, sobrepeso u obesos el método de la presente invención puede ayudar a dilucidar su predisposición genética. Basándose en ello – e idealmente teniendo además en cuenta su estado de salud y su estilo de vida – se pueden diseñar unos regímenes nutricionales personalizados que ayuden a mantener o recuperar el estado de salud.

60 El método de la presente invención no está limitado a humanos. También se puede utilizar por ejemplo en animales como los de compañía. Se pueden analizar animales de compañía como gatos o perros y sobre esta base pueden diseñarse unos regímenes nutricionales que contribuyan a prolongar su vida en buen estado de salud.

65

El estudio presentado en esta solicitud de patente proporciona conocimientos acerca de los mecanismos fisiológicos relacionados con el desarrollo de la obesidad inducida por RG (elevado nivel de grasas) y destaca en particular las adaptaciones metabólicas específicas asociadas a la variabilidad del fenotipo obeso. La elevada ingestión de grasa provoca una sobreregulación rápida y consistente de las vías metabólicas mitocondriales y como resultado aumenta la producción de energía y la saturación mitocondrial por ácidos grasos. Entre los ratones alimentados con RG se identificaron unos ratones resistentes a la obesidad (NR) que activaron en particular vías metabólicas mitocondriales específicas (oxidación β , metabolismo de butanoato y catabolismo de leucina) y parecieron mantener la homeostasis energética (actividad del ciclo de Krebs comparable a la DPG). Por tanto los resultados de los presentes inventores sugieren que una activación específica de las vías oxidativas mitocondriales permitirían conservar la homeostasis energética y proteger las mitocondrias contra la sobrecarga de alimento. Por lo tanto el papel de las mitocondrias parece crucial en el desarrollo de la obesidad y está relacionado con los trastornos metabólicos. En consecuencia este amplio análisis de los mecanismos subyacentes a la adaptación heterogénea a la alimentación con DRG aporta nuevas y prometedoras perspectivas a los programas de control de peso y soluciones nutricionales personalizadas.

Por lo tanto, si el método de la presente invención permite identificar una menor probabilidad de resistir la ganancia de peso inducida por una dieta rica en grasas – o una mayor probabilidad de ser susceptible a una ganancia de peso inducida por una dieta rica en grasas – esto puede ser un indicio de una falta de activación específica de las vías oxidativas mitocondriales.

En cambio, si el método de la presente invención permite identificar una mayor probabilidad de resistir la ganancia de peso inducida por una dieta rica en grasas – o una menor probabilidad de ser susceptible a una ganancia de peso inducida por una dieta rica en grasas – esto puede ser un indicio de una activación específica de las vías oxidativas mitocondriales.

Las vías oxidativas mitocondriales se pueden elegir del grupo formado por oxidación β , metabolismo de butanoato y catabolismo de leucina.

Dado que el método de la presente invención permite clasificar el sujeto sin necesidad de tener unos síntomas o predisposiciones visibles, es adecuado, por ejemplo, para niños, adolescentes, adultos jóvenes y/o sujetos en riesgo de desarrollar sobrepeso u obesidad.

Una vez conocido, dicho riesgo se puede contrarrestar con la dieta y el estilo de vida, eliminando así los posibles riesgos que puedan derivarse del sobrepeso o de la obesidad más tarde en la vida.

Por lo tanto el método se puede utilizar para planear una dieta diferenciada para un grupo concreto de sujetos o una dieta personalizada para un sujeto específico.

Los expertos en la materia comprenderán que pueden combinar libremente todas las características de la presente invención aquí reveladas. En particular, las características descritas para el uso de la presente invención se pueden combinar con el método según la presente invención y viceversa. También se pueden combinar las características descritas para las distintas formas de ejecución de la presente invención.

Aunque la presente invención se ha descrito a modo de ejemplo, debe apreciarse que es posible hacer variaciones y modificaciones sin apartarse del ámbito de la presente invención, tal como está definida en las reivindicaciones.

Además, en caso de que existan equivalentes conocidos de las características específicas de la presente invención, dichos equivalentes se incorporan como si estuvieran citados específicamente en esta descripción. Otras ventajas y características de la presente invención son evidentes a partir de las figuras y de ejemplos no excluyentes.

Ejemplos:

Procedimiento de manejo de los animales y preparación de muestras:

El experimento se efectuó siguiendo directrices nacionales adecuadas en el Nestlé Research Center (NRC, Suiza). Los ratones se mantuvieron en jaulas individuales bajo un régimen de 12h-12h de luz-oscuridad y se alimentaron a voluntad durante todo el experimento. Un total de 80 ratones C57BL/6 recibió primero una CHD (dieta de pienso) estándar (referencia 3437) durante varias semanas y tras este tratamiento se realizó una primera recogida de orina (t0). Luego los ratones se separaron en 2 grupos: 24 ratones se alimentaron con una CHD diferente (baja en grasa, D12450B, véase la composición en las figuras suplementarias) cuya proporción de proteína, vitaminas, minerales y carbohidratos era distinta de la primera dieta estándar. Los otros 56 ratones se alimentaron con una DRG (rica en grasa, D12492) cuya composición dietética, aparte del nivel de carbohidratos y grasas, era comparable a la segunda CHD. Estos dos grupos se caracterizaron respectivamente como grupos de control y grupos DIO. Se recogieron de nuevo muestras de orina a los 7 días (t1) y 60 días (t2) del cambio de dieta. Todas las muestras se congelaron rápidamente a -80°C hasta su análisis. Todos los ratones se pesaron en los momentos t0, t1 y t2 para controlar la ganancia de peso, tanto en los grupos DRG como en los grupos de control. La diferencia de ganancia de peso entre DRG y DPG, así como entre NR y FR, se valoró mediante una prueba no paramétrica (test de Wilcoxon-Mann-

Whitney U). También se registró la ingesta de alimento (IA) en los tiempos t1 y t2. A lo largo del tiempo hay un descenso significativo de la IA en los ratones alimentados con DRG respecto a los ratones alimentados con DPG. Los ratones FR también tienen una mayor IA que los ratones NR en ambos intervalos de tiempo. La diferencia de IA entre los grupos se calculó mediante la prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney U.

5 Espectroscopía RMN-H¹

10 Un volumen de 40 µl de orina se diluyó con 20 µl de solución tampón (NaHPO₄ 0,6 M, pH = 7) que contenía azida sódica (3 mM) y TSP (0,5 mM). Una vez centrifugadas, las muestras se introdujeron en tubos de RMN de 1,7 mm de diámetro mediante una jeringa. Luego se registraron los espectros de RMN-H¹ en un espectrómetro 600,13 MHz, realizando 64 barridos de una secuencia estándar con 64K puntos de datos. La temperatura del ensayo de RMN se mantuvo a 300 K. Los espectros de orina se procesaron mediante el programa TOPSPIN 2.0 (Bruker Biospin, Rheinstetten, Alemania). Las FID de cada espectro se multiplicaron por una función exponencial correspondiente a un ensanchamiento de la señal de 1 Hz, antes de convertirlas en un espectro mediante un transformador de Fourier.

15 Después se corrigió manualmente la fase y la línea base de los espectros. El desplazamiento químico se calibró utilizando la señal del TSP a δ 0. Las asignaciones espectrales se llevaron a cabo utilizando STOCOSY (Statistical TOtal Correlation Spectroscopy [espectroscopía de correlación estadística total]), bases de datos de espectros y asignaciones publicadas.

20 Procesamiento de datos y análisis de datos multivariantes:

Por último los datos espectrales (desde 6 0,2 hasta 6 9,5) se importaron al programa Matlab (versión, the mathworks Inc, Natwick MA) y se transformaron en 22K puntos de datos. Se suprimió la resonancia del pico de agua (6 4,7-5,05) de cada espectro para eliminar la variabilidad vinculada a la presaturación de resonancia de agua. Luego los espectros de RMN-H¹ se normalizaron sobre el área total y se aplicaron diversas estadísticas multivariantes (PCA, OPLS y OPLS-DA), empleando una escala de "varianza unitaria". El coeficiente de regresión de OPLS se puede mostrar usando un método de escalamiento inverso. De este modo podemos estimar la proporción de varianza de cada variable de RMN responsable de la discriminación por grupos en el modelo. La construcción de mapas de calor que muestren los metabolitos con los valores más elevados del coeficiente proporciona una fácil comparación de las respuestas metabólicas a la alimentación con DRG a corto y largo plazo. Los mapas de calor se generaron tomando los valores del coeficiente de correlación de los metabolitos que discriminaban DRG/DPG o FR/NR. Los coeficientes de correlación por encima del valor límite de 0,3 se muestran mediante un mapa de color (gradientes del rojo al azul según el valor de covarianza en cada metabolito). Por lo tanto los mapas de calor proporcionan una comparación fácil de las respuestas metabólicas al desarrollo de obesidad a corto y largo plazo.

35 Análisis de datos univariantes

Los metabolitos intermedios de la oxidación beta, de la oxidación de los AACR, del ciclo de Krebs y de las vías de nicotinamida adenina dinucleótido asignables a los espectros RMN-H¹ de orina se integraron para medir la excreción urinaria de estos metabolitos 7 y 60 días después del cambio de dieta en los grupos DPG, DRG, NR y FR. Para cada metabolito, la integral a los 7 y 60 días se dividió por la integral al día 0 (durante el periodo de preintervención) a fin de normalizar la excreción urinaria de estos metabolitos conforme a la línea base. La proporción obtenida para cada metabolito se comparó entre los grupos DPG, DRG, NR y FR en cada intervalo, usando la prueba no paramétrica de Mann and Whitney.

45 Principales hallazgos y hechos destacables:

Variabilidad de la ganancia de peso en ratones C57BL/6J alimentados con DRG

50 Para estudiar la contribución de las dietas al desarrollo de la obesidad se alimentaron 60 ratones C57BL/6J con una dieta de pienso (CHD) durante un periodo de preintervención de 1 semana, seguido de un cambio de dieta según el cual los ratones se alimentaron con una DPG (n = 20) o con una DRG (n = 40) durante 60 días. El peso corporal se midió durante el periodo de preintervención y a los 7 y 60 días del cambio de dieta (figura 1.A). El control del peso mostró un incremento significativo de peso en los ratones alimentados con DRG respecto a los ratones alimentados con DPG a lo largo del ensayo. En concreto, el peso promedio de los ratones alimentados con DRG fue 1,5 g mayor (p = 3,9 x 10⁻⁷) a los 7 días y 4,5 g mayor (p = 2,36 x 10⁻⁸) a los 60 días que el peso de los ratones de control. La distribución del peso también reveló una gran heterogeneidad dentro del grupo de DRG a los 7 días (coeficiente de variación CV = 0,05), que todavía fue más notable a los 60 días (CV = 0,120) (figura 1.B). Esta observación ilustra la existencia de una fuerte variabilidad fenotípica en el grupo de DRG y sugiere la presencia de marcas metabólicas específicas asociadas a estos subfenotipos obesos.

65 Para identificar los "fuertemente respondedores" (FR) y los "no respondedores" (NR) a la alimentación con dieta RG clasificamos la población de ratones según la ganancia de peso corporal (GPC) a los 7 y 60 días de la alimentación con RG. Los ratones situados consistentemente en la parte superior y en los tercios inferiores de la distribución de la GPC se designaron respectivamente como NR y FR, con excepción de 3 ratones FR situados en la mitad superior de la distribución de la GPC a los 60 días. Se adoptó este umbral para tener suficientes muestras en cada grupo

(ratones NR n = 10, ratones FR = 14) y realizar pruebas estadísticas eficaces, y también para identificar diferencias significativas en las marcas metabólicas entre estos dos grupos. La trayectoria media del peso de los ratones NR, FR y de los ratones alimentados con dieta PG a lo largo del tiempo (figura 1.D) reveló que los ratones FR ganaron significativamente más peso que los ratones NR y los ratones alimentados con dieta PG durante el ensayo. De modo interesante no hubo ninguna diferencia significativa de peso corporal entre el grupo NR y el grupo DPG a los 7 días ($p = 0,10$), pero identificamos una variación importante de peso corporal a los 60 días ($p = 7,67 \times 10^{-5}$). Además la trayectoria de ganancia de peso corporal de los ratones NR (coeficiente de regresión = 3,85) fue similar a la de los ratones alimentados con dieta PG, lo cual indica que el comportamiento de ganancia de peso de los ratones NR fue comparable al de los ratones PG a lo largo del tiempo, mientras que los ratones FR tendían a ganar peso con mayor rapidez. Esta pronta y sostenida inflexión de la trayectoria de ganancia de peso corporal, que define los subgrupos de fuertemente respondedores y no respondedores, sugiere la existencia de una predisposición diferencial de los ratones C57BL/6J a la obesidad inducida por la dieta (DIO). Por lo tanto ensayaremos en este estudio la capacidad de predecir trayectorias de ganancia de peso en ratones alimentados con DRG, basándonos en perfiles metabólicos tempranos.

El perfilado metabólico urinario indica una marca metabólica sostenida, asociada a la obesidad inducida por la dieta rica en grasas

Para investigar la marca metabólica específica asociada al desarrollo de la obesidad inducida por la dieta, obtuvimos los perfiles metabólicos urinarios 1 semana antes y 7 y 60 días después de la intervención dietética, con el uso de espectroscopía de RMN-H1 (figura 2.A, 2.B). Luego se compararon los perfiles metabólicos urinarios de los ratones alimentados con dieta PG y RG en cada intervalo, utilizando modelos OPLS-DA. Cada modelo se calculó empleando un componente predictivo y varios componentes ortogonales. El número óptimo de los componentes ortogonales se determinó por estadística de bondad del ajuste mediante R^2Y y Q^2Y . Los gráficos OPLS-DA de puntuaciones de las muestras para los modelos a los 7 días (figura 2.C) y a los 60 días (figura 2.D) demostraron que la fuerte variación metabólica asociada a la alimentación RG destacaba a lo largo del componente predictivo (Tpred), mientras que el segundo eje, correspondiente al primer componente ortogonal (Tort), refleja una variabilidad en el grupo relacionada con efectos independientes de la dieta.

Para cada modelo se identificaron los metabolitos con el coeficiente de correlación más alto y se resumieron en un mapa de calor (figura 2.E) que indica las variaciones metabólicas urinarias entre los ratones PG y RG. En concreto aumentó significativamente el nivel de carnitina, de hexanoilglicina y de los productos intermedios de la oxidación de los AACR (isovalerilglicina, α -ceto- β -metilvalerato y α -ceto-valerato) en el grupo RG a los 7 y 60 días. En cambio los niveles de los derivados de metilamina resultantes del metabolismo microbiano de la colina (trimetilamina (TMA) y trimetilamina-N-óxido (TMAO)), así como del producto final de la degradación de la fenilalanina por las bacterias del intestino (fenilacetilglicina), disminuyeron en el grupo RG durante todo el ensayo. En particular, el grado de variación del nivel urinario de TMAO entre los 7 días y los 60 días sugiere que hay un desplazamiento dependiente del tiempo en la conversión de TMA a TMAO con la alimentación DRG. Por lo tanto el tratamiento con DRG implicaría cambios importantes en la actividad de la microbiota intestinal. La adaptación metabólica a la alimentación DRG en función del tiempo también se caracterizó por una disminución importante del sulfato de indoxilo en la orina de los ratones alimentados con RG durante 7 días. Los productos finales de las vías de nicotinamida adenina dinucleótido (N-1-metil-2-piridon-5-carboxamida: 2PY y N-1-metil-4-piridon-3-carboxamida: 4PY) también se correlacionaron de modo positivo con los ratones alimentados con RG durante 60 días. La excreción de isovalerilglicina, α -ceto- β -metilvalerato y α -ceto-valerato aumentó significativa y consistentemente a lo largo del tiempo en el grupo alimentado con DRG, en comparación con el grupo alimentado con DPG, por lo cual pueden proponerse como biomarcadores cualitativos y estables de la DIO.

El perfilado metabólico urinario de ratones NR y FR indica una adaptación metabólica específica asociada al fenotipo propenso a la obesidad y al fenotipo resistente a la obesidad

La creación de los perfiles metabólicos de los ratones FR y NR permitió identificar metabolitos relacionados con la mayor divergencia de ganancia de peso. Las comparaciones de los datos espectrales de RMN-H¹ entre NR y FR se hicieron mediante el uso de pares de modelos OPLS-DA a los 7 días y a los 60 días (figura 3.A, 3.B). El gráfico OPLS-DA de puntuaciones de las muestras a los 7 días (figura 3.C) y a los 60 días (figura 3.D) mostró una buena discriminación entre ratones NR y FR a lo largo del componente predictivo (Tpred). El segundo eje ilustra la variación ortogonal hacia la fuerte respuesta asociada a la obesidad. De modo interesante no se encontró ninguna diferencia en los perfiles metabólicos urinarios de los ratones NR y FR antes del cambio de dieta, lo cual indica que todos los ratones C57BL/6J tienen fenotipos y metabolitos similares cuando son alimentados con una dieta de pienso.

El mapa de calor (figura 3.E) que resume los metabolitos involucrados en la separación de grupos mostró perfiles metabólicos diferenciales relacionados con los ratones NR y FR durante un corto periodo de tiempo (7 días) y un largo periodo de tiempo (60 días) con alimentación RG. En concreto, una marca metabólica específica que incluía catabolismo de leucina, oxidaciones β y producción de ácidos grasos de cadena corta se relacionó con la progresión de la obesidad. De hecho la hexanoilglicina, la isovalerilglicina, la leucina, el acetato y el isobutirato se relacionaron negativamente con los ratones FR durante todo el ensayo. Como estos metabolitos son regulados constantemente a la baja en los ratones FR, fueron presentados como marcadores estables del fenotipo resistente a la obesidad. La

comparación de los perfiles metabólicos entre los ratones FR y NR a los 7 días y a los 60 días también demostró una marca metabólica dependiente del tiempo, asociada a la variabilidad del fenotipo. En los ratones FR se observó tras 7 días de DRG una menor excreción urinaria de acetato. En cambio en los ratones FR se observó durante el mismo periodo una mayor excreción urinaria de sacarosa. Sorprendentemente la taurina se relacionó positivamente con los ratones FR 7 días después de la alimentación RG y negativamente con los ratones FR después de 60 días. El perfil metabólico urinario de los ratones FR tras 60 días de RG también estuvo marcado por un incremento de creatina, guanidoacetato, tartrato, hipurato e hidroxifenilacetilglicina. Es interesante que la hexanoilglicina y la isovalerilglicina, caracterizadas como posibles marcadores cualitativos de la DIO, también se identificaron como posibles marcadores estables del fenotipo resistente a la obesidad. Estos resultados demostraron que el catabolismo de la leucina y la oxidación β en las mitocondrias resulta muy afectado por la alimentación RG y su regulación específica contribuiría al inicio de la obesidad.

Los patrones de excreción urinaria de diversos metabolitos indicaron desregulaciones específicas del metabolismo mitocondrial en ratones RG y FR

La regulación del metabolismo mitocondrial en los ratones alimentados con DRG se siguió investigando con la ayuda de un método complementario de análisis de datos univariantes. La excreción urinaria de los productos intermedios de la oxidación β : hexanoilglicina, carnitina y acilcarnitina aumentó constantemente en la orina de los ratones alimentados con dieta RG, en comparación con los ratones alimentados con dieta PG, lo cual sugiere un incremento del exceso de ácidos grasos en las mitocondrias y una activación de la oxidación β . El producto final de las vías de nicotinamida adenina dinucleótido (2PY, 4PY) también aumentó constantemente en la orina de los ratones tras la alimentación con RDG, lo cual indica una sobre-regulación de la oxidación beta y de proliferadores de peroxidoma. Las integraciones confirmaron un incremento significativo y consistente de leucina, valina, isoleucina, así como de productos intermedios del catabolismo de los AACR (α -ceto- β -metilvalerato y α -ceto-valerato) en los ratones alimentados con dieta RG, lo cual apoya la hipótesis del catabolismo sobre-regulado de los AACR asociado a la DRG. El ciclo de Krebs también resultó parcialmente regulado en los ratones alimentados con dieta RG, pues observamos un aumento a corto plazo de succinato en la orina de los ratones 7 días después de la dieta DRG, que es constante en la orina de los ratones alimentados con dieta RG respecto a los ratones alimentados con dieta PR.

Estos resultados apoyan la hipótesis de que el catabolismo de la valina y de la isoleucina se sobre-regula e induce la formación de succinil-CoA y la producción de los siguientes productos intermedios del ciclo de Krebs. De manera sorprendente los demás productos intermedios del ciclo de Krebs (citrato, cis-aconitasa, α -cetogluturato) no fueron significativamente diferentes entre los ratones alimentados con dieta PG y dieta RG, lo cual sugiere una desconexión entre el catabolismo de leucina y la oxidación beta, que producen 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 mayor nivel de vinilacetilglicina en la orina de ratones alimentados con dieta RG sugiere que la acetil-CoA se convertiría en acetoacetil-CoA, la cual está conectada con el metabolismo de butanoato y la formación de vinilacetilglicina. Estos resultados confirman que la DRG induce una sobre-regulación de las vías oxidativas mitocondriales y del ciclo de Krebs, que podría aumentar la producción de energía.

El análisis de datos univariantes también nos permitió entender mejor el vínculo entre la oxidación β , el catabolismo de los AACR y el ciclo de Krebs en el contexto de la variabilidad del fenotipo. Las integraciones de los productos intermedios del catabolismo de los AACR demostró que solo la isovalerilglicina era significativamente más alta en la orina de los ratones NR respecto a los ratones FR o a los ratones PG, lo cual indica que los ratones resistentes a la obesidad estaban relacionados exclusivamente con la disrupción del catabolismo de leucina. La hexanoilglicina fue significativamente más alta en la orina de los ratones NR respecto a los ratones FR durante todo el ensayo, mientras que la excreción urinaria de carnitina y acilcarnitina permaneció inalterada. Por tanto, aunque la oxidación β parecía afectar a los ratones NR, el flujo de ácidos grasos hacia las mitocondrias es congruente entre los ratones NR y FR.

Además observamos un aumento significativo de vinilacetilglicina en la orina de los ratones NR, lo cual sugiere una redirección de acetil-CoA hacia el metabolismo de butanoato. De modo interesante no se observó ninguna diferencia en la actividad del ciclo de Krebs entre los ratones NR y FR después de 7 días de DRG. A los 60 días el succinato fue significativamente más alto en la orina de los ratones FR, lo cual indica una sobre-regulación del ciclo de Krebs. Tal como se había observado previamente, la excreción urinaria de otros productos intermedios del ciclo de Krebs (citrato, α -cetogluturato, cis-aconitato) permaneció inalterada entre los ratones NR y FR, lo cual apoya la hipótesis de una regulación específica dentro del ciclo de Krebs. Nuestros resultados indican que tras un largo periodo de tiempo con DRG los ratones propensos a la obesidad están relacionados con una disfunción del metabolismo energético caracterizada por una desregulación del ciclo de Krebs. La rápida activación de la oxidación β , del catabolismo de leucina y del metabolismo de butanoato en los ratones resistentes a la obesidad puede ser un mecanismo protector contra el exceso de ácidos grasos que permita mantener la homeostasis energética.

Se valoraron las relaciones de los metabolitos referidos con la ganancia de peso, utilizando la concentración urinaria del metabolito (medida mediante espectroscopía RMN- H^1), el incremento del cambio a partir de la línea base (T0) y la relación con la creatina urinaria (medida mediante espectroscopía RMN- H^1). Se puso el énfasis en la capacidad de predecir la ganancia de peso y clasificar sujetos como NR o FR, basándose en la respuesta metabólica al desafío dietético a corto plazo (en concreto T7). Los valores de los coeficientes de correlación están resumidos en la tabla 1,

5

mientras que los incrementos de los cambios están indicados en la tabla 2. Para seleccionar los marcadores más robustos se utilizó el % de disminución media de exactitud de los “datos fuera de la bolsa” como característica de importancia variable. De este modo se pudieron determinar las variables que discriminaban mejor los sujetos según su susceptibilidad a la ganancia de peso (fenotipos NR y FR, figura 5) y resultó que la hexanoilglicina, la siovaleroilglicina, el TMAO y el acetato fueron los marcadores metabólicos más robustos para discriminar los sujetos como fenotipos NR y FR.

Tabla 1: resumen de relaciones entre metabolitos y la ganancia de peso inducida por dieta rica en grasas

Metabolitos	Coeficiente de correlación con la ganancia de peso final en los animales alimentados con una dieta rica en grasas (valor r)			Coeficiente de correlación con el peso final en los animales alimentados con una dieta rica en grasas (valor r)		
	Incremento del cambio (T7/T0)	Concentración T7	Relación metabolito/crea tinina	Incremento del cambio (T7/T0)	Concentración T7	Relación metabolito/crea tinina
Hexanoilglicina	- 0,51	- 0,38	- 0,44	- 0,50	- 0,32	- 0,44
Isovalerilglicina	- 0,60	- 0,42	- 0,48	- 0,62	- 0,36	- 0,51
Leucina	- 0,52	- 0,17	- 0,16	- 0,56	- 0,03	- 0,18
Creatinina	- 0,08	- 0,04	NA	- 0,09	0,09	NA
TMAO	0,27	0,25	0,21	0,27	0,23	0,17
Ácido hipúrico	- 0,09	0,01	0,01	- 0,17	0,04	- 0,05
Acetato	- 0,41	- 0,48	- 0,46	- 0,42	- 0,41	- 0,48
Ácido guanidoacético	0,13	0,26	0,11	0,10	0,17	- 0,03

Tabla 2: resumen de los incrementos de cambio a lo largo del tiempo en metabolitos escogidos de sujetos resistentes (NR) y propensos (FR) a la ganancia de peso

	T0		T7		T60	
	NR	FR	NR	FR	NR	FR
Peso corporal			102,9 ± 1,4	111,4 ± 2,3	120,6 ± 3,1	149,8 ± 11,6
Hexanoílglicina	100 ± 0	100 ± 0	218,5 ± 40,3	177,6 ± 56,8	210,7 ± 61,7	160,2 ± 36,4
Isovalerilglicina	100 ± 0	100 ± 0	137,7 ± 21,8	112,6 ± 24,4	132 ± 29,3	106,3 ± 17,1
Leucina	100 ± 0	100 ± 0	190,6 ± 17,1	177,2 ± 19,6	162,3 ± 23,2	152,9 ± 22,4
Creatinina	100 ± 0	100 ± 0	164,5 ± 41,6	135,1 ± 41,3	181,3 ± 33,7	165,4 ± 58,7
TMAO	100 ± 0	100 ± 0	63,8 ± 36,7	80 ± 33,3	101,4 ± 56,7	80,3 ± 57,8
Ácido hipúrico	100 ± 0	100 ± 0	11,9 ± 2,7	12,6 ± 4,7	11 ± 2,4	14,5 ± 4,4
Acetato	100 ± 0	100 ± 0	85,6 ± 28,2	72,9 ± 29,3	115,8 ± 149	75,2 ± 29,3
Ácido guanidoacético	100 ± 0	100 ± 0	143 ± 15,1	142,9 ± 19,4	148,2 ± 23,3	152,4 ± 23,7

REIVINDICACIONES

1. Método para diagnosticar en un sujeto la probabilidad de resistir la ganancia de peso inducida por una dieta rica en grasas, que consiste en
- 5 - determinar el nivel de isovalerilglicina en una muestra de orina obtenida previamente de un sujeto examinado y
- comparar el nivel de isovalerilglicina del sujeto con un valor de referencia predeterminado el cual está basado en un nivel medio de isovalerilglicina en la orina de una población de control, de manera que un mayor nivel de isovalerilglicina en la muestra respecto al valor de referencia predeterminado
- 10 indica una mayor probabilidad de resistir la ganancia de peso inducida por una dieta rica en grasas.
2. El método de la reivindicación 1, que además comprende las etapas de
- determinar el nivel en la muestra de orina de al menos otro biomarcador elegido del grupo formado por hexanoílglicina, trimetilamina-N-óxido, leucina, isobutirato, acetato, guanidoacetato, sacarosa, ácido tartárico,
- 15 ácido hipúrico e hidroxifenilacetilglicina y
- comparar el nivel en el sujeto de al menos otro biomarcador con un valor de referencia prefijado que está basado en niveles medios de al menos otro biomarcador en una muestra de orina de una población de control sana normal,
- 20 de modo que un mayor nivel de hexanoílglicina, leucina, isobutirato, acetato y/o un menor nivel de trimetilamina-N-óxido, guanidoacetato, sacarosa, ácido tartárico, ácido hipúrico y/o hidroxifenilacetilglicina en la muestra de orina respecto a los valores de referencia prefijados indica una mayor probabilidad de resistir la ganancia de peso inducida por una dieta rica en grasas.
3. El método según una de las reivindicaciones 1 y 2, en que los niveles de los biomarcadores se determinan por RMN- H^1 y/o por espectrometría de masas en la muestra y en la referencia.
- 25
4. El método según una de las reivindicaciones 1 a 3, en que una menor probabilidad de resistir la ganancia de peso inducida por una dieta rica en grasas indica la posibilidad de desarrollar trastornos metabólicos relacionados con el sobrepeso y/o la obesidad.
- 30
5. El método según la reivindicación 4, en que los trastornos metabólicos relacionados con el sobrepeso y/o la obesidad son enfermedades cardiometabólicas y/o desregulaciones metabólicas.
- 35
6. El método según una de las reivindicaciones 1 a 5, para ser empleado en sujetos de peso inferior al normal, peso normal, sobrepeso o en sujetos obesos.
7. El método según una de las reivindicaciones 1 a 6, en que el sujeto es un humano o un animal de compañía tal como un gato o un perro.
- 40
8. El método según una de las reivindicaciones 1 a 6, en que una menor probabilidad de resistir la ganancia de peso inducida por una dieta rica en grasas es indicativa de una falta de activación específica de las vías oxidativas mitocondriales.
- 45
9. El método según una de las reivindicaciones 1 a 6, en que una mayor probabilidad de resistir la ganancia de peso inducida por una dieta rica en grasas indica una activación específica de las vías oxidativas mitocondriales.
10. El método según una de las reivindicaciones 8-9, en que las vías oxidativas mitocondriales se escogen del grupo formado por la oxidación β , el metabolismo de butanoato y el catabolismo de la leucina.
- 50
11. El método según una de las reivindicaciones 1 a 10, en que el sujeto es un niño, un adolescente, un adulto joven y/o una persona en riesgo de desarrollar sobrepeso u obesidad
- 55
12. El método según una de las reivindicaciones 1 a 11, el cual se usa para planear una dieta diferenciada para un grupo concreto de sujetos o una dieta personalizada para un sujeto específico.

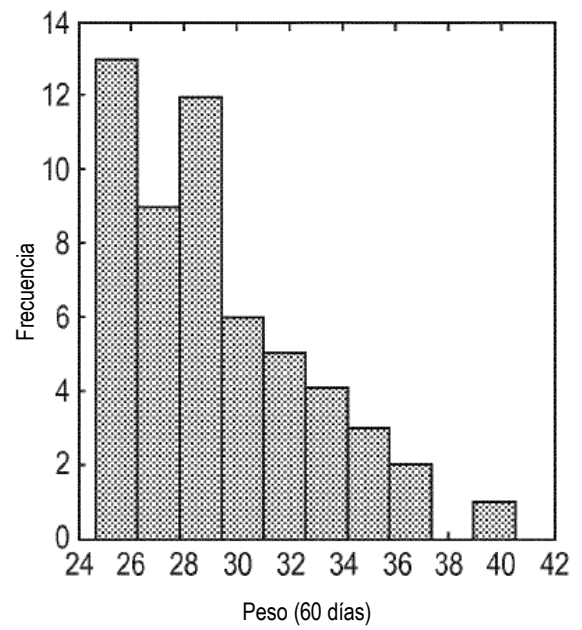
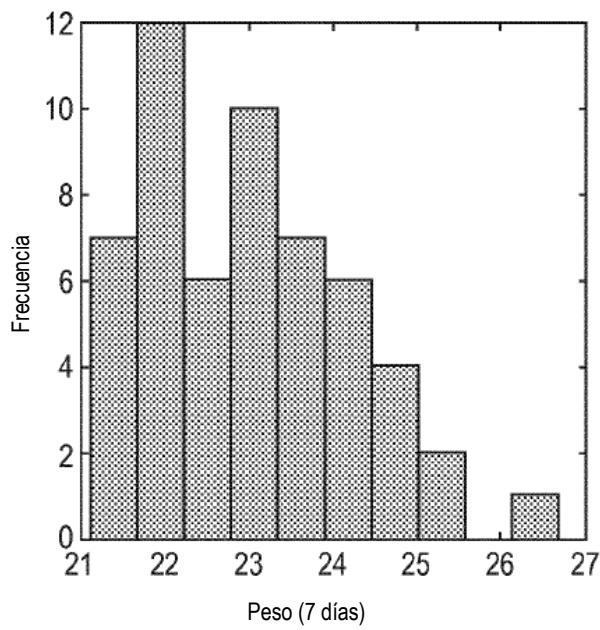
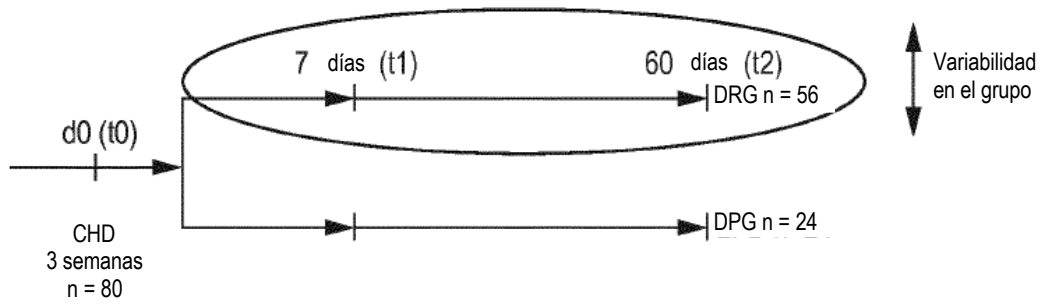


FIG. 1

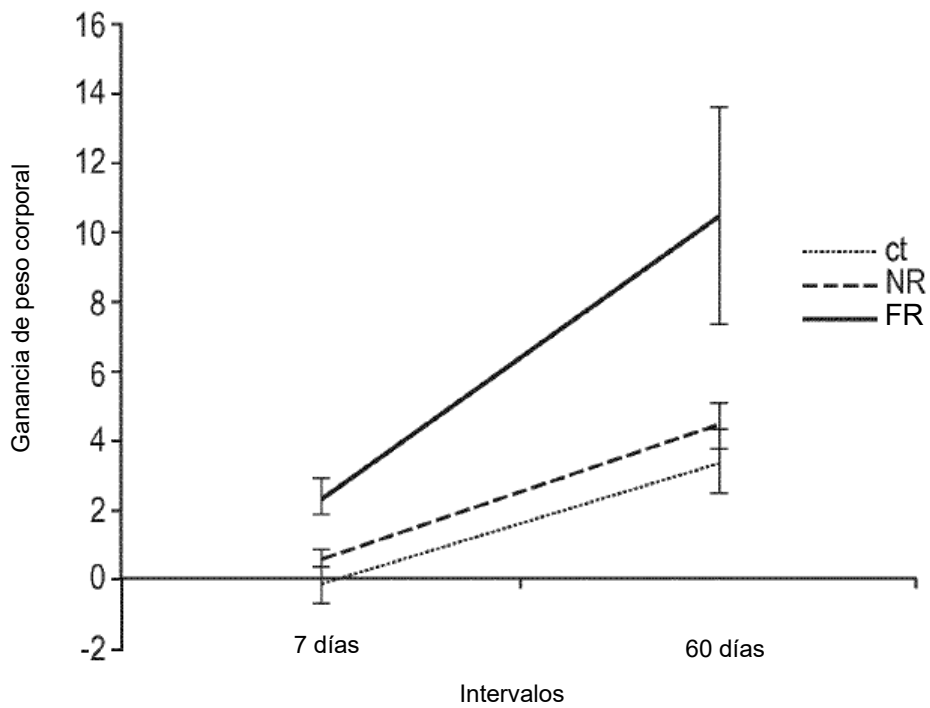
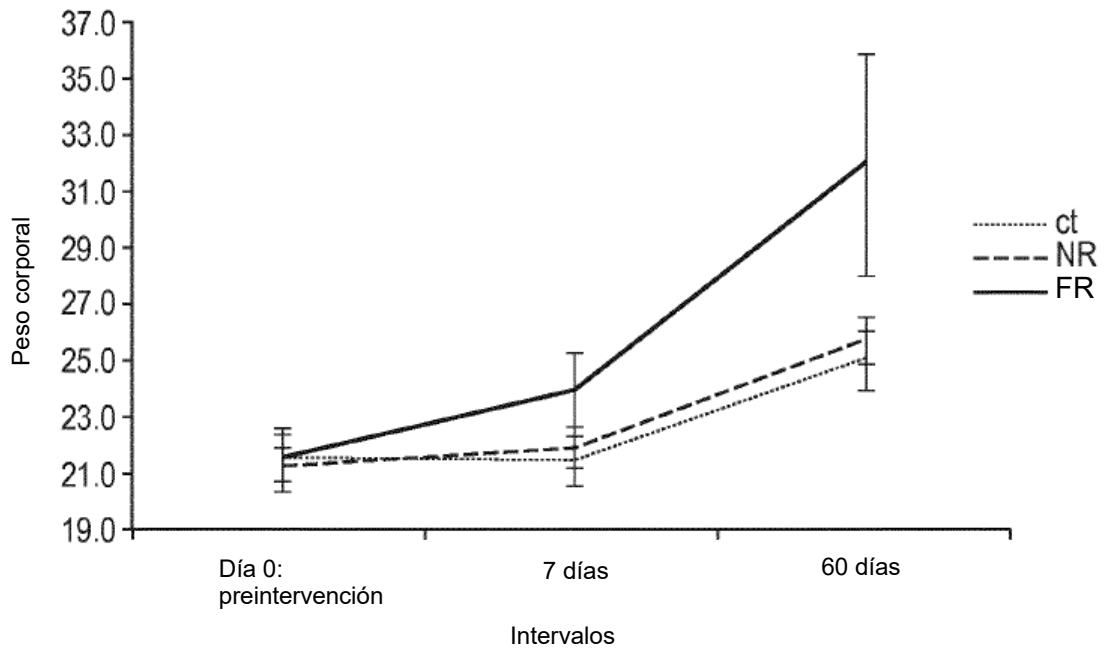


FIG. 1 (Continuación)

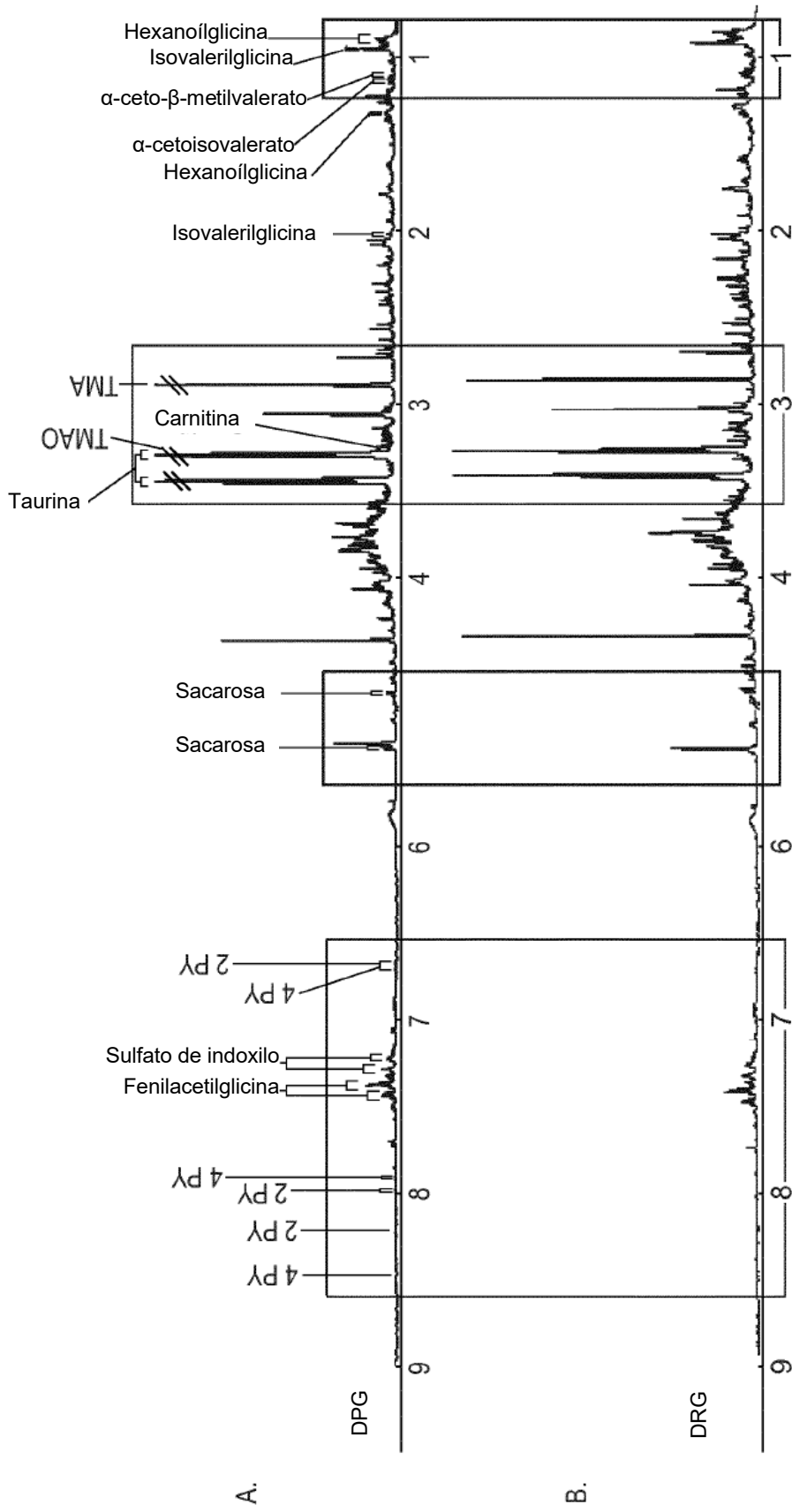


FIG. 2

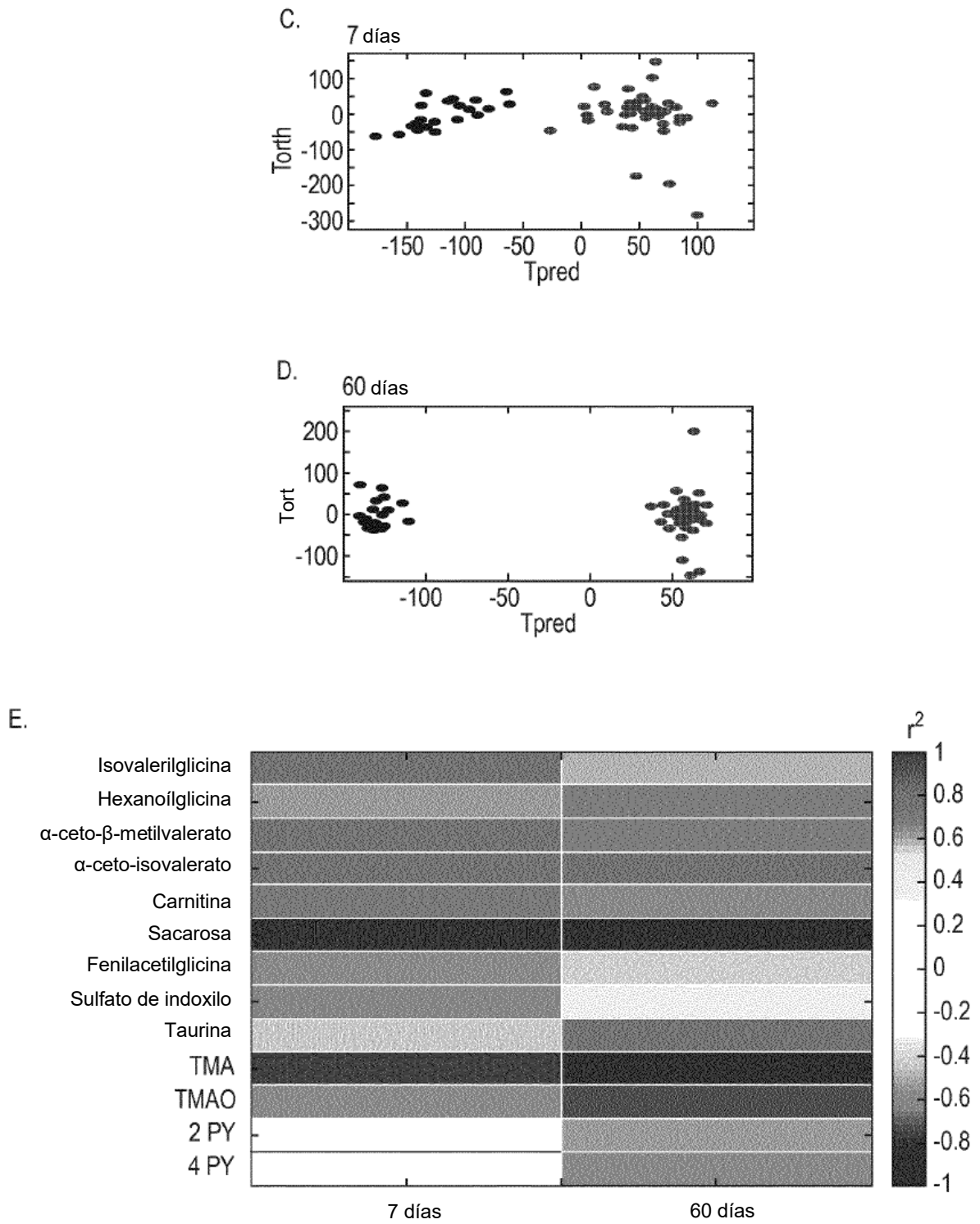


FIG. 2

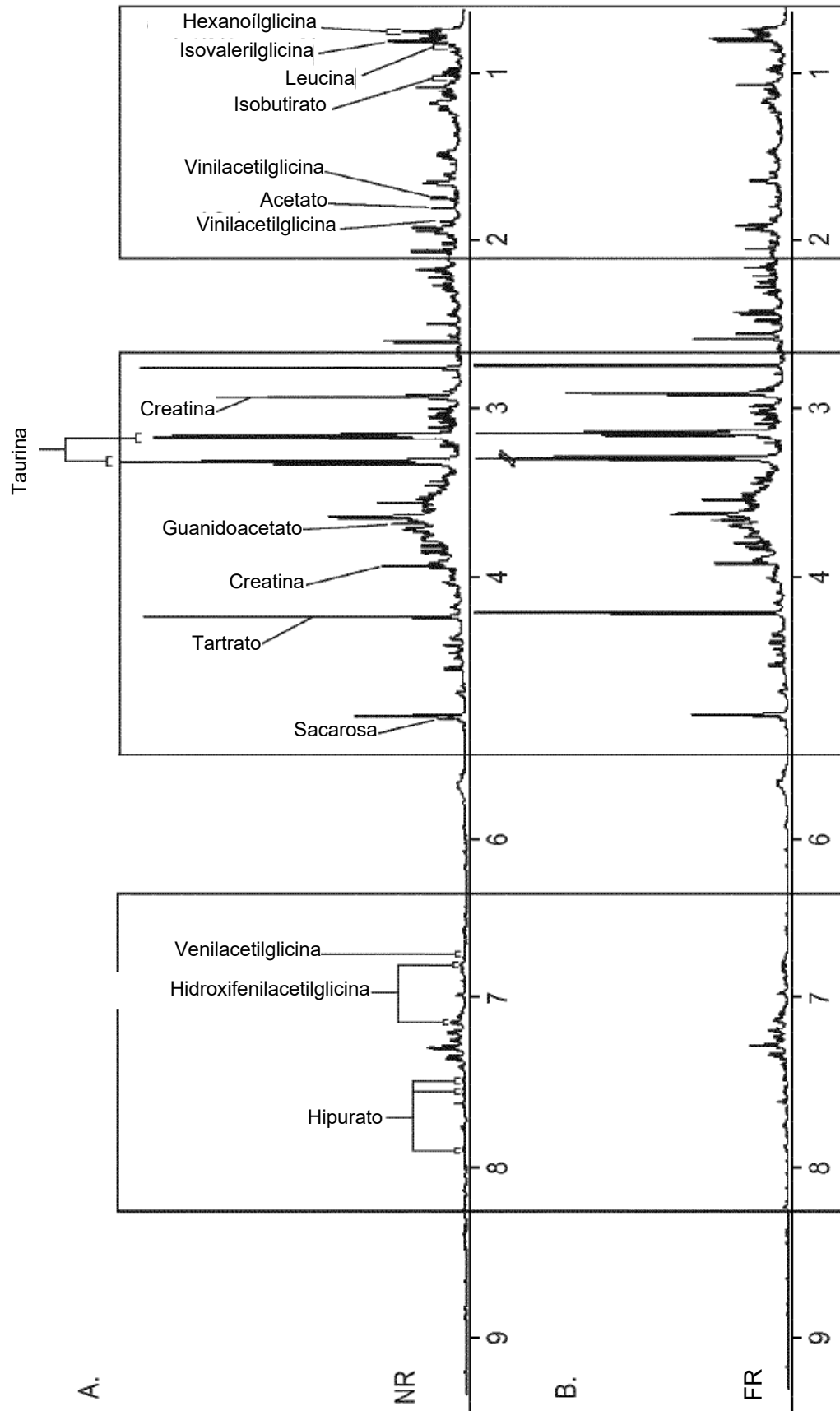


FIG. 3

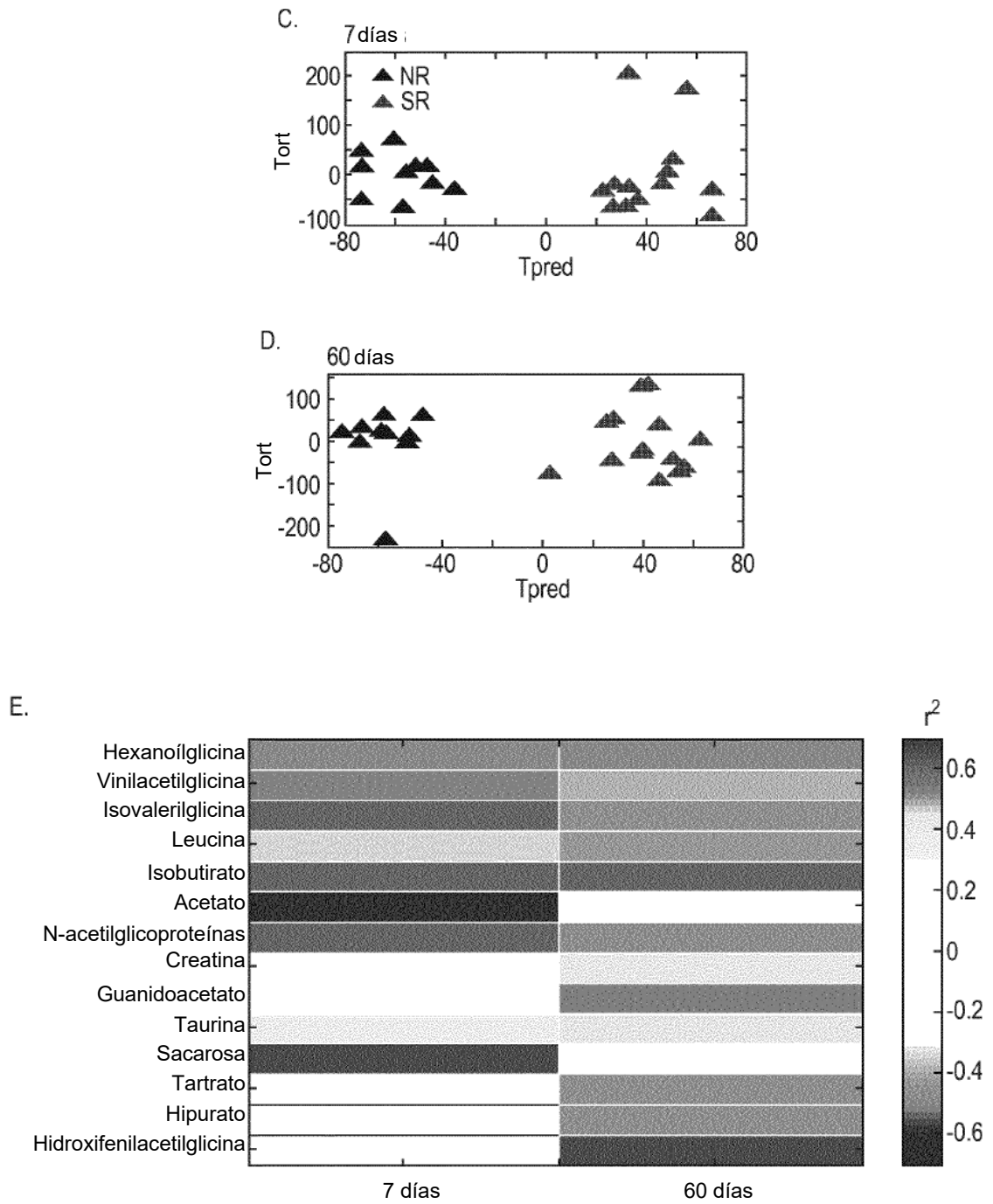


FIG. 3

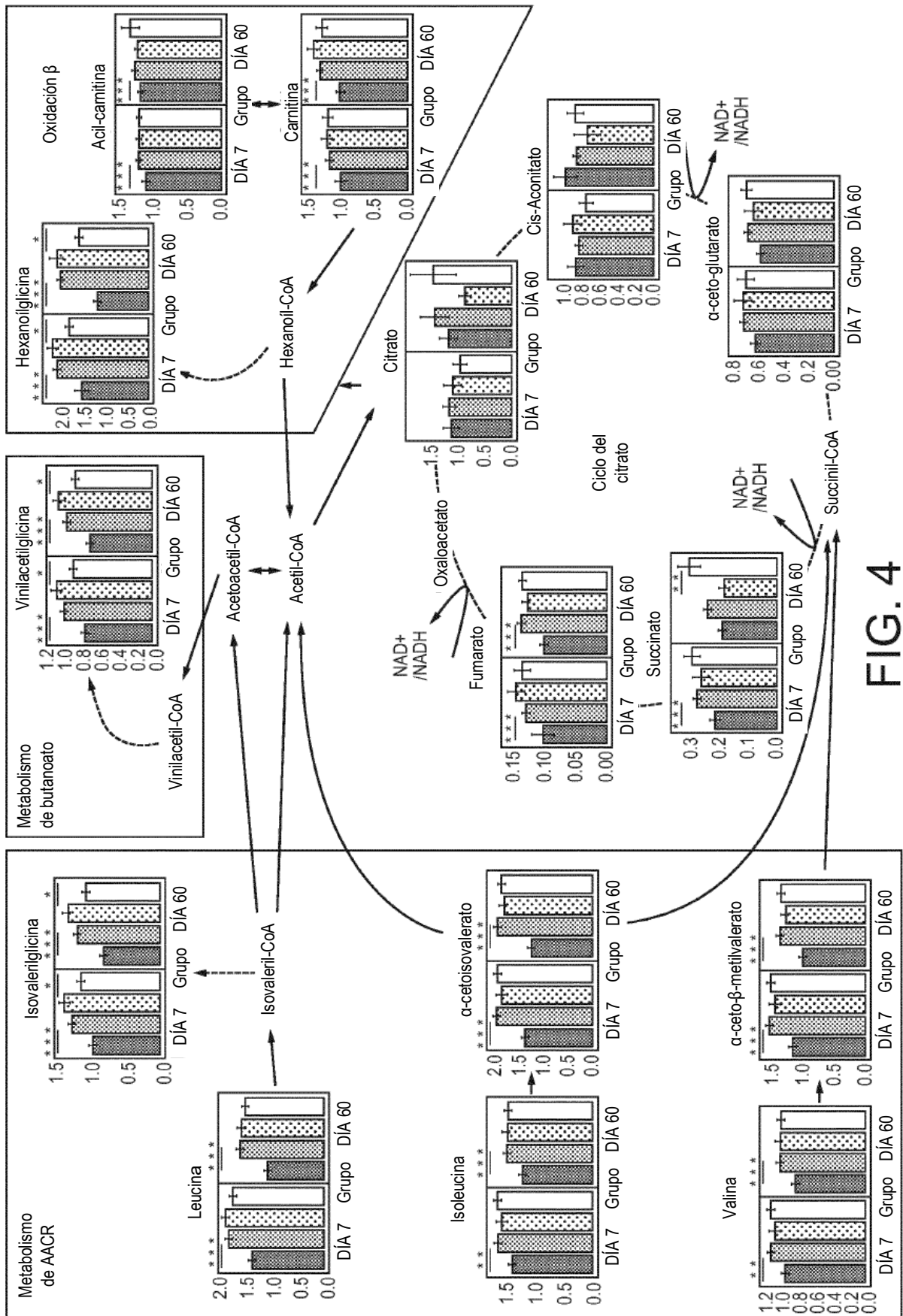


FIG. 4

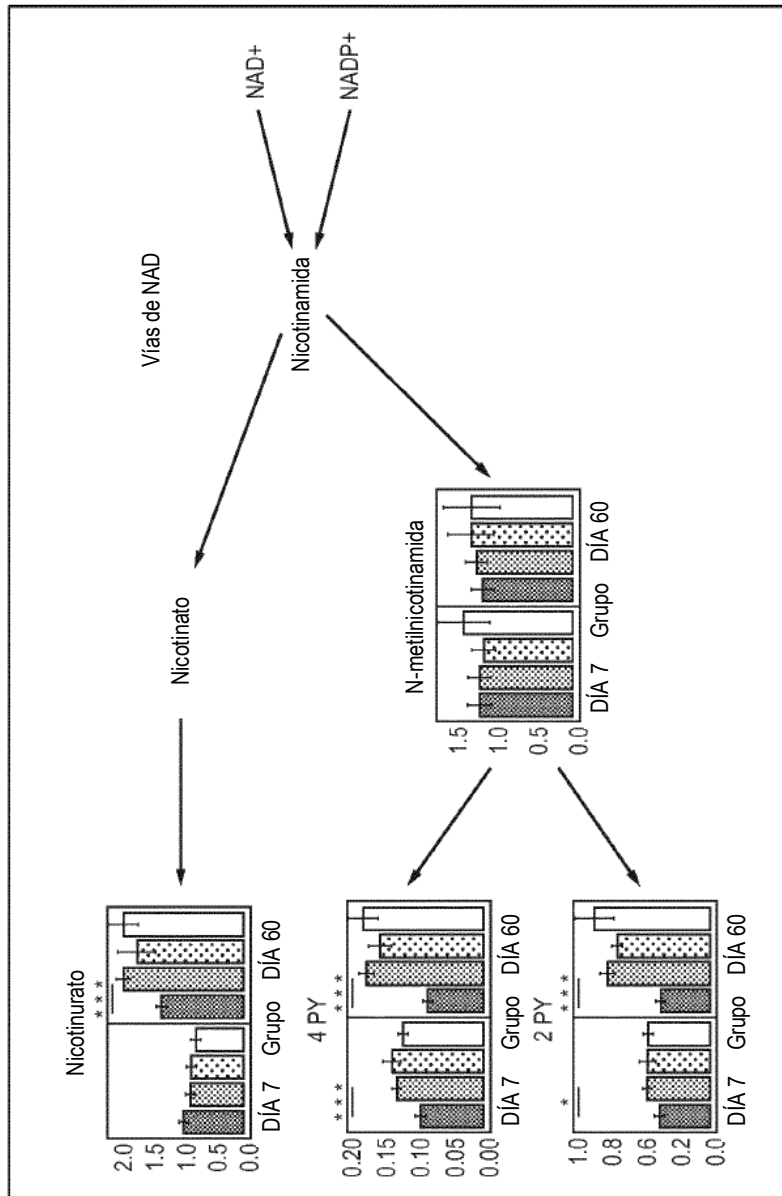


FIG. 4 (continuación)

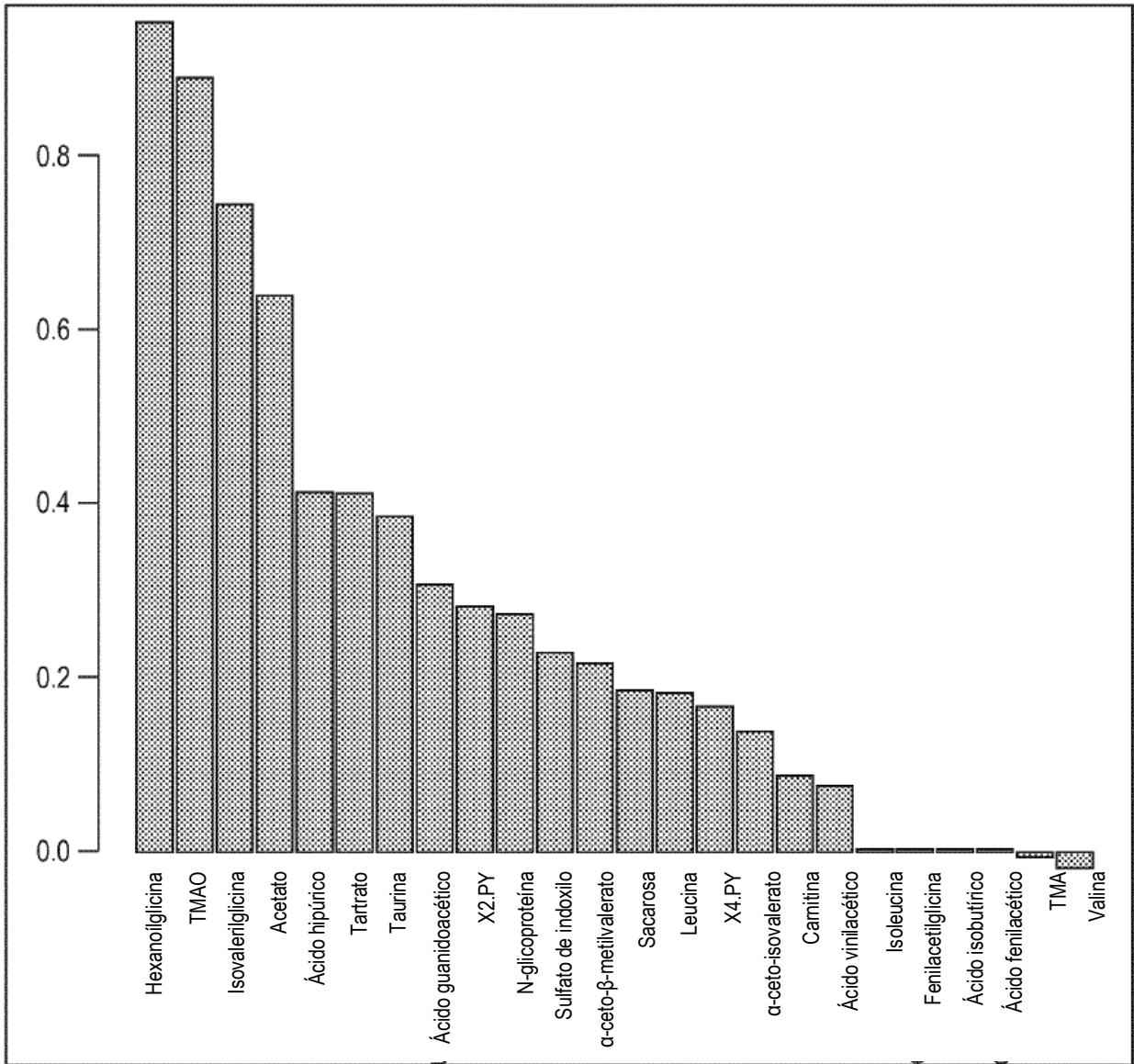


FIG. 5