

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 649 024**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.03.2013 PCT/EP2013/054327**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.09.2013 WO13139580**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.03.2013 E 13712159 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.10.2017 EP 2828669**

54 Título: **Fenilacetilglutamina como biomarcador para un envejecimiento sano**

30 Prioridad:

22.03.2012 EP 12160733

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

09.01.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 649 024 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

Fenilacetilglutamina como biomarcador para un envejecimiento sano

5 La presente invención, se refiere, de una forma general, a un estilo de vida sano, y la prevención de trastornos o desórdenes crónicos relacionados con la edad. De una forma particular, la presente invención, se refiere a biomarcadores y a su uso para detectar mejoras en el estilo de vida. Como tal, la presente invención, proporciona, por ejemplo, la fenilacetilglutamina (PAG – de sus iniciales, en idioma inglés, correspondientes a phenilacetylglutamine) como un biomarcador, y un procedimiento para diagnosticar un estilo de vida, el cual permita retardar y / o evitar el envejecimiento relacionado con los trastornos o desórdenes inflamatorios crónicos, procedimiento éste en el cual se utiliza el biomarcador consistente en la fenilacetilglutamina.

15 El envejecimiento, se define como la disminución, dependiente del tiempo, de la capacidad funcional y de la resistencia al estrés, asociadas con un riesgo incrementado de la morbilidad y de la mortalidad. De una forma adicional, el fenotipo de envejecimiento, en los seres humanos, es muy heterogéneo, y éste puede describirse como un complejo mosaico, el cual es el resultado de la interacción de una gran variedad de variables medioambientales, estocásticas y genéticas – epigenéticas. Décadas de investigación sobre el envejecimiento, han encontrado cientos de genes y muchos procesos biológicos, los cuales se encuentran asociados con el proceso del envejecimiento, pero, al mismo, tiempo, y de una forma simultánea, muchas cuestiones fundamentales, se encuentran todavía pendientes de respuesta, o bien, éstas son objeto de un intenso debate.

25 Estas cuestiones, de una forma frecuentes, no son susceptibles de poderse abordar procediendo a examinar un gen individual o una vía individual, sino que, que, éstos pueden abordarse y resolverse, de una forma mejor, recurriendo a un nivel sistémico, acaparando la atención del envejecimiento, como un complejo proceso multifactorial. De una forma adicional, el envejecimiento, viene acompañado de un estatus inflamatorio, crónico, de reducido grado o intensidad, el cual es el resultado de un desequilibrio entre procesos proinflamatorios y antiinflamatorios, una condición patogénica, la cual se ha venido revelando como crítica, en la aparición o comienzo de enfermedades mayores crónicas, relacionadas con la edad, tales como las consistentes en la aterosclerosis, la diabetes del tipo 2, y la neurodegeneración.

30 En el ámbito de esta perspectiva, el logro de un envejecimiento sano y de una longevidad sana son, de una forma presumible, el reflejo de no únicamente una reducida propensión a la acumulación de respuestas inflamatorias, sino, así mismo, también, de un eficiente desarrollo de las redes antiinflamatorias. De una forma adicional, existe una concienciación creciente, en cuanto al hecho de la importancia de la variación en la microbiota del intestino o flora intestinal, ya que, ésta, afecta al sistema del huésped o hospedador mamífero., teniendo así, de este modo, una influencia directa, demostrada, en la etiología de diversas enfermedades, tales como las consistentes en la enfermedad de Crohn, en el síndrome el colon irritable, en la obesidad, y la enfermedad cardiovascular.

40 La metabonómica, está considerada, hoy en día, como una propuesta de procedimiento de sistema, bien establecida, para caracterizar el fenotipo metabólico, el cual es el resultado de una respuesta fisiológica coordinada, a varios parámetros intrínsecos y extrínsecos, incluyendo al entorno medioambiental, a los fármacos y drogas, a los modelos patrón dietéticos, al estilo de vida, a la genética, y al microbioma o genoma de la microbiota. De una forma distinta a la expresión genética y a los datos proteómicos, los cuales indican el potencial para los cambios fisiológicos, los metabolitos y sus cambios cinéticos en cuanto a lo referente a la concentración, en el interior de las células, de los tejidos y de los órganos, representan los puntos finales reales de los procesos fisiológicos regulatorios.

50 La metabólica, se ha venido aplicando, de una forma satisfactoria y exitosa, para el estudio de la modulación de los procesos de envejecimiento, siguiendo intervenciones nutricionales, incluyendo los cambios metabólicos inducidos mediante una restricción calórica, en ratones, en perros, y en primates no humanos. De una forma específica, en las poblaciones caninas, se asociaron profundos cambios en el metabolismo de la microbiota intestinal, asociados con el envejecimiento. Aparte de estos descubrimientos, no se ha reportado, hasta el momento presente, sobre una caracterización comprensiva de los perfiles de los mecanismos moleculares, los cuales afectan a los procesos del envejecimiento. De una forma adicional, se echa en falta, todavía, el fenotipo metabólico de la longevidad.

55 Así, por consiguiente, consistía en una finalidad de la presente invención, el hecho de poder dotar, al arte especializado de la técnica, de un biomarcador, el cual pudiese detectarse, de una forma no invasiva, y el cual permitiera el poder diagnosticar un estilo de vida, el cual permitiera, de una forma factible, un envejecimiento sano.

60 Los presentes inventores se sorprendieron del hecho de constatar que, éstos, podían alcanzar el objetivo de la presente invención, mediante el contenido que se expone en las reivindicaciones independientes. Las reivindicaciones dependientes, desarrollan, de una forma adicional, la idea de la presente invención.

65 Mediante la utilización de una propuesta de procedimiento, combinado, holístico, de espectroscopia consistente en una resonancia magnética nuclear H^1 , (NMR – [de sus siglas en idioma inglés, correspondientes a nuclear magnetic resonance] -), en la orina, espectrometría de masas con objetivización de diana (MS – [de sus siglas en idioma

inglés, correspondientes a mass spectrometry] -), y propuestas de procedimientos en el suero, la invención, pudo detectar cambios en los perfiles metabólicos de un cohorte de envejecimiento, bien definido, que comprometía a las personas centenarias, a las personas mayores, y a los adultos jóvenes.

5 El grupo de envejecimiento seleccionado, representa una población homogénea de un área geográfica limitada de la Italia del Norte, la cual comprendía a adultos jóvenes (de 31 años de edad, de media), a personas mayores (de 70 años de edad), y a personas centenarias (de 100 años de edad). De entre estos tres grupos de edad, los centenarios, son un modelo bien aceptado de envejecimiento sano y de longevidad [véase, a dicho efecto, el trabajo de Sansoni P, et al., publicado en *Exp Gerontol.* 2008; 43: 61 - 65; el trabajo de Franceschi C, et al., publicado en *Mech Ageing Dev.* 2007; 128: 92 - 105; y el trabajo de Cevenini E, et al., publicado en *Expert Opin Biol Ther.* 2008; 8: 1393 - 1405] y su envejecimiento satisfactorio y exitoso adquirido, parece ser conducido por un equilibrio óptimo entre fuerzas proinflamatorias y antiinflamatorias [véase, a dicho efecto, el trabajo de Franceschi C, et al., publicado en *Mech Ageing Dev.* 2007; 128: 92 - 105].

15 Los inventores, se sorprendieron, al encontrar profundas diferencias entre los fenotipos de personas mayores y de personas centenarias, en donde, la dinámica, entre la interacción existente entre la microbiota intestinal y el huésped, y una respuesta inflamatoria de equilibrio neutral, son mucho más pronunciadas, en el fenotipo de longevidad.

20 Los inventores, han caracterizado, mediante la utilización de una metabolómica complementaria basada en NMR – MS y una propuesta de procedimiento lipidómico, en ambos, la orina y el suero, el fenotipo metabólico (metabotipo), del envejecimiento y de la longevidad.

25 Los inventores, han caracterizado, mediante la utilización de una metabolómica complementaria basada en NMR – MS y una propuesta de procedimiento lipidómico, en ambos, la orina y el suero, el fenotipo metabólico (metabotipo), del envejecimiento y de la longevidad.

30 Las personas centenarias, alcanzan unos extremos muy avanzados de la expectativa de vida humana, debido al hecho de una capacidad única de posponer las enfermedades y las discapacidades, en sus años posteriores de vida. Los parámetros clínicos clásicos, (los cuales se encuentran recopilados en la Tabla 1), muestran el hecho de que, las personas centenarias, tienen muy pocas incidencias de la resistencia a la insulina, éstas tienen unos valores antropométricos (BMI – [índice de masa corporal] -(BMI – [de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a Body Mass Index] -), metabólicos (colesterol), LDL-C, triglicéridos), los cuales son óptimos, para su edad. De una forma adicional, se procedió a medir su función cognitiva, mediante la utilización de un examen del estado mental mínimo MMSE – [de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a Mini-Mental State Examination] -), mostrando una reducida incidencia de disminución cognitiva severa.

40 De una forma específica, las personas centenarias, muestran un fenotipo metabólico único. La exploración de los perfiles metabólicos de la orina, revelaron el hecho de que, el fenotipo de la longevidad, se encuentra altamente influenciado mediante el microbioma intestinal, tal y como se demuestra mediante un mayor excreción de la fenilacetilglutamina (PAG), sulfato de p-cresol (PCS – [de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a p-cresol sulphate] -). Los presentes inventores, postulan el hecho consistente en que, la microbiota intestinal, cataboliza, de una forma extensiva, las proteínas y los aminoácidos aromáticos, incluyendo a la fenilalanina y a la tirosina, para formar la fenilacetilglutamina y el sulfato de p-cresol.

45 Un extensivo análisis metabolómico, con objetivación de dianas, basado en MS (espectrometría de masas), reveló importantes cambios biológicos, en el suero, los cuales se encontraban asociados con la longevidad y con el envejecimiento sano. De una forma adicional, entre los tres grupos de edad, el grupo de las personas centenarias, son un atractivo modelo de la longevidad, para llevar a cabo la caracterización, ya que éstos alcanzan unos extremos muy avanzados de la expectativa de vida humana, debido al hecho de una capacidad única de posponer las enfermedades y las discapacidades, en sus años posteriores de vida. Con la progresión de la edad, los inventores, pudieron observar una disminución en las lisofosfatidilcolinas (LPC 18 : 2; LPC 20 : 4), (LPC, de sus siglas en idioma inglés, correspondientes a lysophosphatidylcholine] -), encontrándose su concentración más reducida, en las personas centenarias. De una forma específica, la disminución en la LPC 18 : 0, parece ser específica, para las personas centenarias. Mientras que, es imperativo el hecho de tomar debida nota, en cuanto al hecho consistente en que, la LPC, tiene diferentes especies, basadas en la longitud de los ácidos grasos, y el grado de saturación, con diferentes propiedades físicas y biológicas son, de una forma general, proinflamatorios (véase, a dicho efecto, el trabajo de Aiyar N, et al., publicado en *Mol Cell Biochem.* 2007; 295: 113 - 120], con propiedades aterogénicas [véase, a dicho efecto, el trabajo de Schmitz G, et al., publicado en *Atherosclerosis.* 2010; 208 : 10 - 18], y sus incrementados niveles, se ven, de una forma frecuente, en pacientes afectado de diabetes del tipo 2 [véase, a dicho efecto, el trabajo de Rabini RA, et al., publicado en *Diabetes.* 1994; 43: 915 - 919].

60 Con respecto a las personas mayores, las personas centenarias, exhiben un cambio equilibrado en la concentración de diversas especies de acil-éter PC (PC = fosfatidilcolina – [de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a phosphatidylcholine], con unos contenidos de tres especies de PC-O, a saber, PC-O 34 : 3, PC 36 : 4, - PC-O 40 : 1, siendo significativamente más altas. Mientras que, el roll interpretativo fisiológico de los éter fosfolípidos, se entiende

de una forma menor, los plasmalógenos lo cuales contienen un eslabón de éter vinílico, el cual une la cadena alifática de sn-1 a la estructura de la cadena de glicerol, son las más abundantes éter-fosfatidilcolinas. Aquí, en este caso, la diferencia en los niveles de las especies de acil-éter fosfosfatidilcolina, puede ser debida a las diferencias en la manipulación del daño oxidativo.

5 Con la progresión de la edad, puede observarse un incremento de la esfingomielina (SM – [de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a sphingomyeline] -), con un remarcable incremento en la SM 24 : 1 y la SM 16 : 0. Sin embargo, no obstante, los inventores, observaron una disminución específica importante de la concentración de la SM 24 : 0 y de la SM-OH 22 : 1, en las personas centenarias. Las especies de SM (esfingomielina), son importantes
10 constituyentes de la membrana celular, los cuales se encuentran íntimamente asociados con el colesterol en construcción, el metabolismo, y el transporte, y los cuales se encuentran enriquecidos en las bolsas lipídicas. El rol interpretativo fisiológico de la SM (esfingomielina), no está todavía claro, ya que, los estudios previamente llevados a cabo, han mostrado la relación existente entre unos niveles elevados de la SM, y la aterosclerosis [véase, a dicho efecto, el trabajo de [Kummerow FA, et al., publicado en J Nutr Biochem. 2001; 12: 602 - 607], mientras que, otros
15 estudios, han mostrado el hecho de que, los niveles de esfingomielina en plasma, no se encontraban asociados con un riesgo incrementado de sufrir eventos cardiovasculares (CVD – [de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a cardiovascular disease] -). El documento correspondiente al arte anterior de la técnica especializada, de IVAN K. S. YAP ET AL, publicado en JOURNAL OF PROTEOME RESEARCH, (20101203), vol. 9, no. 12, páginas, 6647 - 6654, enseña que, múltiples metabolitos urinarios, los cuales discriminan las muestras de la población china del
20 norte y del sur, hace que éstos se encuentran en unos riesgos, los cuales son remarcablemente diferentes, de sufrir de eventos cardiovasculares (CVD). El documento de patente internacional WO2011 010 104, da a conocer la detección de la PAG (fenilacetilglutamina, como un co-metabolito microbiano de los mamíferos. El documento de patente estadounidense U S 2009 155 826, da a conocer biomarcadores, uno de los cuales, el cual se encuentra incluido en una lista de metabolitos, es la PAG. Finalmente, mientras que no existen cambios significativos para los
25 niveles de la mayoría de especies de fosfatidilcolina (PC-O), las personas centenarias, exhiben alteraciones en los niveles individuales de la PC-O 36 : 2.

Los cambios en los contenidos de la PC y de la PC-O), pueden tener un impacto en la actividad de la síntesis de los metabolitos del ácido araquidónico (prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos), los cuales son mediadores y reguladores clave de las reacciones fisiológicas del huésped. Los cuales se encuentran involucrados en el estrés oxidativo, a la apoptosis, y la modulación de las funciones inmunes e inflamatorias. De hecho, las personas centenarias, exhiben así mismo, también, una red equilibrada única, de los mediadores lípidos, con ambos tipos de propiedades, es decir, las propiedades antiinflamatorias y las propiedades proinflamatorias.

35 En comparación con las personas mayores, se encontró una concentración más alta de leucotrininas, la LTB-4 y la LTE-4. Las personas centenarias, mostraban un nivel más alto de ácido 15-hidroxi-eicosatetraenoico (15-HETE), un producto mayor de la enzima 15-lipoxigenasa (15-LOX). El 15-HETE, inhibe la formación de la lipoxigenasa, hace disminuir la producción de la leucotrina B4 – y del 12-HETE, y suprime las reacciones inmunes. En comparación con lo que sucede con las personas mayores, en las personas centenarias, se observa así mismo, también, un
40 incremento en la activación de la trayectoria del CYP (citocromo P450), con una generación incrementada de los EpETrE (ácidos epoxieicosatrienoicos) y una concentración disminuida de ácido 11,12-DiHETrE (ácido 11,12-dihidroxi-eicosatrienoico). Los EpETrE, son importantes componentes de muchos señalizadores intracelulares, en ambos tipos de tejidos, el tejido cardíaco y el tejido extracardíaco. Estudios llevados a cabo, han mostrado el hecho de que, los EpETrEs, exhiben efectos antiinflamatorios mediante la inhibición de la activación de genes mediatizada
45 mediante el factor nuclear (NF)-κB. De una forma adicional, éstos exhiben propiedades trombolíticas y angiogénicas, en el ámbito de la vascularización del corazón. Los EpETrEs, pueden metabolizarse, de una forma adicional, mediante epóxido hidrolasa soluble (sEH), para su conversión en los ácidos dihidroxi-eicosatrienoico (DiHETrE).

De una forma general, cuando los EpETrE, se metabolizan, convirtiéndose en DiHETrEs, mediante la sEH, entonces, sus propiedades biológicas, se convierten en menos pronunciada, y así, de este modo, la disminución de la concentración del DHET, puede revelar un efecto disminuido de la sEH, de su precursor 11,12-EpETrE.

Las personas centenarias, exhiben una remarcable disminución de la 9-HODE (ácido 9-hidroxi-octadecadienoico), molécula biológicamente activa, y un marcador de la peroxidación de los lípidos, y 9-oxo-HODE, un producto de oxidación, estable, del ácido linoleico, cuya generación, se incrementa, allí en donde se incrementa el estrés oxidativo. La mayor parte del ácido linoleico, existe en formas esterificadas, tales como las consistentes en PC y colesterol linoleato, siendo ambos, componentes principales de las LDL (lipoproteínas de baja densidad), y encontrándose expuestas, de una forma continua, a muchas clases de estrés oxidativo, para generar especies hidroxil e hidroxiperóxido.

Los niveles incrementados de los productos de oxidación de los lípidos, tales como el 9-oxo-HODE (ácido 9-oxo-hidroxiacetadecadienoico), se detectaron, previamente, en muestras de plasma, procedentes de pacientes los cuales sufrían de artritis reumatoidea y de aterosclerosis.

65 De una forma adicional, en comparación con las personas mayores, las personas centenarias, muestran una merma en ácido eicosapentanoico (EPA). Mientras que, el EPA, puede sintetizarse en los seres humanos, a partir del ácido

alfa-linoléico, o en una gran cantidad, directamente, a partir de aceite de pescado, o a partir de suplementos de aceite de pescado, el ácido eicosapentanoico (EPA), puede transformarse en n-3 eicosanoides, los cuales tienen diversas funciones. Una merma de EPA, podría exhibir un incremento de los n-3 eicosanoides.

5 Así, por consiguiente, la presente invención, se refiere, en parte, a un procedimiento para diagnosticar un estilo de vida, el cual permita retardar y / o evitar los desórdenes o trastornos inflamatorios crónicos, los cuales se encuentran relacionados con el envejecimiento, procedimiento éste, el cual comprende:

- la obtención de una muestra de orina, de un sujeto
- 10 - determinar el nivel de fenilacetilglutamina (PAG), en la muestra, y
- comparar el nivel de PAG del sujeto, con un valor de referencia predeterminado,

en donde, el valor de referencia predeterminado, se basa en un nivel medio de PAG en la orina, en una población de control, y

15 en donde, un elevado nivel de PAG en la orina, en la muestra, comparado con el valor de referencia predeterminado, indica el hecho de una probabilidad incrementada, de retardar y / o evitar los desórdenes o trastornos inflamatorios crónicos, los cuales se encuentran relacionados con el envejecimiento.

20 Este procedimiento, tiene por ejemplo la ventaja de no ser invasivo. Éste puede llevarse a cabo en una muestra de orina, fuera del cuerpo.

El nivel de fenilacetilglutamina (PAG), en la muestra, puede detectarse y cuantificarse, por mediación de cualesquiera medios los cuales son conocidos el arte especializado de la técnica. Así, por ejemplo, puede procederse a utilizar la espectrometría de masas, tal como, por ejemplo, ULPC – ESI – MS / MS (cromatografía líquida de ultra-rendimiento – electroproyección – tándem de espectrometría de masas – [de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a High-performance liquid chromatography / electrospray ionization tandem mass spectrometry), ó espectrometría de NMR (espectrometría de resonancia magnética nuclear), tal como, por ejemplo, la espectrometría de ¹H-NMR. Ambos procedimientos, se presentan, en los ejemplos proporcionados en este documento de solicitud de patente. Pueden también utilizarse, así mismo, otros procedimientos, tales como los consistentes en los procedimientos espectroscópicos, en los procedimientos cromatográficos, en las técnicas de marcaje, o en los procedimientos químicos cuantitativos.

Los valores de referencia predeterminados, se base en un nivel de PAG medio, en la orina, en una población de control. La población de control, puede ser un grupo de por lo menos 3 personas, de una forma preferible, de por lo menos 10 personas, y de una forma mayormente preferida, de por lo menos 50 personas, con unos antecedentes o perfil genético, con una edad y con un estatus medio de salud, los cuales sean similares.

La población de control, puede ser, así mismo, también, la misma persona, de tal forma que, el valor de referencia predeterminado, se obtiene previamente, del mismo sujeto. Esto permitirá una comparación directa del estilo de vida presente, con respecto al estilo de vida previo, por ejemplo, y las mejoras, pueden evaluarse directamente.

Los trastornos o desórdenes inflamatorios crónicos típicos, los cuales se encuentran relacionados con la edad, son bien conocidos, por parte de aquellas personas expertas en el arte especializado de la técnica. Un gran parte del fenotipo del envejecimiento, se explica mediante un desequilibrio entre las redes inflamatorias y las redes antiinflamatorias, los cual tiene como resultado el estatus de proinflamatorio crónico, de bajo grado, relacionado con la edad, véase, a dicho efecto, "inflamm-ageing", - Inflamación por envejecimiento" -(Candore G., et al., Biogerontology. Oct. 2010; 11 (5): 565 - 73).

Los trastornos o desórdenes inflamatorios relacionados con la edad, son la aterosclerosis, la artritis, la demencia, la diabetes del tipo 2, la osteoporosis, y las enfermedades cardiovasculares, por ejemplo. Así, por ejemplo, para estos trastornos o desórdenes, la inflamación, se ve como una posible base subyacente para las alteraciones moleculares, las cuales se encuentran vinculadas el envejecimiento, y con los procesos patológicos los cuales se encuentran relacionados con la edad (véase, a dicho efecto, el trabajo de Chung et al., publicado en ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING, - Antioxidantes y señalización redox -, Volumen 8, Números 3 y 4, 2006, 572 – 581).

La fenilacetilglutamina (PAG), puede utilizarse como el marcador único para los propósitos de la presente invención.

Mientras que, la fenilacetilglutamina (PAG), como marcador único, es efectiva como una herramienta para el procedimiento de diagnosis de la presente invención, la calidad y / o el poder predictivo, de la citada diagnosis, se mejorará, si la diagnosis, se basa en más de únicamente un marcador.

Así, de este modo, pueden utilizarse uno o más marcadores distintos, para la posibilidad de retardar y / o evitar los trastornos o desórdenes inflamatorios crónicos, relacionados con el envejecimiento, en combinación con la fenilacetilglutamina (PAG).

65

Los inventores, se sorprendieron, al ver que se podía utilizar así mismo, también, el sulfato de p-cresol (PCS), como marcador, para detectar la posibilidad de retardar y / o evitar los desórdenes o trastornos inflamatorios crónicos, relacionados con la edad.

5 Así, por consiguiente, el procedimiento de la presente invención, puede comprender, de una forma adicional, el proceder a determinar el nivel de sulfato de p-cresol (PCS), en la muestra, y comparar el nivel de PCS del sujeto, con un valor de referencia predeterminado. El valor de referencia predeterminado, puede estar basado en el nivel medio de PCS en la orina, en una muestra de control. Unos elevados niveles de PAG y / o de PCS en la orina, en la muestra, en comparación con los valores de referencia predeterminados, indican una probabilidad incrementada de retardar y / o de evitar los trastornos o desórdenes inflamatorios crónicos, relacionados con el envejecimiento.

10 Si ambos, los niveles de PCS y de PAG, en la orina, son elevados, ello es una fuerte indicación para una probabilidad incrementada de retardar y / o de evitar los trastornos o desórdenes inflamatorios crónicos, relacionados con el envejecimiento.

15 El procedimiento de la presente invención, puede utilizarse, de una forma adicional, o de una forma alternativa, para diagnosticar un estilo de vida, el cual permita un envejecimiento sano y / o más sano.

20 Un envejecimiento más sano, puede diagnosticarse procediendo a comparar el los niveles actuales de PAG y / o de PCS, con respecto a los valores de referencia predeterminados, los cuales se hayan obtenido previamente, del mismo sujeto. Así, de este modo, en este caso, el mismo sujeto, actuará como población de control, y las mejoras del estilo vida, pueden verse directamente, al mismo tiempo que eliminar las incertezas originadas por unas condiciones diferentes, para otras poblaciones promedio de control.

25 El procedimiento de la presente invención, puede también utilizarse, así mismo, para diagnosticar la longevidad; y o el cual permita para la longevidad. Esto tiene la ventaja consistente en que, las consecuencias de un estilo de vida más sano, pueda detectarse directamente, que pueda controlarse el mantenimiento de un estilo de vida sano, y que pueda corregirse un estilo de vida insano, antes de que acontezcan las primeras manifestaciones clínicas de un estilo de vida insano.

30 El procedimiento de la presente invención, puede utilizarse, de una forma alternativa y / o de una forma adicional, el diagnosticar interacciones más sanas, en la microflora intestinal del huésped. El microbioma intestinal, desempeña numerosas funciones bioquímicas importantes, para el huésped, y los desórdenes o trastornos del microbioma, se encuentran asociados con muchos de los diversos procesos de enfermedades en los seres humanos (véase, a dicho efecto, el trabajo de Kinross et al., publicado en Genome Medicine, - Medicina del genoma -, 2011, 3 : 14). Una interacción desfavorable micoflora intestinal – huésped, puede tener muchas manifestaciones clínicas, tales como las consistentes en estados de enfermedades sistémicos, tales como, por ejemplo, los consistentes en la obesidad y en la enfermedad cardiovascular; o la condiciones o trastornos intestinales, tales como, por ejemplo, la enfermedad inflamatoria del intestino.

40 Las interacciones microflora intestinal – huésped, pueden diagnosticarse en cualquier sujeto, pero, puede ser de una importancia particular, el controlar las interacciones microflora intestinal – huésped, sanas, en los adultos, o en las personas mayores.

45 Así, de este modo, las interacciones microflora intestinal – huésped, más sanas, deben ser diagnosticadas, en las personas mayores.

50 Un sujeto, se considera como siendo una “persona mayor”, si éste ha sobrepasado la primera mitad de su expectativa o esperanza de vida media, en su país de origen, de una forma preferible, si éste ha sobrepasado los primeros dos tercios de su expectativa o esperanza de vida media, en su país de origen, de una forma más preferible, si ésta ha sobrepasado sus primeros tres cuartos de su expectativa o esperanza de vida media, en su país de origen, y de una forma mayormente preferible, si éste ha sobrepasado los primeros cuatro quintos de su expectativa o esperanza de vida media, en su país de origen.

55 Así, por ejemplo, si el sujeto se trata de un ser humano, entonces, el procedimiento de la presente invención, puede llevarse a cabo en personas adultas, a una edad de por lo menos 45 años, a una edad de por lo menos 60 años, o a una edad de por lo menos 75 años.

60 El sujeto a ser sometido al test de ensayo, mediante el procedimiento de la presente invención, puede tratarse de un ser humano, o bien, éste puede tratarse de un animal, tratándose, de una forma particular, de por ejemplo un mamífero. Los animales típicos, pueden ser los animales de compañía o domésticos, tales como los consistentes en los gatos o en los perros, o bien, de animales de granja, por ejemplo.

65 El procedimiento de la presente invención, puede utilizarse, de una forma adicional o de una forma alternativa, para detectar las consecuencias de un cambio en el estilo de vida. Aquí, en este caso, puede ser ventajoso, si los niveles

de PAG y / o de PCS, se comparan con los niveles de PAG y / o de PCS, los cuales se hayan obtenido previamente, de procedencia del sujeto, antes del cambio en el estilo de vida, o bien, antes, durante el cambio en el estilo de vida.

5 Así, de este modo, el procedimiento de la presente invención, puede ser el consistente en diagnosticar un estilo de vida más sano, en donde, los valores de referencia predeterminados, se basan en los niveles de PAG y / o de PCS, los cuales se hayan obtenido de un sujeto, antes de un cambio en el estilo de vida.

10 El cambio, en el estilo de vida, puede ser cualquier cambio, tal como el consistente en un trabajo diferente, en dormir más, en menos alcohol, en más desafíos o problemas, en menos estrés, en fumar menos, en más deportes, un entorno medioambiental diferente del trabajo (un trabajo diferente) y / o del entorno medioambiental en el que se vive, por ejemplo.

El cambio en el estilo de vida, puede tratarse, así mismo, también, en un cambio en la dieta alimenticia.

15 El cambio en la dieta alimenticia, puede ser, por ejemplo, el uso de por lo menos un producto alimenticio, el cual no se había consumido previamente, o bien, el cual se había consumido en unas cantidades diferentes.

20 Como tal, el procedimiento de la presente invención, puede utilizarse para someter a test de ensayo la efectividad de un nuevo régimen nutritivo, de productos nutritivos y / o de medicamentos.

25 Los productos nutritivos, pueden ser, por ejemplo, los productos los cuales reivindican tener un efecto en un envejecimiento sano y / o que reivindican evitar los trastornos o desórdenes inflamatorios crónicos, los cuales se encuentran relacionados con la edad. (Nota, en este documento de solicitud de patente, se utilizará, de una forma indistinta, los términos producto(s) nutritivo(s) y producto(s) nutricional(es), así como también se utilizarán, de una forma indistinta, los términos productos alimenticio(s) y productos alimentario(s), y del mismo modo, se utilizarán de una forma indistinta, los términos alimenticia(s) o alimentaria(s), al referirse a fórmulas).

30 De una forma típica, los productos nutritivos, pueden ser los consistentes en los productos alimenticios, en las bebidas, en los productos alimenticios para animales de compañía o domésticos, en los suplementos alimenticios para animales de compañía o domésticos, en los productos nutraceuticos, en los aditivos alimenticios o en las fórmulas nutritivas.

35 El nivel de los biomarcadores, tales como los referentes al PAG y / o PCS, en la muestra, puede detectarse y cuantificarse, por mediación de cualesquiera medios conocidos en el arte especializado de la técnica. Así, por ejemplo, puede procederse a utilizar la espectroscopia de masas, tal como, por ejemplo, la ULPC – ESI - MS / MS, ó la espectroscopia por NMR, tal como, por ejemplo, la ¹H-NMR.

40 Pueden también utilizarse, así mismo, también, otros procedimientos tales como los consistentes en otros procedimientos de espectroscopia, otros procedimientos cromatográficos, procedimientos consistentes en técnicas de marcaje, o procedimientos químicos cuantitativos.

45 El procedimiento de la presente invención, comprende el proceder a comparar los niveles de PAG y / o de PCS, de un sujeto sometido a test de ensayo, con respecto a los valores de referencia predeterminados, los cuales puedan derivarse de los niveles de PAG y / o de PCS, en la orina, procedente de sujetos de control comparables.

50 Los sujetos sometidos a test de ensayo, en los cuales, los niveles de PAG y / o de PCS, se encuentren por encima del valor de control, o en un rango superior de valores de referencia, tienen una probabilidad incrementada para retardar y / o evitar los desórdenes o trastornos inflamatorios crónicos los cuales se encuentran relacionados con la edad.

De una forma adicional, la medida o extensión de la diferencia entre los niveles de PAG y / o de PCS, y los niveles de control, es también de utilidad, así mismo, también, para caracterizar la extensión o medida del riesgo, y así, de este modo, determinar el hecho de cuáles sujetos podrían beneficiarse de la mayor forma, de determinadas terapias.

55 El valor de referencia, se mide, de una forma preferible, mediante la utilización de la mismas unidades las cuales se han utilizado para caracterizar el nivel de PAG y / o de PCS, el cual se haya obtenido de procedencia del sujeto sometido al test de ensayo. Así, de este modo, si el nivel de referencia de la PAG y / o del PCS, se trata de un valor absoluto, tal como el consistente en las unidades de PAG y / o de PCS, por $\mu\text{mol} / \text{mol}$ de creatinina, entonces, el valor de referencia, se basa así mismo, también, en unidades de PAG y / o de PCS, por $\mu\text{mol} / \text{mol}$ de creatinina, en individuos, en la población general o en una población de sujetos de control seleccionada.

60 De una forma adicional, el valor de referencia, puede ser un valor individual de corte, tal como el consistente en la mediana o la media. Los valores de referencia de PAG y / o de PCS, se obtienen en muestras de orina, tales como los niveles medios, los niveles de la media, o los niveles de "corte", pueden establecerse procediendo a someter a test de ensayo una amplia muestra de individuos, en la población genera de una población seleccionada, y utilizando un modelo estadístico, tal como el consistente en el procedimiento del valor predictivo para seleccionar un

criterio positivo o curva característica del operador destinatario o beneficiario, el cual define una especificidad óptima (tasa más alta de verdaderos negativos), y una óptima sensibilidad (tasa más alta de verdaderos positivos), según se describe por parte de Knapp, R. G., y Miller, M. C. (1992). *Clinical Epidemiology and Biostatistics*, - Epidemiología y bioestadística -. William y Wilkins, Harual Publishing Co. Malvern, Pa.

5 Las personas expertas en el arte especializado de la técnica, saben cómo asignar valores de referencia correctos, ya que éstos variarán con el género, con la raza, con la herencia genérica, con el estado de salud, o con la edad, por ejemplo.

10 Así, por ejemplo, el valor de referencia predeterminado, puede ser el de 63 $\mu\text{mol} / \text{mmol}$ de creatina para el PCS, en la orina, y el de 81 $\mu\text{mol} / \text{mmol}$ de creatina, para el PAG, en la orina. Unos valores mayores, son indicativos para una probabilidad incrementada de retardar y / o evitar los desórdenes o trastornos inflamatorios crónicos, los cuales se encuentran relacionados con la edad.

15 Cuantos más biomarcadores se evalúan, más poder predictivo tendrá el procedimiento de diagnóstico de la presente invención.

Los presentes inventores, se sorprendieron al encontrar biomarcadores adicionales, en el suero, para diagnosticar un estilo de vida, el cual permita retardar y / o evitar los desórdenes o trastornos inflamatorios crónicos, los cuales se encuentran relacionados con la edad.

20 Como tales, los inventores, han identificado el hecho de que, unas concentraciones incrementadas en suero, de

25 1-O-alkil-2-acilglicerofosfolina (PC-O) 32 : 1,
1-O-alkil-2-acilglicerofosfolina (PC-O) 34 : 1,
Ácido 15-hidroxi-eicosatetraenóico (15-HpETE),
Leucotrieno E-4(LTE4),
Leucotrieno B-4(LTB4), y / o
30 Ácido 8,9-epoxieicosatrienóico (8,9 EpETre)

30 permiten diagnosticar un estilo de vida, el cual permita retardar y / o evitar los desórdenes o trastornos inflamatorios crónicos, los cuales se encuentran relacionados con la edad, mientras que, unas concentraciones disminuidas en suero de

35 Hidroxi-esfingomielina (SM-OH) 22 : 1;
Lisofosfatidilcolinas (LPC) 18 : 0;
Sfingomielina (SM) 24 : 0,
1-O-alkil-2-acilglicerofosfolina (PC-O) 34 : 3,
1-O-alkil-2-acilglicerofosfolina (PC-O) 36 : 4,
40 1-O-alkil-2-acilglicerofosfolina (PC-O) 40 : 1,
Fosfatidilcolina (PC) 36 : 2,
Ácido hidroxi-octadecadienóico (9-HODE),
Ácido 9-oxo-octadecadienóico (9-oxo-HODE), y / o
45 Ácido 11,12-epoxieicosatrienóico (11,12-DiHETre)

45 permiten diagnosticar un estilo de vida, el cual permita retardar y / o evitar los desórdenes o trastornos inflamatorios crónicos, los cuales se encuentran relacionados con la edad.

50 Las especies de lípidos individuales, se anotaron de la siguiente forma:

(clase de lípido) [número total de átomos de carbono] : [número total de enlaces dobles]. Así, por ejemplo, PC 34 : 1, refleja una especie de fosfatidilcolina, la cual comprende 34 átomos de carbono y en enlace doble.

55 Así, por consiguiente, en el procedimiento de la presente invención, la precisión de la diagnosis, puede incrementarse, procediendo a evaluar, así mismo, también, el hecho de si, la concentración de uno o más de los siguientes biomarcadores, PC-O 32 : 1, PC-O 34 : 1, 15-HpETE, LTE4, LTB4, 8,9 EpETre, se encuentra incrementado en el suero, y / o si, la concentración de uno o más de los siguientes biomarcadores, SM-OH 22 : 1, LPC 18 : 0, SM 24 : 0, PC-O 34 : 3, PC-O 36 : 4, PC-O 40 : 1, PC 36 : 2, 9-HODE, 9-oxo-HODE, 11,12-DiHETre, se encuentra disminuido en el suero, en comparación con un valor de referencia previamente obtenido.

60 La presente invención, se extiende así mismo, también, al descubrimiento de un nuevo biomarcador, el cual puede utilizarse en la diagnosis de un estilo de vida, el cual permita retardar y / o evitar los desórdenes o trastornos inflamatorios crónicos, los cuales se encuentran relacionados con la edad.

Así, por consiguiente, la presente invención, comprende un biomarcador para la diagnosis de un estilo de vida, el cual permita retardar y / o evitar los desórdenes o trastornos inflamatorios crónicos, los cuales se encuentran relacionados con la edad, en donde, el biomarcador en cuestión, se trata de la fenilacetilglutamina (PAG).

5 Este biomarcador, puede detectarse en la orina, lo cual tiene la ventaja consistente en que, las muestras a someter a test de ensay, puede obtenerse de una forma no invasiva.

10 Aquellas personas expertas s en el arte especializado de la técnica, entenderán así mismo, también, el hecho consistente en que, mientras que los biomarcadores y su aplicación en un procedimiento de diagnóstico, se describe aquí, en este documento de solicitud de patente, como

- diagnosticar un estilo de vida, el cual permita retardar y / o evitar los desórdenes o trastornos inflamatorios crónicos, los cuales se encuentran relacionados con la edad.
- diagnosticar un estilo de vida, el cual permita un envejecimiento sano,
- 15 - diagnosticar la longevidad, y / o,
- diagnosticar interacciones microflora intestinal – huésped, más sanas,

pudiéndose así mismo aplicar, también, de una forma igualmente apropiada, en un procedimiento para

- 20 - diagnosticar un estilo de vida, el cual favorezca el desarrollo de desórdenes o trastornos inflamatorios crónicos, los cuales se encuentran relacionados con la edad.
- diagnosticar un estilo de vida, el cual, probablemente, evite un envejecimiento sano,
- diagnosticar un riesgo para una esperanza de vida más corta, y / o,
- 25 - diagnosticar interacciones microflora intestinal – huésped, no sanas (malsanas).

25 En otros aspectos adicionales, la presente invención, proporciona procedimientos para:

- retardar, evitar y / o prevenir el desarrollo de los desórdenes o trastornos inflamatorios crónicos, los cuales se encuentran relacionados con la edad,
- 30 - fomentar un envejecimiento sano,
- fomentar la longevidad,
- reducir el riesgo de una esperanza de vida más corta,
- fomentar unas interacciones microflora intestinal –huésped, las cuales sean más sanas, y / o
- 35 - prevenir las interacciones microflora intestinal – huésped, las cuales no sean sanas (las cuales sean malsanas).

De una forma típica, tales tipos de procedimientos comprenden una etapa de llevar a cabo un procedimiento de diagnóstico, de la forma la cual se describe aquí, en este documento de solicitud de patente, en un sujeto; y modificar el estilo de vida del sujeto en cuestión, en base a un resultado de éste. Así, por ejemplo, el procedimiento, puede comprender el proceder a modificar un estilo de vida del sujeto, si el resultado de la etapa diagnosticada, indica:

- 40 - una probabilidad o riesgo incrementado del desarrollo de desórdenes o trastornos inflamatorios crónicos, los cuales se encuentran relacionados con la edad,
- un estilo de vida, el cual, de una forma probable, evitará un envejecimiento sano,
- 45 - un riesgo de una esperanza de vida más corta,
- unas interacciones microflora intestinal –huésped, las cuales no sean sanas,

en el sujeto.

50 La modificación en el estilo de vida, en el sujeto, puede ser la consistente en cualquier cambio, de la forma la cual se describe aquí, en este documento de solicitud de patente, tal como, por ejemplo, el consistente en un cambio en la dieta, en un trabajo diferente, en dormir más, en menos alcohol, en más desafíos o problemas, en menos estrés, en fumar menos, en más deportes, en un entorno medioambiental diferente del trabajo (un trabajo diferente) y / o del entorno medioambiental en el que se vive, por ejemplo.

55 De una forma preferible, el cambio, es el uso de lo menos un producto nutritivo, el cual no se hubiera consumido previamente, o el cual se hubiera consumido en unas cantidades diferentes, tal como, por ejemplo, un producto nutritivo, el cual tenga un efecto en un envejecimiento sano y / o en evitar o prevenir desórdenes o trastornos inflamatorios crónicos, los cuales se encuentran relacionados con la edad (productos nutritivos éstos, los cuales incluyen a los productos alimenticios, a las bebidas, a los productos alimenticios para animales de compañía o domésticos, a los suplementos alimenticios para animales de compañía o domésticos, a los productos nutracéuticos, a los aditivos alimenticios o a las fórmulas nutritivas.

60 La modificación del estilo de vida, en el sujeto, incluye así mismo, también, el indicar una necesidad para el sujeto, de que éste cambie su estilo de vida, tal como, por ejemplo, prescribiendo, fomentando y / o proponiendo un cambio del estilo de vida, de la forma la cual se ha descrito aquí, en este documento de solicitud de patente, en el sujeto en

cuestión. Así, por ejemplo, el procedimiento, puede comprender una etapa consistente en administrar o en proporcionar por lo menos un producto nutritivo, de la forma la cual se ha descrito aquí, en este documento de solicitud de patente, al sujeto.

5 Aquellas personas expertas en el arte especializado de la técnica, entenderán el hecho consistente en que, éstos, pueden combinar libremente la totalidad de los rasgos distintivos o características de la presente invención, las cuales se describen aquí, en este documento de solicitud de patente, sin salirse del ámbito de la presente invención, de la forma que ésta se revela. De una forma particular, los rasgos característicos y características, los cuales se describen para el procedimiento de la presente invención, pueden aplicarse al biomarcador de la presente invención, y viceversa.

Otras ventajas y rasgos distintivos o características de la presente invención, resultan evidentes, a raíz de las tablas, de los ejemplos y de las figuras, los cuales se facilitan a continuación, en este documento de solicitud de patente.

15 La tabla 1, muestra las características clínicas, demográficas, del grupo de envejecimiento elegido. Los valores expuestos en la tabla, se representan como valores medios ($\bar{x} \pm SD$) (SD = desviación estándar (DE) – [de sus siglas en idioma inglés, correspondientes a standard deviation] -), con el rango en paréntesis. BMI = índice de masa corporal (de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a body mass index), ²Diabetes mellitus: historia de la diabetes, glucosa en plasma en ayunas ≥ 126 mg / dl, ³HDL = lipoproteína de alta densidad (HDL, de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a high density lipoprotein), ⁴LDL = lipoproteína de baja densidad (LDL, de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a low density lipoprotein), ⁵MMSE = medición de la función cognitiva, mediante la utilización de un minexamen del estado mental (MMSE, de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a Mini-Mental State Examination (MMSE)). La puntuación de la calificación utilizada en el análisis, se corrigió mediante la edad y mediante los años de educación, para las personas mayores. El MMSE, para un deterioro cognitivo de las personas mayores, se clasificó como siendo severo (con una puntuación de 0 – 17), como siendo suave (con una puntuación de 18 – 23), o como no encontrándose presente (con una puntuación de 24 – 30). El MMSE para personas centenarias, correspondiente a un valor de ≥ 20 , se clasificó como correspondiendo a la ausencia de un deterioro cognitivo grave; un MMSE para valores de < 12 , se clasificó como correspondiendo a la presencia de un deterioro cognitivo grave. ⁶CRP = Proteína C reactiva (CRP, de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a C-reactive protein). ⁷A-SAA = proteínas amiloides A, séricas (SAA) – (SAA, de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a Serum amyloid).

La tabla 2, muestra el resumen de las características y del modelo para el modelo discriminatorio entre los grupos de edad seleccionados.

La tabla 3, muestra todos los metabolitos significativamente seleccionado en la orina, para los 3 grupos de edad, seleccionados mediante ¹H-NMR. Con objeto de obtener una información cuantitativa, se integraron la áreas pico en el espectro original, para estos tres metabolitos, y se confirmaron la diferencias con significancia estadística, mediante la utilización de un test de ensayo de suma de rangos, de Wilcoxon (Wilcoxon Rank Sum test), y éstas se marcaron de la siguiente forma: *p < 0,05., **p < 0,01, ***p < 0,001.

La tabla 4, muestra la totalidad de los metabolitos significativamente regulados, en el suero sanguíneo, para los 3 grupos de edad, detectados mediante LC-MS. Los valores, se expresan como valores medios \pm SD, y éstos se marcaron de la siguiente forma: *p < 0,05., **p < 0,01, ***p < 0,001.

La tabla 5, muestra los niveles de concentración (mg / 100 μ l) de marcadores inflamatorias en el suero, para los 3 grupos de edad, los cuales se analizaron mediante UPL – ESI – MS / MS, y éstos se marcaron de la siguiente forma: *p < 0,05., **p < 0,01, ***p < 0,001.

La figura 1, representa unos perfiles típicos a 600 Mhz, del grupo de edad, los cuales exhiben picos los cuales resultan de las moléculas principales de bajo peso molecular, tales como las consistentes en los cuerpos de cetona, en los ácidos orgánicos, en los aminoácidos, así como los metabolitos los cuales se derivan de ambos, el metabolismo de los mamíferos y del intestino microbiano (PAG y PCS).

La figura 2, muestra la valoración del OPLS-DA (Análisis discriminante de proyecciones de estructuras latentes (OPLS-DA, del inglés Orthogonal Projections to Latent Structures Discriminant Analysis), de un espectro de ¹H-NMR, urinario, de personas mayores y de personas centenarias.

La figura 3, muestra un gráfico de un espectro de coeficientes derivado de un espectro de ¹H-NMR, urinario, de personas mayores y de personas centenarias.

La figura 4, muestra gráficos de recuadros, en una información semicuantitativa, derivada de áreas pico (área bajo la curva), en el espectro original, para la PAG y el PCS. Las significancias estadísticas, se confirmaron mediante un test de ensayo de la suma de rangos de Wilcoxon.

65

Las figuras 5 a, 5 b, muestran diferencias en los perfiles lipídicos (concentraciones medias de lípidos), entre los tres puntos de tiempo de envejecimiento, mediante la medición con una análisis metabolómico por UPLC – ESI – MS / MS, con objetivización de dianas. Los gráficos de recuadros, representan los cambios, desde la derecha hasta la izquierda, los cuales denotan personas centenarias, personas mayores, y personas jóvenes. La concentración, se expresa en μM . Los valores medios, $+ / - \text{SD}$, procedentes de la MS objetivizada como diana, en los tres grupos de edad, y la significancia estadística, se confirmaron mediante la utilización de un test de ensayo de la suma de rangos de Wilcoxon, y éstos se encuentran recopilados en la tabla 4. Únicamente se muestran las diferencias significativas, y éstas se valoraron mediante un test de ensayo U de Mann-Whitney.

La figura 6, muestra las diferencias entre los perfiles lipídicos (los resultados obtenidos, se expresan en $\text{ng} / 100 \mu\text{l}$, y éstos representan las concentraciones medias de lípidos), entre los puntos de tiempo de envejecimiento, mediante la medición con una análisis metabolómico por UPLC – ESI – MS / MS, con objetivización de dianas. Los gráficos de recuadros, representan los cambios, desde la derecha hasta la izquierda, los cuales denotan personas centenarias, personas mayores, y personas jóvenes. Los valores medios, $+ / - \text{SD}$, procedentes de la MS objetivizada como diana, en los tres grupos de edad, y la significancia estadística, se confirmaron mediante la utilización de un test de ensayo de la suma de rangos de Wilcoxon, y éstos se encuentran recopilados en la tabla 5. Únicamente se muestran las diferencias significativas, y éstas se valoraron mediante un test de ensayo U de Mann-Whitney.

Ejemplos

Sujetos y grupos del estudio

Cada uno de los individuos, y sus familiares, proporcionaron un consentimiento con conocimiento de causa, para llevar a cabo la realización del estudio. En total, para la realización de este estudio, se inscribieron 541 sujetos, los cuales pertenecían a diferentes grupos de edad, en la Italia del Norte, que incluía a las regiones de Bolonia, de Florencia, de Parma y de Milán. El grupo de personas centenarias, se encontraba compuesto por 156 individuos (125 mujeres y 31 hombres), el grupo de personas mayores, se encontraba compuesto de 363 individuos (205 mujeres y 158 hombres), y el grupo de personas jóvenes, se encontraba compuesto por 22 individuos (10 mujeres y 12 hombres).

El protocolo del estudio, fue aprobado por parte del comité de ética del Hospital Universitario de Sant'Orsola – Malpighi (Bolonia – Italia). Las muestras biológicas resultantes (de suero y de orina), se almacenaron, a una temperatura de $- 80 \text{ }^\circ\text{C}$, hasta la realización del análisis metabólico.

Química clínica

Se procedió a la medición de las concentraciones de colesterol correspondiente a las lipoproteínas de alta densidad (HDL, y de triglicéridos, mediante la utilización de respectivos equipos, a modo de “kits”, procedentes de la firma Roche Diagnostics, y la utilización de un autoanalizador (de procedencia de la firma Roche Diagnostics Hitachi 917 – Hitachi Ltd., Toquio, Japón). Las concentraciones de colesterol correspondiente a las lipoproteínas de baja densidad (LDL), se calcularon mediante la utilización la fórmula de Friedewald (Friedewald WT, et al., Clinical Chemistry, - Química Clínica -, 18 (6): 499 - 502). Las citocinas, incluyendo al interferón gama del ratón (IFN γ), a la interleucina 1 beta (IL - 1 β), a la interleucina 6 (IL - 6), a la interleucina 10 (IL - 10), a la interleucina 12 p70 (IL - 12 p70), a la quimiocina derivada de los queratinocitos (KC), y al factor de necrosis tumoral (TNF), mediante la utilización de un equipo multiplex, proinflamatorio, del ratón, a modo de “kit”, del tipo “mouse pro-inflammatory multiplex kit” (Meso Scale Discoveries, Gaithersburg, Maryland, USA). El test de ensayo, se llevó a cabo en concordancia con las instrucciones del manual del fabricante. Se procedió también a la medición de la proteína C-reactiva (CPR), de alta sensibilidad, mediante la utilización de un test de ensayo ELISA del tipo “sándwich”, sensible, mediante CRP antihumana del ratón, y CRP antihumana del ratón, conjugada con peroxidasa.

La preparación de las muestras, para la espectroscopia de ^1H NMR, se realizó del siguiente modo. Se procedió a secar muestras de orina, procedentes de los tres grupos de envejecimiento, en un aparato de secado por congelación o liofilización (de procedencia de la firma Freeze – Dryer Fisher Scientific) y se procedió a un ajuste del pH, a un valor de 6,8, mediante la utilización de una solución de 500 μl de una solución tampón fosfato (KH_2PO_4 , a una concentración final de 0,2 M), con un contenido de 1 nM de 2,2,3,3-tetrafluoro-1-propionato de 3-trimetilsililo (TSP), y éstas se introdujeron en tubos de NMR, de 5 mm. Los perfiles metabólicos, se midieron en un espectrómetro del tipo “Bruker Avance III 600 MHz), el cual se encontraba equipado con una sonda criogénica, de 5 mm, inversa, a 300 K (de procedencia de la firma Bruker Biospin, Rheinstetten). Para cada una de las muestras de la orina, se registraron los espectros de ^1H NMR, mediante la utilización de secuencias de impulsos, incluyendo una detección de ^1H , del tipo estándar, con supresión de agua. Se obtuvieron espectros estándar, con una dilación de relajación de 4 s, y tiempo de mezclado, t_m , de 100 ms. Los espectros de ^1H NMR, se procesaron, mediante la utilización de un paquete de software informático, del tipo “Topspin software package (versión 2.1; Bruker Biospin, Rheinstetten, Alemania), y éstos se referenciaron al estándar (TPS), a $\delta = 0,0$. La asignación pico a los metabolitos específicos, se consiguió mediante la utilización de una biblioteca interna de compuestos, y la literatura especializada, y ésta se confirmó mediante una espectroscopia de NMR bi-dimensional (JRES, TOCSY, HSQC, HMBC), en muestras

seleccionadas. Para la realización del análisis estadístico, se procedió a convertir la totalidad de los espectros de NMR, en puntos de datos de 12 K, en el intervalo de δ de 0,4 – 10,0, y éstos se importaron a un sistema de software informático del tipo “MATLAB software (versión 7.11.0 (R2010b); The MathWorks Inc., Natick, MA), excluyendo el residuo de agua (δ de agua = 4.7120 – 4,84). Los espectros, se normalizaron a la suma total de todas las intensidades, en el ámbito del intervalo especificado.

Preparación de las muestras para el análisis mediante un equipo, a modo de “kit”, de la clase “Biocrates Life Sciences AbsoluteIDQ® ki

Se procedió a utilizar el equipo, a modo de “kit”, de la clase “Biocrates Life Sciences AbsoluteIDQ™”, para las muestras de suero procedentes del grupo de envejecimiento seleccionado, de la forma la cual se ha publicado previamente (Römisch-Margl, W., C. Prehn, R. Bogumil, C. Röhring, K. Suhre, J. Adamski, Procedure for tissue sample preparation and metabolite extraction for high-throughput targeted metabolomics, - Procedimiento para la preparación de muestras y la extracción de metabolitos, para metabolómica de alto rendimiento, con objetivización de dianas. Metabolomics, 2011. Publicado en primer lugar en línea (en internet). La preparación de las placas y la aplicación y la extracción de las muestras, se llevaron a cabo en concordancia con las instrucciones del fabricante. Se procedió a cargar un volumen final de 10 μ l de suero, en la placa de 96 pozos proporcionada, la cual contenía modelos estándar internos isotópicamente marcados. La cromatografía líquida, se llevó a cabo en un sistema de cromatografía líquida a presión ultraalta, del tipo “Dionex Ultimate 3000 ultra high pressure liquid chromatography (JDPLC) (Dionex AG, Olten, Suiza), acoplado a un espectrómetro de masas del tipo “3200 Q TRAP mass spectrometer (AB Sciex; Foster City, CA, USA), provisto de una fuente de iones del tipo TurboV, la cual operaba en modo de ionización por electrospray (ESI – [de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a electrospray ionisation (ESI)]. Se procedió a inyectar extractos de las muestras (20 μ l), dos veces (en modos de ESI positivo y negativo), vía una infusión directa, mediante la utilización de un gradiente del intervalo de caudal de flujo de 0 – 2,4 minutos: 30 μ l / min, 2,4 – 2,8 min: 200 μ l / min, 2,9 – 3 min: 30 μ l / min. La fuente de MS. Los parámetros de la fuente de MS, se ajustaron a unos valores de: temperatura de desolvatación (TEM): 200 °C; alto voltaje: - 4500 V (ESI -), 5500 B (ESI +), gases cortina (CUR) y de nebulización (GS 1 y GS 2): nitrógeno 20, 40, y 50 psi; respectivamente, presión del gas de colisión nitrógeno: 5 mTorr. La obtención de MS / MS, se llevó a cabo en modo de control de seguimiento programado de la reacción (SRM – de sus siglas en idioma inglés, correspondientes a scheduled reaction monitoring), con unos valores potenciales de desagrupación optimizados, para los 163 metabolitos cribados y evaluados en el ensayo. Los registros de datos brutos (recopilados mediante el sistema de software informático “Analyst software”, versión 1.5.1; AB Sciex, Foster City, CA, USA), se importaron al software informático proporcionado, MetIQ, para calcular las concentraciones de metabolitos. La lista de la totalidad de metabolitos detectables, se encuentra comercialmente disponible en el mercado, de procedencia de la firma Biocrates Life Science, Austria (<http://biocrates.com>). La preparación de las muestras y la cuantificación de marcadores de inflamación se llevó a cabo mediante UPLC – ESI – MS / MS, mediante la utilización de la técnica de dilución de isótopos.

En base a un trabajo previamente publicado, (Naga, et al., PROG. LIPID RESEARCH, 2001, 40 199 – 299), se procedió a desarrollar, en casa, un procedimiento para medir un panel de 63 marcadores inflamatorios. Se procedió a homogenizar 300 μ l de muestra de suero, a partir de material biológico disponible, restante, procedente de los tres grupos de edad (n = 15 personas centenarias, n = 30 personas mayores, n = 50 personas adultas jóvenes), con 10 μ l de tampón BHT (hidroxitolueno butilado; 79,2 mg / ml PBS), mediante la utilización del sistema FastPrep® 24. Para cada muestra, se procedió a mezclar un total de 50 μ l de suero, con 5 μ l de la solución estándar interna (0,1 ng / μ l). Se procedió, a continuación, a acidificar la mezcla, mediante la adición de 15 μ l de ácido cítrico (1 N). Con objeto de precipitar las proteínas, se procedió a añadir un volumen de 550 μ l de metanol / etanol (1 : 1, v / v) y, las muestras, se mezclaron, durante un transcurso de tiempo de 15 minutos, a una temperatura de 4 °C, antes de proceder a llevar a cabo su centrifugación (3500 r. p. m., 10 minutos, 4 °C). La fase orgánica, se evaporó hasta secado, bajo un flujo constante de nitrógeno, y los residuos, se solubilizaron mediante 80 μ l de agua, seguido de la adición de 20 μ l de acetonitrilo, antes de centrifugarse, a una velocidad angular de 3500 r. p. m., durante un transcurso de tiempo de 1 minuto, a una temperatura de 4 °C. El sobrenadante, se transfirió a viales de LC – MS, antes de proceder a su análisis. Los análisis, se llevaron a cabo mediante cromatografía líquida, acoplada a espectrometría de masas tándem (LC – MS / MS). La LC, se llevó a cabo en sistema de cromatografía líquida, a ultra-presión (UPLC), del tipo Dionex Ultimate 3000 (Dionex AG, Olten, Suiza). La detección mediante MS, se realizó en un espectrómetro de masas del tipo “5500 Q TRAP mass spectrometer (AB Sciex; Foster City, CA, USA), operando en modo ESI. La separación cromatográfica de gradiente, se llevó a cabo en una columna del tipo “Acquity BHE C18 column” (2,1 x 150 mm, 1,7 μ l; Waters, Milford, USA). El volumen de inyección, era de 5 μ l y, la columna, se mantuvo a una temperatura de 50 °C. La fase móvil, consistía en agua, la cual contenía ácido acético al 1 % (eluyente A) y acetonitrilo (eluyente B), a un caudal de flujo constante, ajustado a un valor de 450 μ l / minuto. El gradiente de elución, se inició con un 20 % de B, mediante un incremento lineal a 50 % de B, a los 6 minutos, de un 50 % a un 95 % de B, a los 13 minutos, y se mantuvo, durante un transcurso de tiempo de 3 minutos, a un 95 % de B, antes de volver a un 20 % de B, a los 16,1 minutos, y un reequilibrado de la columna, durante un transcurso de tiempo adicional de 11 minutos. Los analitos, se controlaron en el modo de control de reacción seleccionada (SRM programada), proporcionado en el software informático analista, del tipo “Analyst software (versión 1.5.1; AB Sciex, Foster City, CA, USA). La totalidad de las transiciones de masa y de los parámetros de las fuentes de MS, se proporcionan en datos suplementarios. El tiempo de la ventana de detección del SRM, se ajustó a un valor de 120

segundos, con un tiempo de exploración de rastreo diana de 0,5 segundos. Como gas de cortina y como gas de desolvatación, se utilizó nitrógeno, a la presión respectiva de CUR: 20, GS1: 70, GS2: 20 (unidad arbitraria). La temperatura de la fuente del bloque, se mantuvo a un valor de 600 °C, con los voltajes respectivos: ISV: - 4000 V, EP: -10 V, CXP: - 5 V. Se procedió a realizar una curva de calibración de 15 puntos, previamente al análisis de muestras, mediante la medición de diferentes diluciones de la solución estándar (0 – 10 ng). El procesamiento de datos, se llevó a cabo en un software informático analista, del tipo “Analyst software (versión 1.5.1; AB Sciex, Foster City, CA, USA). Se procedió a calcular el factor de relación de áreas pico de cada analito, con respecto a su correspondiente marcador estándar o subrogado. Es de utilidad el mencionar el hecho de que, los valores de PGJ2, PGF2a, PGE2, PGE1, 15-oxo-HETE, 15-deoxy- Δ 12,14-PGJ2, 6-keto PGF1a, y 5-oxo-EETE, se encontraban por debajo de su límite de detección, en la muestras de suero, y así, por lo tanto, éstos no se tomaron en consideración para los análisis estadísticos.

Análisis de datos multivariantes (MVA)

Se procedió a llevar a cabo un análisis de datos multivariantes (MVA), en diversos marcos de software informático. Así, de este modo, se realizaron etapas de importaciones de datos y etapas de pre-procesado, para ambos tipos de datos, los datos de ^1H NMR, y los datos de MS de objetivación de dianas, mediante la utilización rutinas “en casa”, las cuales estaban redactadas en MATLAB (versión 7.11.0, The Mathworks Inc., Natick, MA, USA). En la NMR, se realizaron modelos de análisis de OPLS-DA, mediante la utilización del sistema de software informático SIMCA-P+ (versión 12.0, Umetrics AB, Umea, Suecia). Los datos de MS objetivados como diana, se analizaron mediante el paquete “randomForest” (sistema de árboles aleatorios) (A. Liaw y M. Wiener (2002). Classification and Regression by randomForest, - Clasificación y regresión mediante el sistema de árboles aleatorios. R. News 2 (3), 18- -22), funcionando en el entorno o marco de R (R Development Core Team, - Equipo central del desarrollo del sistema de programación y marco de lenguaje R -). R: un lenguaje y marco para la computación estadística. R Foundation for Statistical Computing, - Fundación de programación y marco de lenguaje R, para computación estadística -, (2011). Viena, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>). Finalmente, se procedió a llevar a cabo, así mismo, también, tests de ensayo de significancia de los datos univariantes, para la confirmación, en características R-Clinicas del grupo de envejecimiento.

Las características físicas y bioquímicas del grupo de edad, se muestran en la Tabla 1: BMI ($p < 0,001$), evaluación de modelo homeostático (HOMA) ($p < 0,001$) (HOMA, de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a homeostatic model assessment), colesterol total ($p = 0,001$), triglicéridos ($p = 0,004$), HDL ($p = 0,001$), y LDL ($p = 0,04$) son inferiores en las personas centenarias, mientras que, las proteínas amiloides A (A-SAA), en suero, ($p < 0,001$), y las proteínas C-reactivas, (CRP) ($p < 0,001$) son mayores en las personas centenarias, en comparación con las personas mayores. Las personas mayores, exhiben unos mayores valores de BMI (índice de masa corporal) ($p < 0,001$), de colesterol total ($p < 0,001$), de triglicéridos ($p < 0,001$), de LDL ($p < 0,05$), y de CRP ($p < 0,001$), en comparación con los individuos jóvenes.

Los datos de la ^1H -NMR a 600 MHz de la orina, de las muestras disponibles, de los tres grupos de envejecimiento (92 personas centenarias, 283 personas mayores y 21 personas adultas jóvenes), se utilizaron para el establecimiento de los perfiles metabólicos. Con objeto de explorar los cambios y las diferencia metabólicas inducidas por la edad, entre los tres grupos de edad, y minimizar cualesquiera efectos de la variabilidad de metabolitos no relevantes, se procedió a aplicar un análisis quimiométrico supervisado de los perfiles establecidos de la orina, mediante NMR, en la totalidad de los datos establecidos, procedentes de los tres puntos temporales. Se procedió a llevar a cabo una proyección ortogonal en el análisis discriminante de las estructuras latentes (OPLS – DA), en datos a escala de la variancia de la unidad (Figura 2). El modelo discriminatorio entre los grupos de las personas centenarias y de las personas adultas jóvenes, proporcionaron un error de la validación del clasificador (expresado como el área bajo la curva ROC (característica operativa del receptor – [de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a Receiver Operating Characteristic] -), AuROC (área bajo la curva ROC - [de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a área bajo la curva ROC] -) (Fawcett, T., An introduction to ROC analysis, - Una introducción al análisis ROC, Pattern Recogn. Lett., 2006, 27: 861 - 874), correspondiente a un valor de 1,0, mediante la utilización de un 13,7 % de la variancia espectral ($R^2\text{X}$) (Tabla 2). Así mismo, también, del mismo modo, el modelo entre los grupos de las personas centenarias y de las personas mayores, generó un modelo con una validación de AuROC, correspondiente a un valor de 0,93, mediante la utilización, otra vez, de un 13,7 % de variancia X total (Tabla 2). Con objeto de determinar las características metabólicas asociadas con las diferencias existentes entre los grupos de edad, se utilizaron cargas del primer componente predictivo del modelo de OPLS – DA, con un color codificado en concordancia con el coeficiente de correlación de la variante (Figura 3). De una forma correspondientemente en concordancia, el modelo discriminatorio de la orina, entre las personas centenarias y las personas mayores, exhibe una cantidad relativamente más alta de fenilacetilglutamina (PAG), y de sulfato de p-cresol (PCS). Con objeto de conseguir una información semi-cuantitativa, las áreas pico en los espectros originales, se integraron, para estos tres metabolitos, y se confirmaron diferencias con una significancia estadística, mediante la utilización de test de ensayo de suma de rangos, de Wilcoxon (Wilcoxon Rank Sum test) (Figura 4, Tabla 3). En su conjunto, los resultados obtenidos, muestran el hecho de que, la microbiota intestinal, se encuentra altamente implicada en el proceso de longevidad.

La metabolómica con objetivación de dianas y cuantitativa, realizado mediante LC – MS (cromatografía líquida – espectrometría de masas), exhibía cambios metabólicos en el suero, los cuales se encontraban asociados con la edad.

- 5 Con objeto de determinar las diferencias metabólicas en el suero, relacionadas con la edad, se procedió a llevar a cabo un procedimiento metabonómico, realizado mediante LC – MS / MS, con objetivación de dianas, y éste se aplicó en las muestras biológicas disponibles, procedente de tres grupos de edad (grupos éstos, consistentes en 143 personas centenarias, 90 personas mayores, y 20 personas adultas, jóvenes). Se procedió a llevar a cabo un análisis de datos, multivariantes, mediante la utilización del paquete Random Forest (RF®) (Breiman, L., Random Forests, Machine Learning, - Aprendizaje automático de árboles aleatorios -, 2001, 4: 5 - 32), en datos semicuantitativos, en 160 metabolitos, incluyendo a los aminoácidos, a los azúcares, a las acil-carnitinas, a los esfingolípidos, y a los glicerofosfolípidos. Mediante la utilización de la función de importancia variable implementada en RF®, fue posible el determinar la signatura metabólica la cual discrimina mejor los tres grupos de envejecimiento.
- 10
- 15 Con objeto de evaluar la capacidad discriminatoria individual de cada componente de la signatura, se procedió a llevar a cabo tests de ensayo de la suma se rangos de Wilcoxon, en los grupos de edad (la totalidad de metabolitos significativamente regulados, se encuentran recopilados en la Tabla 4). Mientas que, la concentración global de los glicerofosfolípidos y de los esfingolípidos, se incrementa y disminuye en dependencia de la composición de los ácidos grasos, resultan evidentes tres tendencias consistentes: conjunto de compuestos, los cuales se incrementan o decrecen (estadísticamente válidos), con la edad, tal como una concentración disminuida de las lisofosfatidilcolinas (LCP 18 : 2, LPC 20 : 4), unos niveles incrementados de PC 32 : 0, y una concentración incrementada de las esfingomielinas (SM 24 : 1, SM 16 : 0); (ii) conjunto de compuestos específicos, para únicamente las personas centenarias, sin ningún cambio específicos entre los individuos consistentes en personas mayores, y los individuos consistentes en personas jóvenes, tal como un descenso en las esfingomielinas y en glicerofosfolípidos específicos (SM-OH 22 : 1, LPC 18 : 0, SM 24 : 0, PC-O 34 : 3, PC-O 36 : 4, PC-O 40 : 1, PC 36 : 2) y un incremento en los glicerofosfolípidos específicos (PC-O 32 : 1, PC-O 34 : 1).
- 20
- 25

De una forma adicional, en las muestras de suero restantes, disponibles, de los 3 grupos de envejecimiento (12 personas centenarias, 37 personas mayores, y 18 personas adultas jóvenes), se procedió a emplear un procedimiento de LC – MS / MS, con objetivación de dianas, para investigar los cambios en la concentración, en la síntesis de eicosanoides. Aquí, en este caso, un test de ensayo de RF®, en datos cuantitativos, exhibía cambios estadísticos relevantes en los tres grupos de edad (Figura 6). Las significancias estadísticas entre los grupos de edad, se evaluaron en un test de ensayo de suma de rangos de Wilcoxon (la totalidad de los metabolitos significativamente regulados, se encuentran recopilados en la Tabla 5 suplementaria). Las personas centenarias, exhiben una menor concentración de ácido 11,12-dihidroxi-eicosatrienoico (11,12-DiHETrT), de ácido 9-hidroxi-octadecadienoico (9-HODE), y de ácido9-oxo-octadecadienoico (9-oxo-HODE), mientras que, al mismo tiempo, éstas exhiben unas concentraciones incrementadas de ácido 15-hidroxi-eicosatetraenoico (15-HETE), y de leucotrieno E4 (LTE4). En comparación con lo que sucede con las personas mayores, los niveles de ácido eicosapentaenoico (EPA), se encuentran disminuidos, en las personas centenarias. De una forma adicional, se procedió a aplicar un análisis de MCR, pareado, entre las personas centenarias y las personas mayores, con objeto de maximizar los cambios entre esto dos grupos de edad, que exhiben un incremento en los niveles de concentración en suero, de ácido 8,9-epoxieicosatrienoico (8.9-FET), y leucotrieno B4 (LTB4), en las personas centenarias.

30

35

40

45 Así mismo, también, en este documento de solicitud de patente, se describen formas adicionales de presentación, tal y como éstas se dan a conocer en los siguientes párrafos enumerados:

1.- Un procedimiento para diagnosticar un estilo de vida, el cual permita retardar y / o evitar los desórdenes o trastornos inflamatorios crónicos, los cuales se encuentran relacionados con el envejecimiento, procedimiento éste, el cual comprende:

50

- la obtención de una muestra de suero, de un sujeto
 - determinar el nivel de 9-Oxo-HODE, en la muestra, y
 - comparar el nivel de 9-Oxo-HODE del sujeto, con un valor de referencia predeterminado,
- 55

en donde, el valor de referencia predeterminado, se basa en un nivel medio de 9-Oxo-HODE, en el suero, en una población de control, y

en donde, un nivel disminuido de 9-Oxo-HODE, en suero, en la muestra, comparado con el valor de referencia predeterminado, indica el hecho de una probabilidad incrementada, de retardar y / o evitar los desórdenes o trastornos inflamatorios crónicos, los cuales se encuentran relacionados con el envejecimiento.

60

2.- Un procedimiento para diagnosticar un estilo de vida, el cual permita retardar y / o evitar los desórdenes o trastornos inflamatorios crónicos, los cuales se encuentran relacionados con el envejecimiento, procedimiento éste, el cual comprende:

65

- la obtención de una muestra de suero, de un sujeto

- determinar el nivel de PC-O 40 : 1, en la muestra, y
- comparar el nivel de PC-O 40 : 1, del sujeto, con un valor de referencia predeterminado,

5 en donde, el valor de referencia predeterminado, se basa en un nivel medio de PC-O 40 : 1, en el suero, en una población de control, y

en donde, un nivel disminuido de PC-O 40 : 1, en suero, en la muestra, comparado con el valor de referencia predeterminado, indica el hecho de una probabilidad incrementada, de retardar y / o evitar los desórdenes o trastornos inflamatorios crónicos, los cuales se encuentran relacionados con el envejecimiento

10 3.- Un procedimiento para diagnosticar un estilo de vida, el cual permita retardar y / o evitar los desórdenes o trastornos inflamatorios crónicos, los cuales se encuentran relacionados con el envejecimiento, procedimiento éste, el cual comprende:

- 15 - la obtención de una muestra de suero, de un sujeto
- determinar el nivel de SM-OH 22 : 1, en la muestra, y
- comparar el nivel de SM-OH 22 : 1 del sujeto, con un valor de referencia predeterminado,

en donde, el valor de referencia predeterminado, se basa en un nivel medio de SM-OH 22 : 1, en el suero, en una población de control, y

20 en donde, un nivel disminuido de SM-OH 22 : 1 en suero, en la muestra, comparado con el valor de referencia predeterminado, indica el hecho de una probabilidad incrementada, de retardar y / o evitar los desórdenes o trastornos inflamatorios crónicos, los cuales se encuentran relacionados con el envejecimiento.

25 4.- El procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 1 a 3, el cual comprende, de una forma adicional,

- determinar el nivel de por lo menos uno de entre los PC-O 40 : 1, SM-OH 22 : 1, LPC 18 : 0, SM 24 : 0, PC-O 34 : 1, 9-HODE, 9-oxo-HODE, ó LTE4 en la muestra, y
- 30 - comparar el nivel, en el sujeto, de PC-O 40 : 1, SM-OH 22 : 1, LPC 18 : 0, SM 24 : 0, PC-O 34 : 1, 9-HODE, 9-oxo-HODE, ó LTE4, con un valor de referencia predeterminado,

en donde, el valor de referencia predeterminado, se basa en un nivel medio de PC-O 40 : 1, SM-OH 22 : 1, LPC 18 : 0, SM 24 : 0, PC-O 34 : 1, 9-HODE, 9-oxo-HODE, ó LTE4, en el suero, en una población de control, y

35 en donde, un nivel disminuido de PC-O 40 : 1, SM-OH 22 : 1, LPC 18 : 0, SM 24 : 0, PC-O 34 : 1, 9-HODE, 9-oxo-HODE, ó LTE4 en suero, en la muestra, comparado con los valores de referencia predeterminados, indica el hecho de una probabilidad incrementada, de retardar y / o evitar los desórdenes o trastornos inflamatorios crónicos, los cuales se encuentran relacionados con el envejecimiento, y / o,

en donde, unos niveles incrementados de LTE y / o PC-O 34 : 1, en suero, en la muestra, comparado con los valores de referencia predeterminados, indican el hecho de una probabilidad incrementada, de retardar y / o evitar los desórdenes o trastornos inflamatorios crónicos, los cuales se encuentran relacionados con el envejecimiento.

40 5.- El procedimiento de uno cualquiera de los párrafos 1 a 4, en donde, la precisión de la diagnosis, se incrementa procediendo así mismo, también, a evaluar el hecho de si, uno o más de los siguientes biomarcadores, PC-O 32 : 1, 15-HpETE, LTB4, 8,9 EpETre, se encuentra incrementado, en el suero, y / o si uno o más de los siguientes biomarcadores, PC-O 34 : 3, PC-O 36 : 4, PC 36 : 2, 11,12-DiHETre, se encuentran disminuidos en el suero, en comparación con un valor de referencia previamente obtenido.

50 6.- Un procedimiento no invasivo, para diagnosticar un estilo de vida, el cual permita retardar y / o evitar los desórdenes o trastornos inflamatorios crónicos, los cuales se encuentran relacionados con el envejecimiento, procedimiento éste, el cual comprende:

- la obtención de una muestra de orina, de un sujeto
- determinar el nivel de sulfato de p-cresol, en la muestra, y
- comparar el nivel de sulfato de p-cresol del sujeto, con un valor de referencia predeterminado,

55 en donde, el valor de referencia predeterminado, se basa en un nivel medio de PCS, en la orina, en una población de control, y

en donde, un nivel disminuido de sulfato de p-cresol, en la orina, en la muestra, comparado con el valor de referencia predeterminado, indica el hecho de una probabilidad incrementada, de retardar y / o evitar los desórdenes o trastornos inflamatorios crónicos, los cuales se encuentran relacionados con el envejecimiento.

60 7.- El procedimiento del párrafo 6, el cual comprende, de una forma adicional,

- determinar el nivel de PAG, en la muestra, y
- 65 - comparar el nivel de PAG, del sujeto, con un valor de referencia predeterminado,

- en donde, el valor de referencia predeterminado, se basa en un nivel medio de PAG, en la orina, en una población de control, y en donde, unos niveles elevados de PAG y PSC, en la orina, en la muestra, comparado con los valores de referencia predeterminados, indican el hecho de una probabilidad incrementada, de retardar y / o evitar los desórdenes o trastornos inflamatorios crónicos, los cuales se encuentran relacionados con el envejecimiento.
- 5 8.- El procedimiento de uno de los párrafos 1 a 7, para diagnosticar un estilo de vida, el cual permita un envejecimiento sano.
- 10 9.- El procedimiento de uno de los párrafos 1 a 8, para diagnosticar longevidad.
- 10.- El procedimiento de uno de los párrafos 1 a 9, para diagnosticar interacciones microflora intestinal – huésped, las cuales sean más sanas.
- 15 11.- El procedimiento del párrafo 10, en donde, las interacciones microflora intestinal - huésped, se diagnostican en las personas mayores.
- 12.- El procedimiento de uno de los párrafos 1 a 11, para diagnosticar un estilo de vida más sano, en donde, los valores de referencia predeterminados, se basan en los niveles en suero, o en la orina, obtenidos de un sujeto, antes de un cambio en el estilo de vida.
- 20 13.- El procedimiento, según el párrafo 12, en donde, el cambio, en el estilo de vida, es un cambio en la dieta.
- 14.- El procedimiento, según el párrafo 13, en donde, el cambio, en la dieta, es el uso de por lo menos un producto nutritivo, el cual no se había consumido previamente, o el cual se había consumido en una cantidades diferentes.
- 25 15.- El procedimiento, según el párrafo 13 ó 14, para someter a test de ensayo, la efectividad de un nuevo régimen nutritivo.
- 30 16.- El procedimiento de uno de los párrafos 1 a 15, en donde, los niveles de los biomarcadores, se determinan mediante ¹H-NMR y / o espectrometría de masas, en la muestra, en la referencia.
- 17.- El procedimiento de uno de los párrafos 1 a 16, para diagnosticar un estilo de vida más sano, en donde, los valores de referencia medios predeterminados, son los siguientes:
- 35 2 µM para la 1-O-alkuil-2-acilglicerofosfocolina (PC-O) 32 : 1,
7,80 µM para la 1-O-alkuil-2-acilglicerofosfocolina (PC-O) 34 : 1,
1,25 µg / 100 µl en suero, para el ácido 15-hidroxi-eicosatetraenoico (15-HpETE),
0,013 µg / 100 µl en suero para el leucotrieno E4(LTE4),
40 0,020 µg / 100 µl en suero para el leucotrieno B4(4LTB), y / o
0,070 µg / 100 µl en suero para el ácido 8,9-epoxieicosatrienoico (8,9 EpETre)
16,07 µM para la Hidroxi-esfingomielina (SM-OH) 22 : 1,
52,00 µM para las Lisofosfatidilcolinas (LPC) 18 : 0,
25,00 µM para la Esfingomielina (SM) 24 : 0,
45 5,07 µM para la 1-O-alkuil-2-acilglicerofosfocolina (PC-O) 34 : 3,
14,30 µM para la 1-O-alkuil-2-acilglicerofosfocolina (PC-O) 36 : 4,
1,41 µM para la 1-O-alkuil-2-acilglicerofosfocolina (PC-O) 40 : 1,
10,00 µM para la fosfatidilcolina (PC) 36 : 2,
50 0,34 µg/100 µl en suero, para el ácido hidroxi-octadecadienoico (9-HODE),
0,043 µg/100 µl for 9-oxo-octadecadienoico (9-oxo-HODE), y / o
0,017 µg/100 µl en suero, para el ácido 11,12-epoxieicosatrienoico (11,12-DiHETre).
- 18.- El procedimiento, según uno cualquiera de los párrafos 1 a 17, procedimiento éste, el cual comprende, de una forma adicional:
- 55 - la obtención de una muestra de orina, de un sujeto
- determinar el nivel de fenilacetilglutamina (PAG) y / o de sulfato de p-cresol (PCS), en la muestra, y
- comparar el nivel de fenilacetilglutamina (PAG) y / o el nivel de PCS, del sujeto, con un valor de referencia predeterminado,
- 60 en donde, el valor de referencia predeterminado, se basa en un nivel medio de PAG y / o PCS, en la orina, en una población de control, y en donde, unos niveles elevado de PAG y / o PCA, en la orina, elevados, en la muestra, comparado con el valor de referencia predeterminado, indica el hecho de una probabilidad incrementada, de retardar y / o evitar los desórdenes o trastornos inflamatorios crónicos, los cuales se encuentran relacionados con el envejecimiento.
- 65

- 19.- Un biomarcador para la diagnosis de un estilo de vida, el cual permita retardar y / o evitar los desórdenes o trastornos inflamatorios crónicos, los cuales se encuentran relacionados con el envejecimiento, en donde, el biomarcador en cuestión, se trata del 9-oxo-HODE.
- 5 20.- Un biomarcador para la diagnosis de un estilo de vida, el cual permita retardar y / o evitar los desórdenes o trastornos inflamatorios crónicos, los cuales se encuentran relacionados con el envejecimiento, en donde, el biomarcador en cuestión, se trata del PC-O.
- 10 21.- Un biomarcador para la diagnosis de un estilo de vida, el cual permita retardar y / o evitar los desórdenes o trastornos inflamatorios crónicos, los cuales se encuentran relacionados con el envejecimiento, en donde, el biomarcador en cuestión, se trata de la SM-OH 22 : 1.
- 15 22.- El biomarcador, según uno cualquiera de los párrafos 19 a 21, en donde, el biomarcador en cuestión, debe detectarse en el suero.
- 20 23.- Un biomarcador para la diagnosis de un estilo de vida, el cual permita retardar y / o evitar los desórdenes o trastornos inflamatorios crónicos, los cuales se encuentran relacionados con el envejecimiento, en donde, el biomarcador en cuestión, se trata del sulfato de p-cresol (PCS).
- 25 24.- Un biomarcador, según el párrafo 23, en donde, el biomarcador en cuestión, debe detectarse en la orina.
- 30 25.- Un procedimiento para diagnosticar (i) un estilo de vida, el cual favorezca el desarrollo de desórdenes o trastornos inflamatorios crónicos, los cuales se encuentran relacionados con el envejecimiento, (ii) un estilo de vida, el cual, probablemente, evitará un envejecimiento sano, (iii) un riesgo para un esperanza de vida más corta y / o (iv) unas interacciones microflora – huésped malsanas, procedimiento éste, el cual comprende:
- la obtención de una muestra de suero, de un sujeto
 - determinar el nivel de 9-Oxo-HODE, PC-O 40 : 1 y / o SM-OH 22 : 1, en la muestra, y
 - comparar el nivel de 9-Oxo-HODE, PC-O 40 : 1 y / o SM-OH 22 : 1, del sujeto, con un valor de referencia predeterminado,
- en donde, el valor de referencia predeterminado, se basa en un nivel medio de 9-Oxo-HODE, PC-O 40 : 1 y / o SM-OH 22 : 1, en el suero, en una población de control, y
- 35 en donde, un nivel incrementado de 9-Oxo-HODE, PC-O 40 : 1 y / o SM-OH 22 : 1. en suero, en la muestra, comparado con el valor de referencia predeterminado, indica (i) un estilo de vida, el cual favorece el desarrollo de desórdenes o trastornos inflamatorios crónicos, los cuales se encuentran relacionados con el envejecimiento, (ii) un estilo de vida, el cual, probablemente, evitará un envejecimiento sano, (iii) un riesgo para un esperanza de vida más corta y / o (iv) unas interacciones microflora – huésped malsanas.
- 40 26.- Un procedimiento para diagnosticar (i) un estilo de vida, el cual favorezca el desarrollo de desórdenes o trastornos inflamatorios crónicos, los cuales se encuentran relacionados con el envejecimiento, (ii) un estilo de vida, el cual, probablemente, evitará un envejecimiento sano, (iii) un riesgo para un esperanza de vida más corta y / o (iv) unas interacciones microflora – huésped malsanas, procedimiento éste, el cual comprende:
- 45 - la obtención de una muestra de orina, de un sujeto
 - determinar el nivel de PSC, en la muestra, y
 - comparar el nivel de PSC, del sujeto, con un valor de referencia predeterminado,
- en donde, el valor de referencia predeterminado, se basa en un nivel medio de PSC, en la orina, en una población de control, y
- 50 en donde, un nivel incrementado de PSC, en la orina, en la muestra, comparado con el valor de referencia predeterminado, indica (i) un estilo de vida, el cual favorece el desarrollo de desórdenes o trastornos inflamatorios crónicos, los cuales se encuentran relacionados con el envejecimiento, (ii) un estilo de vida, el cual, probablemente, evitará un envejecimiento sano, (iii) un riesgo para un esperanza de vida más corta y / o (iv) unas interacciones microflora – huésped malsanas.
- 55 27.- Un procedimiento para (i) evitar y / o prevenir el desarrollo de los desórdenes o trastornos inflamatorios crónicos, los cuales se encuentran relacionados con la edad, (ii) fomentar un envejecimiento sano, (iii) fomentar la longevidad, (iv) reducir el riesgo de una esperanza de vida más corta, (v) fomentar unas interacciones microflora intestinal –huésped, las cuales sean más sanas, y / o (vi) prevenir las interacciones microflora intestinal – huésped, las cuales no sean sanas (las cuales sean malsanas), procedimiento éste, el cual comprende:
- 60 (a) llevar a cabo un procedimiento de diagnóstico, de la forma la cual se encuentra descrito en los párrafos 25 ó 26;
- 65 y
- (b) modificar un estilo de vida del sujeto, si el sujeto tiene, (i) una probabilidad incrementada del desarrollo de desórdenes o trastornos inflamatorios crónicos, los cuales se encuentran relacionados con el envejecimiento, (ii) un

estilo de vida, el cual, probablemente, evitará un envejecimiento sano, (iii) un riesgo para un esperanza de vida más corta y / o (iv) unas interacciones microflora – huésped malsanas.

5 28.- Un procedimiento, según el párrafo 27, en donde, la modificación en el estilo de vida, en el sujeto, comprende un cambio en la dieta.

10 29.- Un procedimiento, según el párrafo 28, en donde el cambio en la dieta, comprende la administración, de por lo menos un producto nutricional, al sujeto, el cual tenga un efecto, en un envejecimiento sano, y / o que evite los desórdenes o trastornos inflamatorios crónicos, los cuales se encuentran relacionados con el envejecimiento.

Tabla1:

Factor	Personas centenarias	Personas mayores	Personas jóvenes
Demográfico			
Género, hombre / mujer	31 / 125	158 / 205	12 / 10
Edad, años	100,9 ± 2 (99 - 111)	70,4 ± 6 (55 - 88)	30,6 ± 5 (25 - 40)
Clínico			
BMI ¹ , kg / m ²	23,8 ± 3,7 (13,3 – 34,1)	26,9 ± 4,6 (16,7 – 54,7)	21,92 ± 2,1 (18,3 – 23,6)
HOMA	1,90 ± 2,8 (0,20 – 23)	3,3 ± 3,1 (0,20 – 28,9)	n / a
Diabetes ² , mg / dl	8	36	n / a
Colesterol, mg / dl	188,2 ± 38,1 (110 – 318)	201,0 ± 38,8 (5 – 335)	162,3 ± 28,4 (123 – 207)
Triglicéridos, mg / dl	119,6 ± 65,4 (50 – 535)	125,5 ± 63,1 (41 – 550)	71,1 ± 32,1 (28 – 143)
HDL ³ , mg / dl	47,4 ± 13,1 (20 – 99)	55,8 ± 21,1 (20 – 212)	51,3 ± 8,7 (38,66)
LDL ⁴ , mg / dl	116,2 ± 36,1 (27 – 248)	120 ± 41,7 (12 -248)	96,8 ± 30,1 (49 – 144)
MMSE ⁵	20,3 ± 6,4 (1,3 – 30,8)	27,3 ± 1.9 (1,3 – 3,10)	n / a
CRP ⁶ mg / ml	5,8 ± 6,1 (0,28 – 28,2)	2,8 ± 3,7 (0,11 – 25,7)	0,7 ± 0,4 (0,28 – 2,03)
Insuficiencia cardíaca, n	44	4	0
Ritmo cardíaco irregular, n	33	46	0
Angina de pecho, n	25	12	0
A-SAA ⁷ , µg / ml	540 ± 706 (0,01 – 3859,4)	158,2 ± 21,95 (0,001 - 1861,9)	

Continuación Tabla 1

Metabolómica ¹ H-NMR de la orina Género, hombre / mujer Edad, años	18 / 74 100,9 ± 2 (99 – 111)	128 / 155 70,1 ± 6 (55 – 88)	11 / 10 30,9 ± 5 (24 – 40)
MS objetivizada del suero Género, hombre / mujer Edad, años	30 / 113 100,9 ± 2 (199 – 111)	34 / 56 69,6 ± 6 (56 – 88)	11 / 9 30,6 ± 5 (24 – 40)
Lipidómica MS objetivizada del suero Género, hombre / mujer Edad, años	2 / 10 101 ± 2 (99 – 104)	21 / 6 70 ± 6 (59 -78)	9 / 9 31,2 ± 5 (25 – 40)

Tabla 2

5

Visión de conjunto	R2X _(cum)	R2Y _(cum)	Q2Y	AuROC	
Personas centenarias versus personas mayores	0,14	0,52	0,39	0,96	0,93
Personas centenarias versus personas jóvenes	0,14	0,86	0,75	1,00	1,00
Personas jóvenes versus personas mayores	0,05	0,21	0,09	0,92	0,81

Tabla 3

Grupo de edad		Personas centenarias	Personas mayores	Personas jóvenes
		Media ± SD	Media ± SD	Media ± SD
Integral Pico (a.u.)	Desplazamiento químico			
PAG	2,34 (s)	9,93 ± 3,72 ***	6,62 ± 2,59	5,89 ± 2,35
PCS	7,36 (m)	4,06 ± 1,53 ***	2,62 ± 1,22	2,32 ± 0,85

Tabla 4

10

Metabolitos [µM / l]	Personas jóvenes	Personas mayores	Personas centenaria
	Media ± SD	Media ± SD	Media ± SD
PC-O 32:1	2.02 ± 0.36	2 ± 0.51	2.35 ± 0.63*
PC-O 34:1	7.34 ± 1.07	7.88 ± 1.71	9.54 ± 2.19***
PC-O 34:3	5.73 ± 1.4	5.07 ± 1.71	3.94 ± 1.54***
PC-O 36:2	9.54 ± 1.75	9.58 ± 2.39	9.29 ± 2.26*
PC-O 36:4	14.48 ± 2.83	14.35 ± 3.55	12.39 ± 2.56*
PC-O 40:1	1.23 ± 0.23	1.41 ± 0.41	1.02 ± 0.32***
LPC 18:0	52.18 ± 12.93	52 ± 13.5	40.4 ± 12.02**
SM 24:0	23.45 ± 4.37	25.64 ± 5.31	19.79 ± 4.92***
SM-OH 22:1	14.52 ± 2.94	16.07 ± 3.37	11.51 ± 3.04***

15

20

25

Tabla 5

Metabolitos [(ng / 100µl, en suero)]	Personas jóvenes	Personas mayores	Personas centenaria
	Media ± SD	Media ± SD	Media ± SD
LTE4	0.015 ± 0.014	0.013 ± 0.011	0.035 ± 0.03***
LTB4	0.011 ± 0.014	0.019 ± 0.047	0.016 ± 0.009*
EPA	0.097 ± 0.036	0.123 ± 0.052	0.078 ± 0.026**
15-HpETE	1.512 ± 1.949	1.255 ± 1.245	3.348 ± 2.865***
11,12-DiHETrE	0.019 ± 0.006	0.017 ± 0.004	0.016 ± 0.006*
9-oxo-ODE	0.042 ± 0.028	0.019 ± 0.039	0.022 ± 0.013***
9-HODE	0.348 ± 0.223	0.397 ± 0.677	0.204 ± 0.211 **
8,9-EpETrE	0.067 ± 0.101	0.074 ± 0.186	0.113 ± 0.107***

REIVINDICACIONES

- 1.- Un procedimiento no invasivo para diagnosticar un estilo de vida, el cual permita un envejecimiento sano, el cual comprende:
- 5
- la obtención de una muestra de orina, de un sujeto
 - determinar el nivel de fenilacetilglutamina (PAG), en la muestra y
 - comparar el nivel de fenilacetilglutamina (PAG) del sujeto, con un valor de referencia predeterminado,
- 10 en donde, el valor de referencia predeterminado, se basa en un nivel medio de PAG en la orina, en una población de control, y en donde, un elevado nivel de PAG en la orina, en la muestra, comparado con el valor de referencia predeterminado, indica el hecho de una probabilidad incrementada de permitir un envejecimiento sano.
- 15 2.- Un procedimiento, según la reivindicación 1, el cual comprende, de una forma adicional,
- determinar el nivel de sulfato de p-cresol (PCS) en la muestra, y
 - comparar el nivel de PCS, del sujeto, con un valor de referencia predeterminado,
- 20 en donde, el valor de referencia predeterminado, se basa en un nivel medio de PCS, en la orina, en una población de control, y en donde, unos niveles elevados de PAG y PSC, en la orina, en la muestra, comparado con los valores de referencia predeterminados, indican el hecho de una probabilidad incrementada, permitir un envejecimiento sano.
- 25 3.- El procedimiento de una de las reivindicaciones precedentes, para diagnosticar longevidad.
- 4.- El procedimiento de una de las reivindicaciones precedentes, para diagnosticar un estilo de vida más sano, en donde, los valores de referencia predeterminados, se basan en los niveles de PAG y / o PCS en la orina, obtenidos de un sujeto, antes de un cambio en el estilo de vida.
- 30 5.- El procedimiento, según la reivindicación 4, en donde, el cambio en el estilo de vida, se trata de un cambio en la dieta.
- 6.- El procedimiento, según la reivindicación 5, en donde, el cambio en la dieta, es el uso de por lo menos un producto nutritivo, el cual no se había consumido previamente, o el cual se había consumido en unas cantidades diferentes.
- 35 7.- El procedimiento, según una de las reivindicaciones 5 ó 6, para someter a test de ensayo la efectividad de un nuevo régimen nutritivo.
- 40 8.- El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde, los niveles de PAG y / o PCS, se determinan mediante ¹H-NMR y / o espectrometría de masas, en la muestra, y en la referencia.
- 9.- El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para diagnosticar un estilo de vida más sano, en donde, los valores de referencia predeterminados, son los correspondientes a un valor de 63 μmol / mmol de creatinina, para el PCS, y de un valor de 81 μmol / mmol de creatinina para la PAG, y unos valores más altos, son indicativos para una probabilidad incrementada de permitir un envejecimiento más sano.
- 45 10.- El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde, la precisión de la diagnosis, se incrementa procediendo así mismo, también, a evaluar el hecho de si, uno o más de los siguientes biomarcadores, PC-O 32 : 1, PC-O 34 : 1, 15-HpETE, LTE4, LTB4, 8,9 EpETre, se encuentra incrementado, en el suero, y / o si uno o más de los siguientes biomarcadores, SM-OH 22 : 1, LPC 18 : 1, SM 24 : 1, PC-O 34 : 3, PC-O 36 : 4, PC 40 : 1, PC 36 : 2, 9-HODE, 9-oxo-HODE, 11,12-DiHETre, se encuentran disminuidos en el suero, en comparación con un valor de referencia previamente obtenido.
- 50 11.- Un procedimiento para diagnosticar un estilo de vida, el cual, probablemente, evitará un envejecimiento sano, el cual comprende:
- 55
- la obtención de una muestra de orina, de un sujeto
 - determinar el nivel de PAG, en la muestra, y
 - comparar el nivel de PAG del sujeto, con un valor de referencia predeterminado,
- 60 en donde, el valor de referencia predeterminado, se basa en un nivel medio de PAG en la orina, en una población de control, y en donde, un elevado nivel de PAG en la orina, en la muestra, comparado con el valor de referencia predeterminado, indica un estilo de vida, el cual, probablemente, evitará un envejecimiento sano.
- 65

12.- Un procedimiento para fomentar un estilo de vida sano y / o fomentar la longevidad, el cual comprende:

(a) llevar a cabo un procedimiento de diagnóstico, de la forma la cual se encuentra descrita en la reivindicación 11, y
(b) modificar un estilo de vida de un sujeto, si el sujeto tiene un estilo de vida el cual, probablemente, evitará un envejecimiento sano y / o un riesgo incrementado para una esperanza de vida acortada.

5

13.- Un procedimiento, según la reivindicación 12, en donde, la modificación en el estilo de vida, en el sujeto, comprende un cambio en la dieta.

10

14.- Un procedimiento, según la reivindicación 13, en donde, el cambio en la dieta, comprende la administración de por lo menos un producto nutritivo, al sujeto, el cual tenga un efecto en un envejecimiento sano.

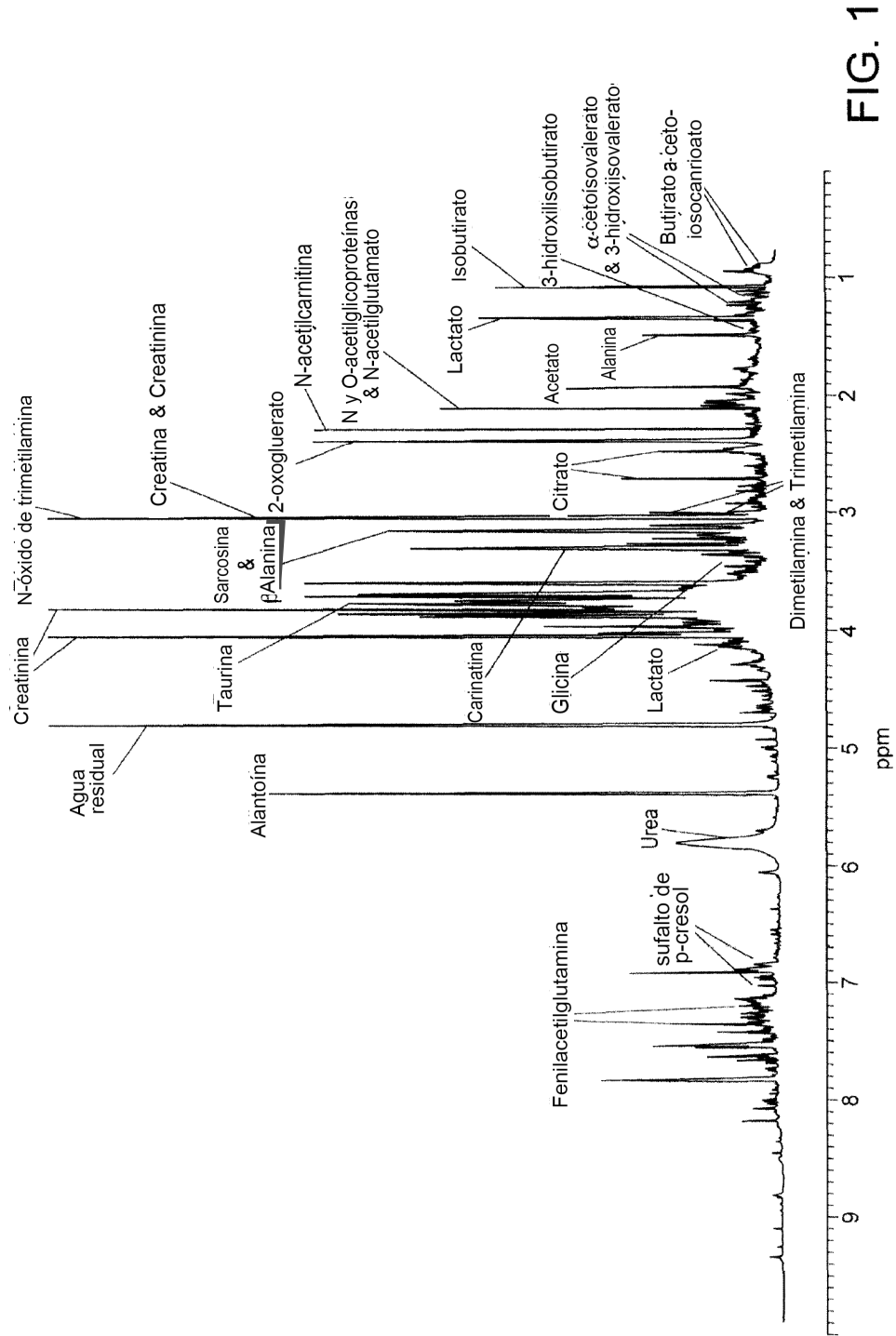
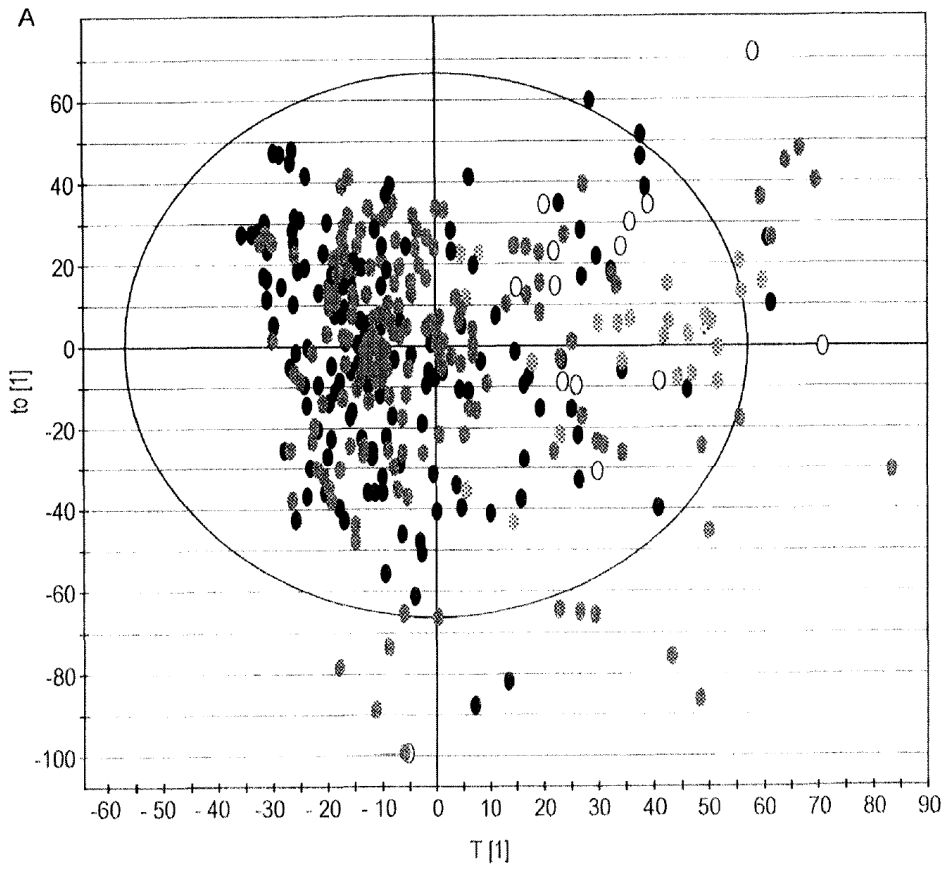


FIG. 1



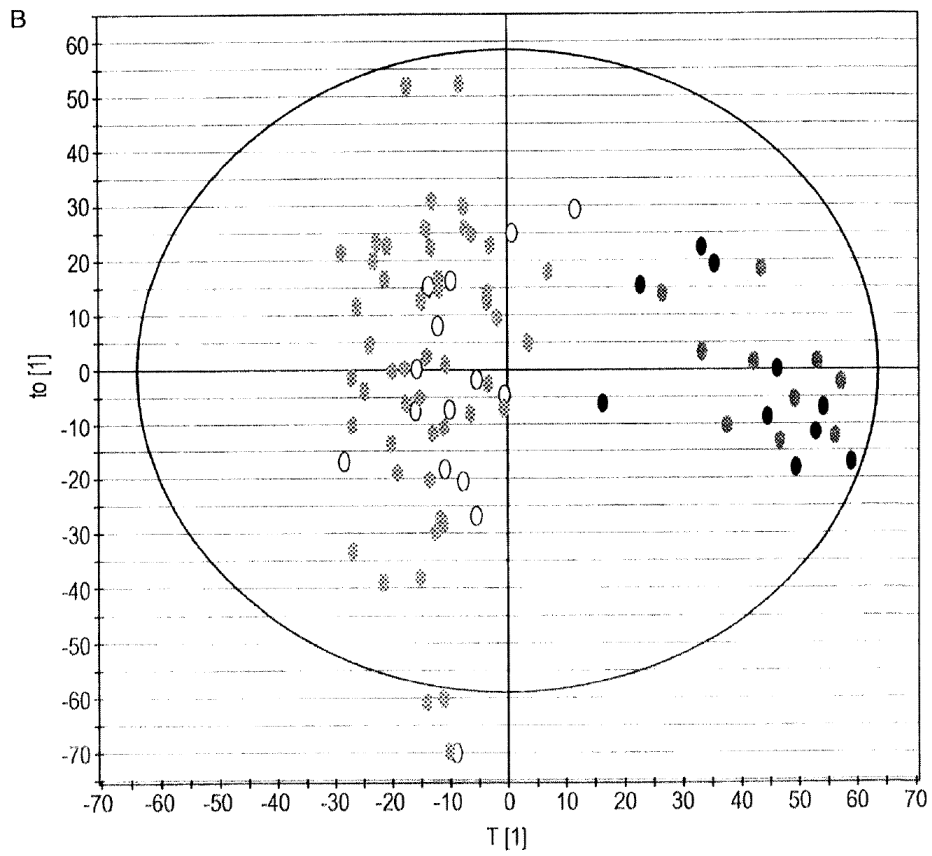


FIG. 2 - Continuación

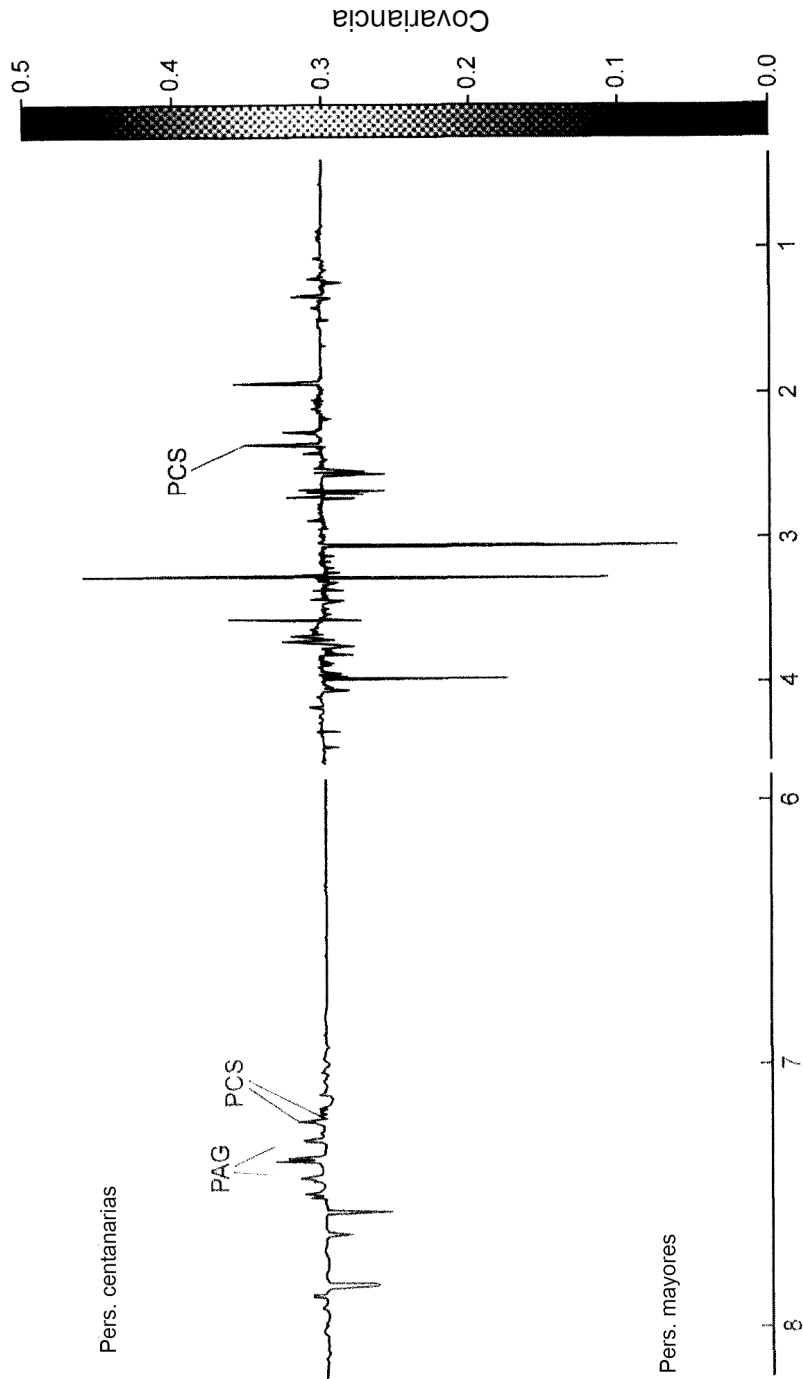


FIG. 3

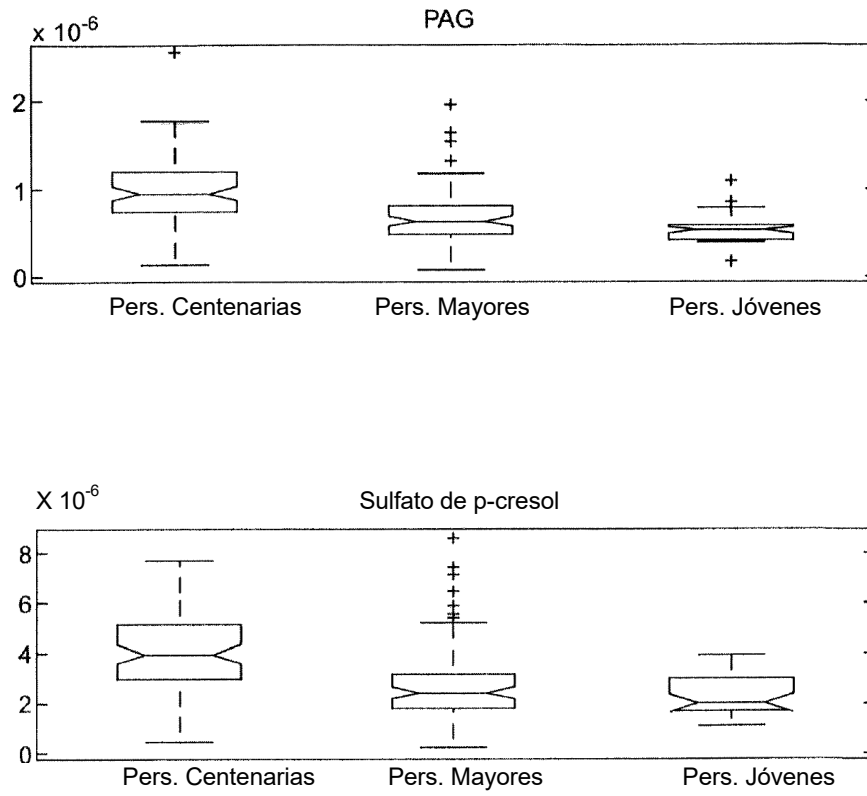


FIG. 4

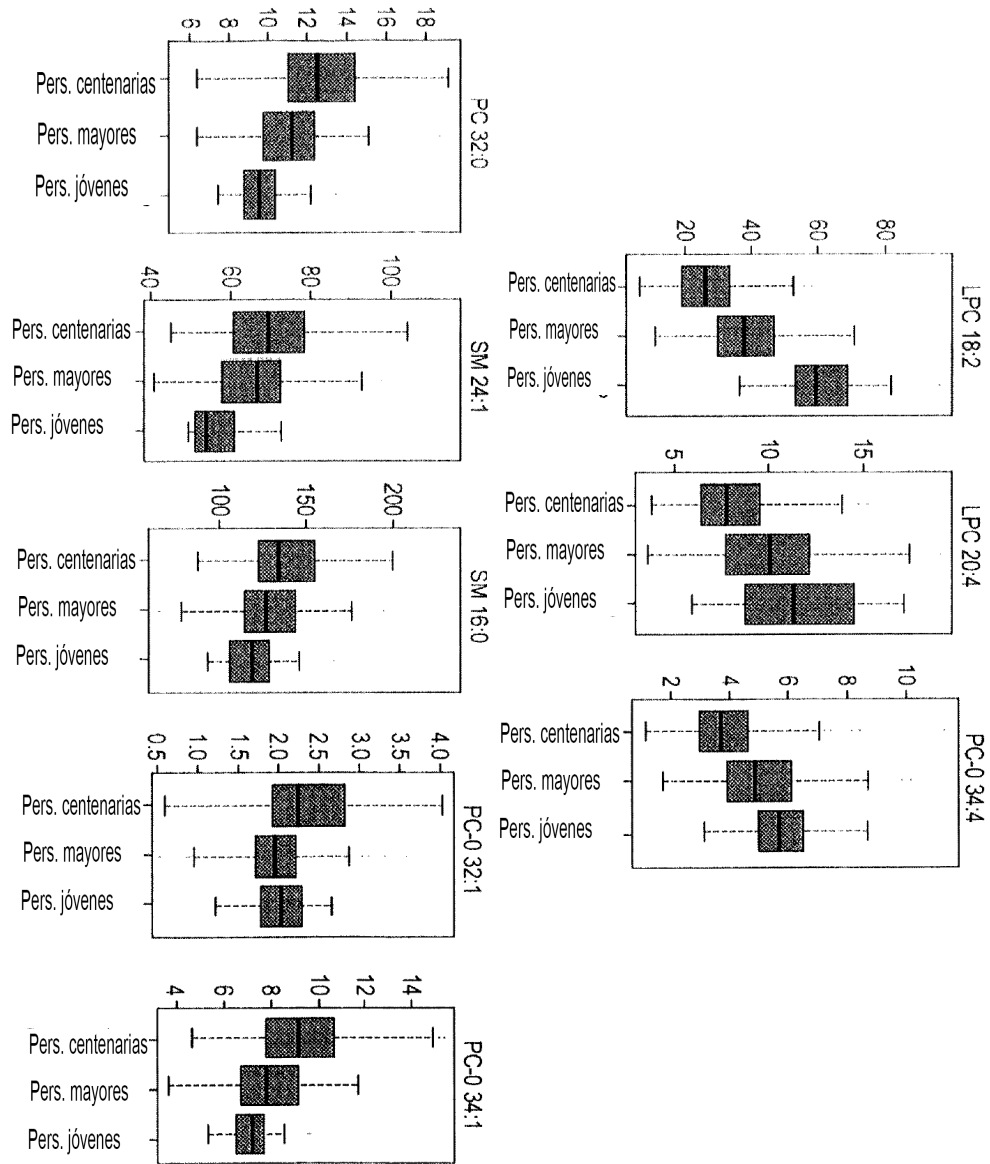


FIG. 5a

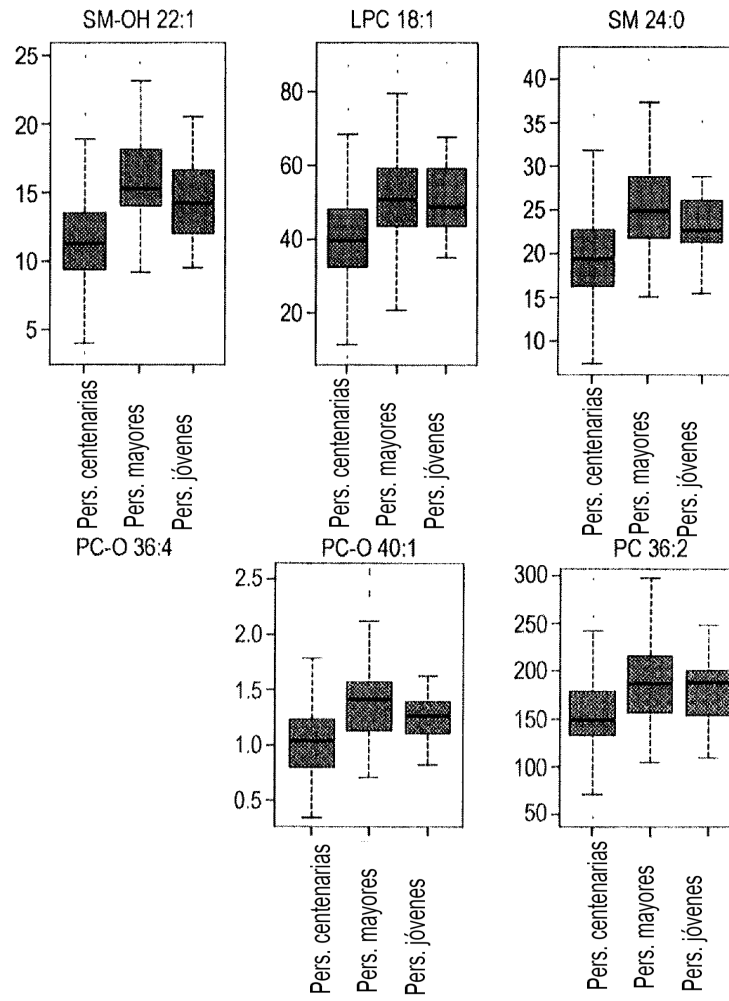


FIG. 5b

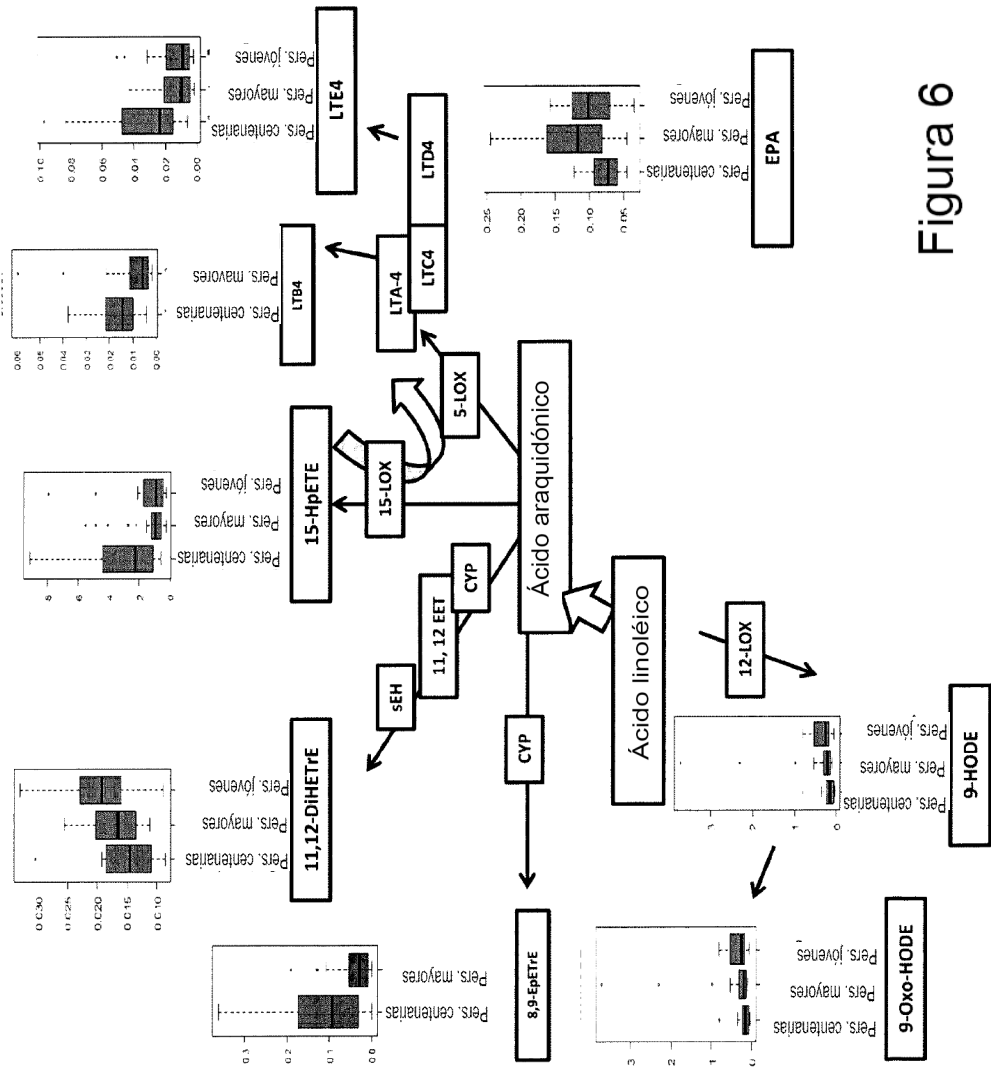


Figura 6