

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 653 269**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/92 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.03.2013 PCT/EP2013/054335**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.09.2013 WO13139584**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.03.2013 E 13709175 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017 EP 2828668**

54 Título: **Hidroxi-esfingomielina 22:1 como biomarcador para envejecimiento sano**

30 Prioridad:

22.03.2012 EP 12160740

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

06.02.2018

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 2 653 269 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

Hidroxi-esfingomielina 22:1 como biomarcador para envejecimiento sano

5 La presente invención se refiere en general a un estilo de vida sano y la prevención de trastornos crónicos relacionados con la edad. En particular, la presente invención se refiere a biomarcadores y su uso para detectar mejoras en el estilo de vida. Como tal, la presente invención proporciona por ejemplo hidroxi-esfingomielina 22:1 (SM-OH 22:1) como un biomarcador y un método para diagnosticar un estilo de vida que permite retardar y/o evitar trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento que usa el biomarcador hidroxi-esfingomielina 22:1.

10 El envejecimiento se define como la degradación dependiente del tiempo de la capacidad funcional y la resistencia a tensión, asociada con el riesgo aumentado de morbilidad y mortalidad. Adicionalmente, el fenotipo de envejecimiento en seres humanos es muy heterogéneo y puede describirse como un mosaico complejo resultante de la interacción de una diversidad de variables ambientales, estocásticas y genéticas-epigenéticas. Décadas de investigación sobre el envejecimiento han descubierto cientos de genes y muchos procesos biológicos que están asociados con el proceso de envejecimiento, pero al mismo tiempo, muchas cuestiones fundamentales aún no han sido respondidas o son objeto de intenso debate.

15 Estas cuestiones no son con frecuencia abordables mediante el examen de un único gen o una única ruta, sino que se abordan mejor a un nivel sistémico, capturando el envejecimiento como un proceso multifactorial complejo. Además, el envejecimiento está acompañado de un estado inflamatorio, de grado bajo, crónico, resultante de un desequilibrio entre los procesos pro y anti-inflamatorios, una afección patógena que se ha revelado que es crítica en la aparición de enfermedades crónicas relacionadas con la edad importantes tales como aterosclerosis, diabetes de tipo 2 y neurodegeneración.

20 Dentro de esta perspectiva, el envejecimiento sano adquirido y la longevidad probablemente reflejen no solamente una menor propensión a acumular respuestas inflamatorias, sino también el desarrollo de redes anti-inflamatorias eficaces. Además, existe una mayor consciencia de la importancia de la variación en la microbiota intestinal ya que sus efectos en el sistema de mamífero hospedador han presentado una influencia directa en la etiología de varias enfermedades tales como resistencia a insulina, enfermedad de Crohn, síndrome del intestino irritable, obesidad y enfermedad cardiovascular.

25 La metabonomía se considera en la actualidad un enfoque sistémico bien establecido para caracterizar el fenotipo metabólico, que resulta de una respuesta fisiológica coordinada a diversos parámetros intrínsecos y extrínsecos incluyendo ambiente, fármacos, patrones dietéticos, estilo de vida, genética y microbioma. A diferencia de la expresión génica y los datos proteómicos que indican el potencial de cambios fisiológicos, los metabolitos y sus cambios cinéticos en la concentración dentro de las células, tejidos y órganos, representan los criterios de evaluación reales de procesos reguladores fisiológicos.

30 La metabonomía se ha aplicado con éxito al estudio de la modulación de los procesos de envejecimiento tras intervenciones nutricionales, incluyendo cambios metabólicos introducidos por restricción calórica en ratones, perros y primates no humanos. Específicamente, en la población canina cambios profundos en el metabolismo de la microbiota intestinal se asociaron con envejecimiento. A pesar de esos hallazgos, aún no se ha presentado un perfil exhaustivo de los mecanismos moleculares que afectan al proceso de envejecimiento. Además, aún no se tiene una determinación de fenotipo metabólico de la longevidad.

35 En consecuencia, ha sido el objetivo de la presente invención proporcionar a la técnica un biomarcador que pueda detectarse fácilmente y que permita diagnosticar un estilo de vida que probablemente permita un envejecimiento sano.

40 Los presentes inventores se sorprendieron al ver que podrían conseguir el objetivo de la presente invención por la materia objeto de las reivindicaciones independientes. Las reivindicaciones adjuntas desarrollan adicionalmente la idea de la presente invención.

45 Usando un enfoque holístico combinado de espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) ¹H en orina, y enfoques de espectrometría de masas (EM) dirigida y lipídico en suero, los inventores pudieron detectar cambios en los perfiles metabólicos de una cohorte de envejecimiento bien definida que comprendía centenarios, ancianos y jóvenes adultos.

50 El grupo de envejecimiento seleccionado representa una población homogénea de un área geográfica restringida del norte de Italia, que comprende jóvenes adultos (promedio de 31 años de edad), ancianos (70 años de edad) y personas centenarias (100 años de edad). Entre los tres grupos de envejecimiento, los centenarios son un modelo bien aceptado de envejecimiento sano y longevidad [Sansoni P, et al., Exp Gerontol. 2008;43:61-65; Franceschi C, et al., Mech Ageing Dev. 2007;128:92-105; Cevenini E, et al., Expert Opin Biol Ther. 2008;8:1393-1405] y su

envejecimiento exitoso adquirido parece estar conducido por un equilibrio óptimo entre fuerzas proinflamatorias y antiinflamatorias [Franceschi C, et al., Mech Ageing Dev. 2007;128:92-105].

5 Los inventores se sorprendieron al descubrir diferencias profundas entre los fenotipos de ancianos y centenarios en los que la dinámica de la interacción entre microbiota intestinal y el hospedador y un equilibrio neutro de respuestas inflamatorias están mucho más pronunciados en el fenotipo de longevidad.

10 Los inventores han caracterizado, mediante el uso de metabolómica basada en RMN-EM complementaria y enfoque lipídico, tanto en orina como en suero y el fenotipo metabólico (metabotipo) del envejecimiento y la longevidad.

15 Los centenarios alcanzan los extremos de la esperanza de vida humana debido a una capacidad única para posponer la enfermedad y discapacidad hasta sus años tardíos de vida. Los parámetros clínicos clásicos presentan (Tabla 1) que los centenarios tienen una incidencia muy baja de resistencia a insulina, tienen valores antropométricos (IMC), metabólicos (colesterol, LDL-C, HDL-C, triglicéridos) que son óptimos para su edad. Además, su función cognitiva se midió usando el mini-examen de estado mental (MMSE), que presenta baja incidencia de deterioro cognitivo grave.

20 Específicamente los centenarios presentan un fenotipo metabólico único. El perfil metabólico de orina reveló que el fenotipo de longevidad está altamente influido por el microbioma intestinal representado por una mayor excreción de fenilacetilglutamina (PAG), p-cresol sulfato (PCS). Los inventores postulan que la microbiota intestinal cataboliza exhaustivamente proteína y aminoácidos aromáticos, incluyendo fenilalanina y tirosina para formar fenilacetilglutamina y p-cresol sulfato.

25 El análisis metabonómico dirigido basado en EM exhaustivo reveló cambios biológicos importantes asociados con la longevidad y el envejecimiento sano en suero. Además, entre los tres grupos de edad los centenarios son un modelo de longevidad atractivo para caracterizar ya que alcanzan los extremos de la esperanza de vida humana debido a una capacidad única para posponer la enfermedad y discapacidad en sus años tardíos de vida. Dentro de la progresión de edad los inventores vieron una reducción de las lisofosfatidilcolinas (LPC 18:2, LPC 20:4), siendo su concentración más reducida en centenarios. Específicamente, la reducción de LPC 18:0 parece ser específica de centenarios. Aunque es imperativo observar que LPC tiene diferentes especies basándose en la longitud de cadenas de ácidos grasos y grado de saturación, con diferentes propiedades físicas y biológicas, los fosfolípidos son en general proinflamatorios [Aiyar N, et al., Mol Cell Biochem. 2007;295:113-120], con propiedades aterógenas [Schmitz G, et al., Atherosclerosis. 2010;208:10-18], y sus niveles aumentados se ven con frecuencia en pacientes con diabetes de tipo de 2 Rabini RA, et al., Diabetes. 1994;43:915-919].

35 Con respecto a los ancianos, los centenarios presentan un cambio equilibrado de la concentración de varias especies de acil-éter PC con contenidos de tres especies de PC-O, PC-O 34:3, PC-O 36:4, PC-O 40:1 reducidas significativamente y dos especies de éter PC, PC-O 32:1, PC-O 34:1, que son significativamente mayores. Aunque el papel fisiológico de los éter fosfolípidos se entiende menos, los plasmalógenos que contienen un enlace de éter vinilo que une la cadena alifática sn-1 con la cadena principal de glicerol son los éter fosfolípidos más abundantes. Aquí, las diferencias en los niveles de especies de acil-éter fosfatidilcolina podrían deberse a diferencias en el tratamiento del daño oxidativo.

45 Dentro de la progresión de edad, se ve un aumento en la especie de esfingomielina (SM) con aumento notable de 24:1 y SM16:0. No obstante, los inventores han descubierto una concentración reducida específica de SM24:0 y SM-OH 22:1 en centenarios. Las especies de SM son constituyentes de una membrana celular importante que están asociados estrechamente con el colesterol en la construcción, el metabolismo y el transporte, y que están enriquecidos en balsas lipídicas. El papel fisiológico de SM aún no está claro ya que estudios previos han mostrado la relación entre niveles de SM elevados y aterosclerosis [Kummerow FA, et al., J Nutr Biochem. 2001; 12:602-607], mientras que otros presentaron que los niveles de esfingomielina en plasma no estaban asociados con riesgo aumentado de acontecimientos de CVD. Finalmente, aunque no hay ningún cambio significativo para los niveles de la mayoría de especies de diacil-fosfatidilcolina (PC-O), los centenarios presentan alteraciones en los niveles individuales de PC-O 36:2.

55 Los cambios en los contenidos de PC y PC-O podrían influir en la actividad de la síntesis de metabolitos de ácido araquidónico (prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos) que son mediadores y reguladores clave de las reacciones fisiológicas de hospedadores, implicados en el estrés oxidativo, la apoptosis y la modulación de las funciones inflamatoria e inmunitaria. De hecho, los centenarios presentan también una red equilibrada única de mediadores lipídicos con propiedades tanto anti como proinflamatorias.

60 En comparación con los ancianos, se vio una mayor concentración de leucotrienos, LTB-4 y LTE-4. Los centenarios presentan mayor nivel de ácido 15-hidroxi-eicosatetraenoico (15-HETE), un producto importante de la enzima 15-lipoxigenasa (15-LOX). 15-HETE inhibe la formación de 5-lipoxigenasa, reduce la producción de leucotrieno B4 y 12-HETE y suprime reacciones inmunitarias. En comparación con los ancianos, también se ve aumento de la activación de la ruta de CYP en centenarios, con aumento de la generación de 8,9-EpETrE y reducción de la concentración de 11,12-DiHETrE. EpETrE son componentes importantes de mucha señalización intracelular en tejidos tanto cardíacos

como extracardíacos. Los estudios han mostrado que EpETrEs presentan efectos antiinflamatorios inhibiendo la activación de la transcripción génica mediada por factor nuclear (NF)-κB. Además, presentan propiedades trombolíticas y angiogénicas dentro de la vasculatura. EpETrEs pueden metabolizarse adicionalmente por epoxi hidrolasa soluble (sEH) a ácidos dihidroxi-eicosatrienoicos (DiHETrE).

5 En general, cuando se metabolizan EpETrEs a DiHETrEs por sEH, sus actividades biológicas se hacen menos pronunciadas, por lo tanto, aquí la reducción de la concentración de 11,12-DHET podría revelar reducción del efecto de sEH de su precursor 11,12-EpETrE. Los centenarios presentan una reducción notable de 9-HODE, molécula activa biológica, y un marcador de peroxidación de lípidos, y 9-oxo-HODE, un producto de oxidación estable de ácido linoleico, cuya generación está aumentada cuando aumenta el estrés oxidativo. La mayoría del ácido linoleico existe en formas esterificadas como PC y colesterol linoleato, ambos son componentes importantes de LDL, y se exponen continuamente a muchos tipos de estreses oxidativos para generar especies de hidroxilo e hidroperoxi.

10 Se detectaron previamente niveles aumentados de productos de oxidación de lípidos, tales como 9-oxo ODE en muestras de plasma de pacientes que padecen artritis reumatoide y arteroesclerosis.

15 Además, en comparación con los ancianos, los centenarios presentan agotamiento de ácido eicosopentanoico (EPA). Mientras que EPA puede sintetizarse en seres humanos a partir de ácido alfa-linoleico o en mayor cantidad directamente a partir de pescado oleoso o de suplementos de aceite de pescado, EPA puede transformarse en n-3 eicosanoides que tienen diversas funciones. Un agotamiento de EPA podría presentar un aumento de la biosíntesis de n-3 eicosanoides.

20 En consecuencia la presente invención se refiere en parte a un método para diagnosticar un estilo de vida que permite retardar y/o evitar trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento, que comprende

25

- obtener 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,

30 en el que el valor de referencia predeterminado se basa en un nivel de SM-OH 22:1 en suero promedio en una población de control, y en el que un nivel de SM-OH 22:1 en suero menor en la muestra en comparación con el valor de referencia predeterminado indica una mayor probabilidad de retardar y/o evitar los trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento.

35 Este método tiene por ejemplo la ventaja de que la obtención de suero de un sujeto es un procedimiento bien establecido. El método de diagnóstico real puede llevarse a cabo en una muestra de suero fuera del cuerpo.

40 El nivel de hidroxilo-esfingomielina 22:1 en la muestra puede detectarse y cuantificarse por cualquier medio conocido en la técnica. Por ejemplo, puede usarse espectroscopia de masas, por ejemplo, UPLC-ESI-EM/EM, o espectroscopia de RMN, por ejemplo, espectroscopia de ¹H-RMN. También pueden usarse otros métodos, tales como otros métodos espectroscópicos, métodos cromatográficos, técnicas de marcaje o métodos químicos cuantitativos.

45 El valor de referencia predeterminado se basa en un nivel promedio de hidroxilo-esfingomielina 22:1 en suero en una población de control. La población de control puede ser un grupo de al menos 3, preferentemente al menos 10, más preferentemente al menos 50 personas con un fondo genético, una edad y un estado de salud promedio similares.

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

55 Los expertos en la materia conocen bien trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento típicos. Una gran parte del fenotipo de envejecimiento se explica por un desequilibrio entre las redes inflamatorias y anti-inflamatorias, que da como resultado un estado proinflamatorio crónico de grado bajo de envejecimiento, "inflamo-envejecimiento" (Candore G., et al., Biogerontology. Oct 2010; 11(5):565-73).

60 Son trastornos inflamatorios relacionados con la edad típicos arteroesclerosis, artritis, diabetes de tipo 2, demencia, osteoporosis y enfermedades cardiovasculares, por ejemplo. Por ejemplo, para estos trastornos la información se ve como una posible base subyacente para las alteraciones moleculares que ligan el envejecimiento y los procesos patológicos relacionados con la edad (Chung et al., ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING, volumen 8, números 3 y 4, 2006, 572-581).

La hidroxilo-esfingomielina (SM-OH) 22:1 puede usarse como el único marcador para el fin de la presente invención.

Aunque SM-OH 22:1 como el único marcador es eficaz como una herramienta para el método de diagnóstico de la presente invención, la calidad y/o la potencia predictiva de dicho diagnóstico se mejorará, si el diagnóstico se basa en más de un solo marcador.

5 Por lo tanto, uno o más marcadores adicionales para la probabilidad de retardar y/o evitar trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento pueden usarse en combinación con SM-OH 22:1.

Los inventores se sorprendieron al ver que también pueden usarse otros biomarcadores para detectar la probabilidad de retardar y/o evitar trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento.

10

Como tal los inventores han identificado que mayores concentraciones en suero de

15 1-O-alkil-2-acilglicerofosfolina (PC-O) 32:1,
1-O-alkil-2-acilglicerofosfolina (PC-O) 34:1,
Ácido 15-hidroxi-eicosatetraenoico (15-HpETE),
Leucotrieno E4 (LTE4),
Leucotrieno B4 (LTB4), y/o
8,9-epoxieicosatrienoico (8,9 EpETre)

20 permiten diagnosticar un estilo de vida que permite retardar y/o evitar trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento mientras que la reducción de las concentraciones en suero de

25 Lisofosfatidilcolinas (LPC) 18:0,
Esfingomielina (SM) 24:0,
1-O-alkil-2-acilglicerofosfolina (PC-O) 34:3,
1-O-alkil-2-acilglicerofosfolina (PC-O) 36:4,
1-O-alkil-2-acilglicerofosfolina (PC-O) 40:1,
Fosfatidilcolina (PC) 36:2,
30 Ácido hidroxi-octadecadienoico (9-HODE),
Ácido 9-oxo-octadecadienoico (9-oxo-HODE), y/o
Ácido 11,12-epoxieicosatrienoico (11,12-DiHETre) permite diagnosticar un estilo de vida que permite retardar y/o
evitar trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento.

35 Las especies lipídicas individuales se indicaron de la siguiente manera:

[clase de lípido] [número total de átomos de carbono]:[número total de dobles enlaces]. Por ejemplo, PC 34:1 refleja una especie de fosfatidilcolina que comprende 34 átomos de carbono y un doble enlace.

40 En consecuencia, en el método de la presente invención la precisión de diagnóstico puede aumentarse evaluando también 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 aumenta en suero y/o si la concentración de uno o más de los siguientes biomarcadores 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 reduce en suero, en comparación con un valor de referencia previamente obtenido.

45 El método de la presente invención puede comprender la evaluación de al menos dos, 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7 o al menos 8 biomarcadores.

Por ejemplo, puede evaluarse SM-OH 22:1 junto con LPC 18:0.

50 SM-OH 22:1 puede evaluarse también junto con SM 24:0.

SM-OH 22:1 puede evaluarse también con PC-O 34:1.

55 SM-OH 22:1 puede evaluarse también con LTE4.

SM-OH 22:1 puede evaluarse también con PC-O 40:1.

SM-OH 22:1 puede evaluarse también con LPC 18:0 y SM 24:0.

60 SM-OH 22:1 puede evaluarse también con LPC 18:0, SM 24:0 y PC-O 40:1.

SM-OH 22:1 puede evaluarse también con LPC 18:0, SM 24:0, PC-O 40:1 y 9-HODE.

SM-OH 22:1 puede evaluarse también con LPC 18:0, SM 24:0, PC-O 40:1, 9-HODE y 9-oxo-HODE.

65 SM-OH 22:1 puede evaluarse también con LPC 18:0, SM 24:0, PC-O 40:1, 9-HODE, 9-oxo-HODE y PC-O 34:1.

SM-OH 22:1 puede evaluarse también con LPC 18:0, SM 24:0, PC-O 40:1,9-HODE, 9-oxo-HODE, PC-O 34:1, y LTE4.

5 La ventaja de evaluar más de un biomarcador es que cuantos más biomarcadores se evalúen más fiable será el diagnóstico. Si, por ejemplo, más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, o 7 biomarcadores muestran los aumentos o las reducciones en la concentración como se ha descrito anteriormente, esto es un fuerte indicio de una mayor probabilidad de retardar y/o evitar trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento.

10 En consecuencia, el método de la presente invención puede comprender además determinar el nivel de al menos uno de LPC 18:0, SM 24:0, PC-O 40:1,9-HODE, 9-oxo-HODE, PC-O 34:1 o LTE4 en la muestra, y comparar el nivel del sujeto de al menos uno de LPC 18:0, SM 24:0, PC-O 40:1,9-HODE, 9-oxo-HODE, PC-O 34:1 o LTE4 con un valor de referencia predeterminado, en el que el valor de referencia predeterminado se basa en el nivel de LPC 18:0, SM 24:0, PC-O 40:1, 9-HODE, 9-oxo-HODE, PC-O 34:1 o LTE4 en suero promedio en una población de control, y en el que un nivel de SM-OH 22:1 en suero menor en la muestra y/o un nivel de LPC 18:0, SM 24:0, PC-O 40:1, 9-HODE, o 9-oxo-HODE en suero menor en la muestra en comparación con los valores de referencia predeterminados indican una mayor probabilidad de retardar y/o evitar trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento y/o en el que los niveles de PC-O 34:1 y/o LTE4 en suero elevados en la muestra en comparación con los valores de referencia predeterminados indican una mayor probabilidad de retardar y/o evitar trastornos inflamatorios cónicos relacionados con el envejecimiento.

20 La precisión del diagnóstico de la presente invención puede aumentarse adicionalmente evaluando también si uno o más de los siguientes biomarcadores PC-O 32:1, 15-HpETE, LTB4, 8,9 EpETre está aumentado en 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 está reducido en suero, en comparación con un valor de referencia previamente obtenido.

25 El método de la presente invención puede usarse adicionalmente o como alternativa para diagnosticar un estilo de vida que permita un envejecimiento sano y/o más sano.

30 El envejecimiento más sano puede diagnosticarse comparando los niveles de PAG y/o PCS reales con valores de referencia predeterminados, que se obtuvieron previamente del mismo sujeto. Por lo tanto, en este caso, el mismo sujeto actuará como población de control y las mejoras en el estilo de vida pueden verse directamente, eliminando al mismo tiempo las incertidumbres que se originan de condiciones ligeramente diferentes para otras poblaciones de control promedio.

35 El método de la presente invención también puede usarse para diagnosticar la longevidad; y/o la probabilidad de longevidad. Esto tiene la ventaja de que las consecuencias de un estilo de vida más sano pueden detectarse directamente, puede supervisarse el mantenimiento de un estilo de vida sano y puede corregirse un estilo de vida poco sano antes de que se produzcan las primeras manifestaciones clínicas de un estilo de vida poco sano.

40 El método de la presente invención puede usarse además como alternativa y/o adicionalmente al diagnóstico de interacciones de microflora intestinal-hospedador más sana. El microbioma intestinal realiza numerosas funciones bioquímicas importantes para el hospedador, y los trastornos del microbioma están asociados con muchos procesos de enfermedad humana diversos (Kinross et al., Genome Medicine 2011,3:14). La interacción de microflora intestinal-hospedador desfavorable puede tener muchas manifestaciones clínicas, tales como patologías sistémicas, por ejemplo, obesidad y enfermedad cardiovascular; o afecciones intestinales, por ejemplo, enfermedad inflamatoria del intestino.

50 Las interacciones de microflora intestinal-hospedador pueden diagnosticarse en cualquier sujeto, pero pueden ser particularmente importantes para supervisar las interacciones de microflora-hospedador sanas en adultos o en ancianos.

Por lo tanto, las interacciones de microflora intestinal-hospedador más sanas pueden diagnosticarse en los ancianos.

55 Un sujeto se considera "anciano" si ha superado la primera mitad de su esperanza de vida promedio esperada en su país de origen, preferentemente, si ha superado los primeros dos tercios de la esperanza de vida esperada promedio en su país de origen, más preferentemente se han superado los primeros tres cuartos de la esperanza de vida esperada promedio en su país de origen, más preferentemente se han superado los primeros cuatro quintos de la esperanza de vida esperada promedio en su país de origen.

60 Por ejemplo, si el sujeto es un ser humano, el método de la presente invención puede ser para llevar a cabo en adultos de al menos 45 años de edad, al menos 60 años de edad o al menos 75 años de edad.

65 El sujeto para ensayar con el método de la presente invención puede ser un ser humano o un animal, en particular un mamífero, por ejemplo. Los animales típicos pueden ser animales de compañía tales como gatos o perros o animales de granja, por ejemplo.

- 5 El método de la presente invención puede usarse adicionalmente como alternativa para detectar las consecuencias de un cambio en el estilo de vida. Aquí puede ser ventajoso si el nivel de SM-OH 22:1 y opcionalmente los niveles de los otros biomarcadores mencionados en el presente documento se comparan con el nivel de SM-OH 22:1 y opcionalmente los niveles de los otros biomarcadores obtenidos previamente en el sujeto, por ejemplo, antes del cambio de estilo de vida o más temprano durante el cambio en el estilo de vida.
- 10 Por lo tanto, el método de la presente invención puede ser para diagnosticar un estilo de vida más sano, en el que los valores de referencia predeterminados se basan en el nivel de SM-OH 22:1 en suero y opcionalmente los niveles de los otros biomarcadores obtenidos del sujeto antes de un cambio en el estilo de vida.
- 15 El cambio en el estilo de vida puede ser cualquier cambio, tal como un trabajo diferente, más sueño, menos alcohol, más retos, menos tensión, fumar menos, más deporte, un ambiente de trabajo y/o vida diferente, por ejemplo.
- El cambio de estilo de vida también puede ser un cambio en la dieta.
- 20 El cambio en la dieta puede ser por ejemplo el uso de al menos un producto nutricional que previamente no se ha consumido o se ha consumido en cantidades diferentes.
- Como tal, el método de la presente invención puede usarse para ensayar la eficacia de un nuevo régimen nutricional, de productos nutricionales y/o de medicamentos.
- 25 Los productos nutricionales pueden ser por ejemplo productos que se ha reivindicado que tienen un efecto en el envejecimiento sano y/o en evitar trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento.
- Típicamente, los productos nutricionales pueden ser productos alimentarios, bebidas, productos alimentarios para mascotas, suplementos alimentarios, nutraceuticos, aditivos alimentarios o fórmulas nutricionales.
- 30 El nivel de los biomarcadores, tales como el nivel de SM-OH 22:1 y opcionalmente los niveles de los otros biomarcadores en la muestra pueden detectarse y cuantificarse por cualquier medio conocido en la técnica. Por ejemplo, puede usarse espectroscopia de masas, por ejemplo, UPLC-ESI-EM/EM, o espectroscopia de RMN, por ejemplo, espectroscopia de ¹H-RMN.
- También pueden usarse otros métodos, tales como otros métodos espectroscópicos, métodos cromatográficos, técnicas de marcaje o métodos químicos cuantitativos.
- 35 El método de la presente invención comprende comparar niveles del nivel de SM-OH 22:1 y opcionalmente los otros biomarcadores de un sujeto de ensayo para valores de referencia predeterminados que pueden derivar del nivel de SM-OH 22:1 en suero y opcionalmente los niveles de otros biomarcadores de sujetos de control comparables.
- 40 El alcance de la diferencia entre el nivel de SM-OH 22:1 del sujeto y opcionalmente el nivel de los otros biomarcadores y el valor de control correspondiente también es útil para caracterizar el alcance del riesgo y por lo tanto determinar qué sujetos se beneficiarían más de ciertas terapias.
- 45 El valor de referencia para SM-OH 22:1 y opcionalmente para los otros biomarcadores se mide preferentemente usando las mismas unidades usadas para caracterizar el nivel de SM-OH 22:1 y opcionalmente los otros biomarcadores obtenidos del sujeto de ensayo. Por lo tanto, si el nivel de la SM-OH 22:1 y opcionalmente los otros biomarcadores es un valor absoluto tal como las unidades de SM-OH 22:1 en $\mu\text{mol/l}$ (μM) el valor de referencia también se basa en las unidades de SM-OH 22:1 en $\mu\text{mol/l}$ (μM) en individuos en la población general o una población de sujetos de control seleccionada.
- 50 Además, el valor de referencia puede ser un único valor de punto de corte, tal como una mediana o una media. Los valores de referencia de SM-OH 22:1 y opcionalmente los otros biomarcadores en muestras de suero obtenidas, tales como niveles medios, mediana de los niveles o niveles de "punto de corte", pueden establecerse ensayando una gran muestra de individuos en la población general o la población seleccionada y usando un modelo estadístico tal como el método de valor predictivo para seleccionar un criterio de positividad o curva característica receptora operadora que define la especificidad óptima (la tasa de verdadero negativo más alta) y sensibilidad (tasa de verdadero positivo más alta) como se describe en Knapp, R. G., y Miller, M. C. (1992). *Clinical Epidemiology and Biostatistics*. William y Wilkins, Harual Publishing Co. Malvern, Pa.
- 55 Los expertos en la materia sabrán cómo asignar valores de referencia correctos ya que variarán según el sexo, la raza, la herencia genética, el estado de salud o la edad, por ejemplo.
- 60 Por ejemplo, los valores medios de referencia predeterminados pueden ser
- 65 - 2 μM para 1-O-alkil-2-acilglicerofosfolina (PC-O) 32:1,
- 7,80 μM para 1-O-alkil-2-acilglicerofosfolina (PC-O) 34:1,

- 1,25 ng/100 µl de suero para ácido 15-hidroxi-eicosatetraenoico (15-HpETE),
- 0,013 ng/100 µl de suero para Leucotrieno E4 (LTE4),
- 0,020 ng/100 µl de suero para Leucotrieno B4 (4LTB), y/o
- 0,070 ng/100 µl de suero para 8,9-epoxieicosatrienoico (8,9 EpETre)
- 5 - 16,07 µM para Hidroxi-Esfingomielina (SM-OH) 22:1,
- 52,00 µM para Lisofosfatidilcolinas (LPC) 18:0,
- 25,00 µM para Esfingomielina (SM) 24:0,
- 5,07 µM para 1-O-alkuil-2-acilglicerofosfocolina (PC-O) 34:3,
- 14,30 µM para 1-O-alkuil-2-acilglicerofosfocolina (PC-O) 36:4,
- 10 - 1,41 µM para 1-O-alkuil-2-acilglicerofosfocolina (PC-O) 40:1,
- 10,00 µM para Fosfatidilcolina (PC) 36:2,
- 0,34 ng/100 µl de suero para ácido hidroxi-octadecadienoico (9-HODE),
- 0,043 ng/100 µl de suero para ácido 9-oxo-octadecadienoico (9-oxo-HODE), y/o
- 0,017 ng/100 µl de suero para ácido 11,12-epoxieicosatrienoico (11,12-DiHETre).

15 Los valores mayores o menores son indicativos de un aumento de la probabilidad para retardar y/o evitar trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento, como se ha detallado anteriormente.

20 Los presentes inventores también se sorprendieron al descubrir biomarcadores adicionales en orina para diagnosticar un estilo de vida que permite retardar y/o evitar trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento.

25 Como tales, los inventores han identificado que el aumento de las concentraciones en orina de fenilacetilglutamina (PAG) y/o p-cresol sulfato (PCS) permiten diagnosticar un estilo de vida que permite retardar y/o evitar trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento.

Pueden evaluarse fenilacetilglutamina (PAG) y/o p-cresol sulfato (PCS) siguiendo el método de la presente invención, siendo la única diferencia que se usa una muestra de orina.

30 Una muestra de orina tiene la ventaja de que puede obtenerse y analizarse de forma no invasiva.

Los valores de referencia predeterminados para PAG y PCS pueden determinarse por los expertos en la materia y pueden variar dependiendo de las circunstancias. Por ejemplo, los valores de referencia típicos pueden ser de 63 µmol/mmol de creatinina para PCS y 81 µmol/mmol de creatinina para PAG en orina. Valores mayores son indicativos de una mayor probabilidad de retardar y/o evitar trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento.

40 La presente invención también se extiende al descubrimiento de un nuevo biomarcador que puede usarse en el diagnóstico de un estilo de vida que permite retardar y/o evitar trastornos inflamatorios crónicos del envejecimiento.

En consecuencia, la presente invención comprende un biomarcador para el diagnóstico de un estilo de vida que permite retardar y/o evitar trastornos inflamatorios crónicos de envejecimiento, en el que el biomarcador es SM-OH 22:1.

45 Este biomarcador puede detectarse en suero, que tiene la ventaja de que pueden obtenerse muestras para ensayar fácilmente, posiblemente mientras se analiza el suero para otros fines.

50 Los expertos en la materia entenderán que pueden combinar libremente todas las características de la presente invención descrita en el presente documento, sin alejarse del alcance de la invención desvelado. En particular, los elementos descritos para el método de la presente invención pueden aplicarse al biomarcador de la presente invención y viceversa.

Los expertos en la materia también entenderán que aunque los biomarcadores y su aplicación en un método de diagnóstico se describen en el documento como

- 55 - diagnosticar un estilo de vida que permite retardar y/o evitar trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento,
- diagnosticar un estilo de vida que permite un envejecimiento sano,
- diagnosticar la longevidad y/o
- 60 - diagnosticar interacciones de microflora intestinal-hospedador más sanas, los biomarcadores pueden aplicarse igualmente bien en un método para
- diagnosticar un estilo de vida que favorece el desarrollo de trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento,
- diagnosticar un estilo de vida que probablemente evite envejecimiento sano,
- 65 - diagnosticar un riesgo para una esperanza de vida acortada y/o
- diagnosticar interacciones de microflora intestinal-hospedadores menos sanas.

En aspectos adicionales, la presente invención proporciona métodos para:

- retardar, evitar y/o prevenir el desarrollo de trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento,
- promover el envejecimiento sano,
- 5 - promover la longevidad,
- reducir un riesgo de una esperanza de vida acortada,
- promover interacciones de microflora intestinal-hospedador más sanas y/o
- prevenir interacciones de microflora intestinal-hospedadores menos sanas.

10 Típicamente dichos métodos comprenden una etapa de realizar un método de diagnóstico como se describe en el presente documento en un sujeto; y modificar un estilo de vida del sujeto basándose en un resultado del mismo. Por ejemplo, el método puede comprender modificar un estilo de vida del sujeto si un resultado de la etapa de diagnóstico indica:

- 15 - un aumento de la probabilidad de desarrollo de trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento,
- un estilo de vida que probablemente evite envejecimiento sano,
- un riesgo de esperanza de vida acortada y/o
- interacciones de microflora intestinal-hospedador menos sanas;

20 en el sujeto.

La modificación del estilo de vida en el sujeto puede ser cualquier cambio como se describe en el presente documento, por ejemplo un cambio en la dieta, un trabajo diferente, más sueño, menos alcohol, más retos, menos tensión, fumar menos, más deporte, un ambiente de trabajo y/o vida diferente, por ejemplo.

Preferentemente, el cambio es el uso de al menos un producto nutricional que previamente no se consumía o se consumía en cantidades diferentes, por ejemplo un producto nutricional que tiene un efecto en el envejecimiento sano y/o en evitar trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento (incluyendo productos alimentarios, bebidas, productos alimentarios de mascotas, suplementos alimentarios, nutracéuticos, aditivos alimentarios o fórmulas nutricionales).

La modificación de un estilo de vida del sujeto también incluye indicar la necesidad de que el sujeto cambie su estilo de vida, por ejemplo, recetar, promover y/o proponer un cambio de estilo de vida como se ha descrito anteriormente al sujeto. Por ejemplo, el método puede comprender una etapa de administrar o proporcionar al menos un producto nutricional como se ha descrito anteriormente al sujeto.

Ventajas y elementos adicionales de la presente invención son evidentes a partir de las siguientes Tablas, Ejemplos y Figuras.

40 La Tabla 1 muestra características clínicas, demográficas, de la cohorte de envejecimiento reclutada. Los valores se presentan como la media (\pm DT) con el intervalo entre paréntesis. ¹IMC= índice de masa corporal, ²Diabetes mellitus: historial de diabetes, glucosa en plasma en ayunas \geq 126 mg/dl, ³HDL= lipoproteína de alta densidad, ⁴LDL= lipoproteína de baja densidad, ⁵MMSE= Medida de la función cognitiva usando el Mini-Examen de Estado Mental (MMSE). La puntuación usada en el análisis se corrigió por edad y años de educación para personas mayores. MMSE para alteración cognitiva en ancianos se clasificó como grave (puntuación 0-17), leve (puntuación 18-23) o no presente (puntuación 24-30). MMSE para centenarios \geq 20 ausencia de deterioro cognitivo grave; $<$ 12 presencia de deterioro cognitivo grave. ⁶CRP = proteína C reactiva. ⁷A-SAA = proteínas amiloides A en suero (SAA).

50 La Tabla 2 presenta un sumario de características y modelos para el modelo diferenciador entre los grupos de envejecimiento seleccionados.

La Tabla 3 muestra todos los metabolitos regulados significativamente en orina para los 3 grupos de edad detectados por ¹H-RMN. Para obtener información semi-cuantitativa, se integraron áreas pico en los espectros originales para estos tres metabolitos y las diferencias con la significación estadística se confirmaron usando ensayo de Suma de Rangos de Wilcoxon y se marcaron de la siguiente manera *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

60 La Tabla 4 presenta todos los metabolitos regulados significativamente en suero sanguíneo para los 3 grupos de edad detectados por CL-EM. Los valores se expresan como los valores medios \pm DT, y se marcan de la siguiente manera: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

La Tabla 5 presenta niveles de concentración (ng/100 μ l) de marcadores inflamatorios en suero para los 3 grupos de edad analizados mediante UPLC-ESI-EM/EM, y marcados de la siguiente manera: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

65 La Figura 1 representa perfiles de 600 Mhz en orina típicos de la cohorte de envejecimiento que presenta picos que surgen de moléculas de bajo peso molecular importantes, tales como cuerpos de cetona, ácidos orgánicos,

aminoácidos, así como metabolitos que derivan de metabolismo tanto de mamífero como microbiano intestinal (PAG y PCS).

5 La Figura 2 muestra puntuación de OPLS-DA (A) de espectros de ^1H -RMN en orina de ancianos y centenarios (B) de adultos jóvenes y centenarios.

La Figura 3 muestra representación de coeficiente derivado de espectros de ^1H -RMN en orina de ancianos y centenarios.

10 La Figura 4 muestra representaciones de caja sobre información semi-cuantitativa, derivada de áreas pico (área bajo la curva) en los espectros originales para PAG y PCS. La significación estadística se confirmó usando ensayo de Suma de Rangos de Wilcoxon y se enumeró en la tabla 3.

15 La Figura 5a, 5b muestra diferencias en los perfiles lipidómicos (concentraciones de lípidos media) entre los tres puntos temporales de envejecimiento medidos por análisis metabonómico de UPLC-ESI-EM/EM diana. Las representaciones de caja representan cambios de izquierda a derecha que indican individuos centenarios, ancianos y jóvenes. La concentración está en μM . Los valores medios \pm DT a partir de la EM dirigida en los tres grupos de envejecimiento y la significación estadística se confirmaron usando ensayo de Suma de Rangos de Wilcoxon y se enumeran en la tabla 4. Solamente se presentan diferencias significativas y se evaluaron mediante ensayo de U de Mann-Whitney.

20 La Figura 6 muestra diferencias en los perfiles lipidómicos (los resultados se expresan en $\text{ng}/100\ \mu\text{l}$ y representan concentraciones lipídicas medias) entre los tres puntos temporales de envejecimiento medidos por análisis metabonómico de UPLC-ESI-EM/EM dirigido. Las representaciones de caja representan cambios de izquierda a derecha que indican individuos centenarios, ancianos y jóvenes. Los valores medios \pm DT de la EM dirigida en los tres grupos de envejecimiento y la significación estadística se confirmaron usando ensayo de Suma de Rangos de Wilcoxon y se enumeran en la tabla 5. Solamente se presentan diferencias significativas y se evaluaron por ensayo de U de Mann-Whitney.

30 Ejemplos:

Sujetos y grupos de estudio

35 Cada individuo y su familia proporcionaron consentimiento informado para que se realizara el estudio. En general, se admitieron 541 sujetos que pertenecían a diferentes grupos de edad para este estudio en el norte de Italia que incluye Bolonia, Florencia, Parma, Milán. Los centenarios estaban compuestos por 156 individuos (125 mujeres y 31 hombres), el grupo anciano estaba compuesto por 363 individuos (205 mujeres y 158 hombres), el grupo de adultos jóvenes estaba compuesto por 22 individuos (10 mujeres y 12 hombres).

40 El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Universitario de Sant'Orsola-Malpighi (Bolonia, Italia). Las muestras biológicas resultantes (suero y orina) se almacenaron a $-80\ ^\circ\text{C}$ hasta su análisis metabolómico.

45 Química clínica

Se midieron las concentraciones de colesterol de lipoproteína de alta densidad (HDL) y triglicéridos totales en suero con kits enzimáticos respectivos de Roche Diagnostics usando un autoanalizador (Roche Diagnostics Hitachi 917, Hitachi Ltd, Tokio, Japón). Se calcularon las concentraciones de colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDL) usando la fórmula de Friedewald (Friedewald WT, *et al.*, *Clinical Chemistry* 18 (6): 499-502). Se midieron las citocinas, incluyendo interferón gamma (IFN γ) de ratón, interleucina 1 beta (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10), interleucina 12 p70 (IL-12 p70), quimiocina derivada de queratinocitos (KC) y factor de necrosis tumoral (TNF), usando un kit múltiple pro-inflamatorio de ratón (Meso Scale Discoveries, Gaithersburg, Maryland, Estados Unidos). El ensayo se llevó a cabo según el manual del fabricante. Se midió la proteína C reactiva (CRP) de alta sensibilidad usando un ELISA de tipo sándwich de doble anticuerpo sensible con CRP de conejo anti-humano y CRP de conejo anti-humano conjugado con peroxidasa.

60 Preparación de muestras para Espectroscopia de ^1H -RMN. Se secó 1 ml de muestra de orina de los tres grupos de envejecimiento en un aparato de liofilización (Freeze-Dryer Fisher Scientific) y se ajustó a pH 6,8 usando 580 μl de una solución de tampón de fosfato (KH_2PO_4 , concentración final de 0,2 M) que contenía 3-trimetilsilil-[2,2,3,3-2H $_4$]-1-propionato de sodio (TSP) 1 mM y se introdujo en tubos de RMN de 5 mm. Se midieron los perfiles metabólicos en un espectrómetro Bruker Avance III 600 MHz equipado con una sonda criogénica de 5 mm inversa a 300 K (Bruker Biospin, Rheinstetten, Alemania). Para cada orina se registraron espectros de ^1H RMN usando secuencias por pulsos que incluían una detección de ^1H convencional con supresión de agua. Los espectros convencionales se adquirieron con un retardo de relajación de 4 s y un tiempo de mezclado t_m de 100 ms. Los espectros de ^1H RMN adquiridos se procesaron usando el paquete de software Topspin (versión 2:1; Bruker Biospin, Rheinstetten, Alemania) y tuvieron como referencia el patrón (TSP) a $\delta = 0,0$. La asignación de picos a metabolitos específicos se

consiguió usando una biblioteca interna de compuestos y la bibliografía y se confirmó por espectroscopia de RMN bidimensional convencional (JRES, TOCSY, HSQC, HMBC) en muestras seleccionadas.

Para análisis estadístico todos los espectros de RMN se convirtieron a puntos de datos de 12 K sobre el intervalo de δ 0,4-10,0 y se importaron en el software MATLAB (versión 7.11.0 (R2010b); The MathWorks Inc., Natick, MA) excluyendo el resto de agua (δ de agua =4,7120-4,84). Los espectros se normalizaron con respecto a la suma total de todas las intensidades dentro del intervalo especificado.

Separación de Muestras para Análisis por kit Biocrates Life Sciences AbsoluteIDQTM.

El kit Biocrates Life Sciences AbsoluteIDQTM se usó para muestras de suero de cohorte de envejecimiento seleccionada como 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. *Metabolomics*, 2011. Primero en línea). Se llevaron a cabo preparación de placas de pocillos y aplicación y extracción de muestras según las instrucciones del fabricante. Se cargó un volumen final de 10 μ l de suero en la placa de 96 pocillos proporcionada, que contenía patrones internos marcados de forma isotópica. Se realizó una cromatografía líquida en un sistema de cromatografía líquida de presión ultra alta (UHPLC) Dionex Ultimate 3000 (Dionex AG, Olten, Suiza) acoplado a un espectrómetro de masas 3200 Q TRAP (AB Sciex; Foster City, CA, Estados Unidos) equipado con una fuente de iones TurboV que actúa en modo de ionización por electropulverización (ESI). Se inyectaron extractos de muestras (20 μ l) dos veces (en modos ESI positivo y negativo) mediante infusión directa usando un intervalo de flujo de gradiente de 0-2,4 min: 30 μ l/min, 2,4-2,8 min: 200 μ l/min, 2,9-3 min: 30 μ l/min. Los parámetros de fuente de EM se ajustaron a: temperatura de desolvatación (TEM): 200 °C, alta tensión: -4500 V (ESI -), 5500 V (ESI +), gases en cortina (CUR) y nebulizador (GS1 y GS2): nitrógeno; 137,90, 275,79 y 344,74 kPa; respectivamente, presión de gas de colisión de nitrógeno: 0,47 kPa. La adquisición de EM/EM se realizó en modo de supervisión de reacción programada (SRM) con valores de potencial de desagrupamiento optimizados para los 163 metabolitos explorados en el ensayo. Los archivos de datos sin procesar (software Analyst, versión 1.5.1; AB Sciex, Foster City, CA, Estados Unidos) se importaron en el software de análisis proporcionado MetIQ para calcular concentraciones de metabolitos. La lista de todos los metabolitos detectables está disponible de Life Sciences, Austria (<http://biocrates.com>). Preparación de muestras y cuantificación de marcadores de inflamación mediante UPLC-ESI-EM/EM usando técnica de dilución de isótopos.

Basándose en trabajos previamente publicados (Naga, *et. al*, PROG. LIPID RESEARCH, 2001, 40, 199-299) se desarrolló de forma interna un método para medir un panel de 63 marcadores inflamatorios. Se homogeneizaron 300 μ l de muestras de suero de material biológico disponible restante de los tres grupos de edad (n=15 centenarios, n=30 ancianos, n=40 jóvenes adultos) con 10 μ l de tampón de BHT (hidroxitolueno butilado; PBS 79,2 mg/ml) usando el sistema FastPrep® 24. Para cada muestra se mezcló un total de 50 μ l de suero con 5 μ l de la solución de patrón interna (0,1 ng/ μ l). La mezcla se acidificó añadiendo 15 μ l de ácido cítrico (1N). Para precipitar las proteínas, se añadió un volumen de 550 μ l de metanol/etanol (1:1, v:v) y las muestras se mezclaron durante 15 min a 4 °C antes de centrifugarse (3500 rpm, 10 min, 4 °C). La fase orgánica se evaporó hasta su sequedad con flujo de nitrógeno constante y los residuos se solubilizaron con 80 μ l de agua, seguido de la adición de 20 μ l de acetonitrilo, antes de centrifugarse a 3500 rpm durante 1 min a 4 °C. El sobrenadante se transfirió después a viales de CL-EM antes de su análisis. Los análisis se llevaron a cabo por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (CL-EM/EM). CL se realizó en un sistema de cromatografía líquida de presión ultra (UPLC) Dionex Ultimate 3000 (Dionex AG, Olten, Suiza). La detección de EM se realizó en un espectrómetro de masas 5500 Q TRAP (AB Sciex; Foster City, CA, Estados Unidos) que actuaba en un modo ESI. Se realizó separación cromatográfica por gradiente en una columna Acquity BEH C18 (2,1 x 150 mm, 1,7 μ m; Waters, Milford, Estados Unidos). El volumen de inyección fue de 5 μ l y la columna se mantuvo a 50 °C. La fase móvil consistió en agua que contenía ácido acético 1 % (eluyente A) y acetonitrilo (eluyente B) a un caudal constante ajustado a 450 μ l/min. La elución del gradiente comenzó de 20 % de B con un aumento lineal hasta 50 % B a los 6 min, de 50 % a 95 % de B a los 13 min, mantenimiento durante 3 min a 95 % de B, antes de volver a 20 % de B a los 16,1 min y reequilibrado de la columna durante 11 min adicionales. Los analitos se supervisaron en el modo de supervisión de reacción seleccionada programado (SRM programado) dentro del software Analyst (versión 1.5.1; AB Sciex, Foster City, CA, Estado Unidos). Todos los parámetros de transiciones de masa y fuente de EM se proporcionan en datos complementarios. El tiempo de ventana de detección de SRM se ajustó a 120 s con un tiempo de exploración diana de 0,5 s. Se usó nitrógeno como gas en cortina y de desolvatación a la presión respectiva de CUR: 20, GS1: 70, GS2: 20 (unidad arbitraria). Se mantuvo una temperatura de fuente en bloque a 600 °C, con las tensiones respectivas: ISV: -4000 V, EP: -10 V, CXP: -5 V. Se realizó una curva de calibración de 15 puntos antes del análisis de muestras midiendo diferentes diluciones de la solución patrón (0-10 ng). Se realizó procesamiento de datos usando software Analyst (versión 1.5.1; AB Sciex, Foster City, CA, Estado Unidos). Se calculó la relación de área pico de cada analito frente a su patrón interno o marcador sustituto correspondiente. Cabe mencionar que PGJ2, PGF2a, PGE2, PGE1, 15-oxo-HETE, 15-desoxi- Δ 12,14-PGJ2, 6-ceto PGF1a y 5-oxo-ETE estaban por debajo de su límite de detección en muestras de suero y por lo tanto no se tuvieron en cuenta para análisis estadístico.

Análisis de datos multivariante (MVA)

Se realizó MVA en varios ambientes de software. Por lo tanto, se realizaron etapas de importación y pre-procesamiento de datos para datos tanto de ¹H RMN como de EM dirigida usando rutinas "internas" escritas en MATLAB (versión 7.11.0, The Mathworks Inc., Natick, MA, Estados Unidos). En análisis de datos de RMN se llevaron a cabo modelos de OPLS-DA usando el software SIMCA-P+ (versión 12.0, Umetrics AB, Umeå, Suecia). Se analizaron los datos de EM dirigidos por Random Forests usando el paquete 'randomForest' (A. Liaw y M. Wiener (2002). Classification and Regression by randomForest. R News 2(3), 18–22.) que se procesa en el ambiente R (R Development Core Team (2011). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>). Finalmente, también se realizaron ensayos de significación univariantes para confirmación en R. Características clínicas de la cohorte de envejecimiento.

Se muestran características físicas y bioquímicas de la cohorte de envejecimiento en la Tabla 1. IMC ($p < 0,001$), evaluación de modelo homeostático (HOMA) ($p < 0,001$), colesterol total ($p = 0,001$), triglicéridos ($p = 0,004$), HDL ($p = 0,001$) y LDL ($p = 0,04$) son menores en centenarios, mientras que proteínas amiloides A en suero (A-SAA) ($p < 0,001$) y proteína C reactiva (CRP) ($p < 0,001$) son mayores en centenarios, en comparación con ancianos. Los ancianos presentan mayor IMC ($p < 0,001$), colesterol total ($p < 0,001$), triglicéridos ($p < 0,001$), LDL ($p < 0,05$) y CRP ($p < 0,001$), en comparación con individuos jóvenes.

Se usó ¹H-RMN de 600 MHz en orina de las muestras disponibles de los tres grupos de envejecimiento (92 centenarios, 283 ancianos y 21 jóvenes adultos) para realización de perfiles metabólicos. Para explorar los cambios inducidos por la edad y las diferencias metabólicas entre los tres grupos de edad y minimizar cualquier efecto de la variabilidad de metabolitos no relevante, se aplicó análisis quimométrico supervisado del perfil de RMN en orina sobre el conjunto de datos de RMN de resolución completa de los tres puntos temporales. Se llevó a cabo Proyección Ortogonal en Estructuras Latentes – Análisis Diferenciador (OPLS-DA) en datos a escala de varianza unitaria (Figura 2). El modelo diferenciador entre grupos de centenarios y jóvenes adultos proporcionó un error de validación del clasificador (expresado como área bajo la curva ROC, (Fawcett, T., An introduction to ROC analysis, Pattern Recogn. Lett., 2006, 27: 861-874) de 1,0 usando 13,7 % de la varianza espectral (R^2X) (Tabla 2). De forma similar, el modelo entre grupos de centenarios y ancianos generó un modelo con un error de validación de AuROC de 0,93 usando de nuevo 13,7 % de la varianza X total (Tabla 2). Para determinar las identificaciones metabólicas asociadas con las diferencias entre grupos de edad, se usaron cargas del primer componente predictivo del modelo OPLS-DA, clasificado por colores según el coeficiente de correlación de la variable [30] (Figura 3). En consecuencia, el modelo diferenciador de orina entre centenarios e individuos ancianos presenta una cantidad relativamente mayor de fenilacetilglutamina (PAG), p-cresol-sulfato (PCS). Para obtener información semi-cuantitativa, se integraron áreas pico en el espectro original para estos tres metabolitos y se confirmaron las diferencias con significación estadística usando ensayo de Suma de Rangos de Wilcoxon (Figura 4, Tabla 3). Juntos, los resultados presentan que la microbiota intestinal está altamente implicada en el proceso de longevidad. La metabonomía de CL-EM dirigida y cuantitativa presentó cambios metabólicos asociados con el envejecimiento en suero.

Para determinar las diferencias metabólicas relacionadas con la edad en suero se aplicó un enfoque metabonómico de CL-EM/EM dirigido en las muestras biológicas disponibles de los 3 grupos de envejecimiento (143 centenarios, 90 ancianos y 20 adultos jóvenes). Se realizó análisis de datos multivariante usando Random Forests (RFTM) (Breiman, L., Random Forests, Machine Learning, 2001, 45: 5-32) en datos semi-cuantitativos preprocesados en 160 metabolitos, incluyendo aminoácidos, azúcares, acilcarnitinas, esfingolípidos y glicerofosfolípidos. Usando el elemento de importancia variable implementado en RFTM, fue posible determinar la identificación metabólica que diferencia mejor los tres grupos de envejecimiento. Para evaluar la capacidad diferenciadora individual de cada componente de la identificación, se realizaron ensayos de suma de Rangos de Wilcoxon entre los grupos de edad (todos los metabolitos regulados significativamente se enumeran en la Tabla 4). Aunque la concentración general de glicerofosfolípidos y esfingolípidos aumenta y se reduce dependiendo de la composición de ácidos grasos, tres tendencias uniformes se hacen evidentes: conjunto de compuestos que aumentan o se reducen (estadísticamente válidos) con la edad tal como reducción de la concentración de lisofosfatidilcolinas (LPC 18:2, LPC 20:4), aumento de niveles de PC 32:0 y aumento de la concentración de esfingomielinas (SM 24:1, SM 16:0); (ii) conjunto de compuestos específicos para centenarios solamente, sin O 40:1, PC 36:2) y aumento de cambios estadísticos específicos entre individuos ancianos y jóvenes, como reducción de esfingomielinas y glicerofosfolípidos específicos (SM-OH 22:1, LPC 18:0, SM 24:0, PC-O 34:3, PC-O 36:4, PC- glicerofosfolípidos (PC-O 32:1, PC-O 34:1).

Además, sobre las muestras de suero disponibles restantes de los 3 grupos de envejecimiento (12 centenarios, 37 ancianos y 18 jóvenes adultos) se empleó un método de CL-EM/EM dirigido para investigar los cambios de concentración en síntesis de eicosanoides. Aquí, RFTM sobre datos cuantitativos presentó cambios relevantes estadísticos entre los tres grupos de edad (Figura 6). Las significaciones estadísticas entre los grupos de edad se evaluaron mediante ensayo de suma de rangos de Wilcoxon (todos los metabolitos regulados significativamente se enumeran en la Tabla complementaria 5). Los centenarios presentan menor concentración de ácido 11,12-dihidroxi-eicosatrienoico (11,12-DiHETrE), ácido 9-hidroxi-octadecadienoico (9-HODE) y ácido 9-oxo-octadecadienoico (9-oxo-HODE), aumentando al mismo tiempo las concentraciones de ácido 15-hidroxi-eicosatetraenoico (15-HETE) y leucotrieno E4 (LTE4). En comparación con los ancianos los niveles de ácido eicosapentaenoico (EPA) se redujeron

en centenarios. Además, se aplicó análisis de MRC por pares entre centenarios y ancianos para maximizar los cambios en estos dos grupos de edad que presentan aumento de los niveles de concentración en suero de 8,9-epoxieicosatrienoico (8,9-EET) y leucotrieno B4 (LTB4) en centenarios. También se describen en el presente documento realizaciones adicionales como se desvelan en los siguientes párrafos numerados:

5 1. Un método para diagnosticar un estilo de vida que permite retardar y/o evitar trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento, que comprende

- obtener una muestra de suero de un sujeto,
- 10 - 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,

15 en el que el valor de referencia predeterminado se basa en el nivel de 9-Oxo-HODE en suero promedio en una población de control, y en el que en un nivel de 9-Oxo-HODE en suero reducido en la muestra en comparación con el valor de referencia predeterminado indica una probabilidad aumentada de retardar y/o evitar trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento.

20 2. Un método para diagnosticar un estilo de vida que permite retardar y/o evitar trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento, que comprende

- obtener 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,

25 en el que el valor de referencia predeterminado se basa en un nivel de PC-O 40:1 en suero promedio en una población de control y en el que en un nivel de PC-O 40:1 en suero menor en la muestra en comparación con el valor de referencia predeterminado indica una mayor probabilidad de retardar y/o evitar trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento.

30 3. El método del párrafo 1 o el párrafo 2, que comprende además

- determinar el nivel de al menos uno de PC-O 40:1, SM-OH 22:1, LPC 18:0, SM 24:0, PC-O 34:1, 9-HODE, 9-oxo-HODE o LTE4 en la muestra, y
- 35 - comparar el nivel del sujeto de al menos uno de PC-O 40:1, SM-OH 22:1, LPC 18:0, SM 24:0, PC-O 34:1, 9-HODE, 9-oxo-HODE o LTE4 con un valor de referencia predeterminado,

40 en el que el valor de referencia predeterminado se basa en el nivel de PC-O 40:1, SM-OH 22:1, LPC 18:0, SM 24:0, PC-O 34:1, 9-HODE, 9-oxo-HODE o LTE4 en suero promedio en una población de control, y en el que un nivel de PC-O 40:1, SM-OH 22:1, LPC 18:0, SM 24:0, PC-O 34:1, 9-HODE y/o 9-oxo-HODE en suero reducido en la muestra en comparación con los valores de referencia predeterminados indica un aumento de la probabilidad de retardar y/o evitar trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento y/o en el que niveles de LTE4, PC-O 34:1 en suero aumentados en la muestra en comparación con los valores de referencia predeterminados indican una mayor probabilidad de retardar y/o evitar trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento.

45 4. El método de uno de los párrafos 1 a 3, en el que la precisión del diagnóstico se aumenta evaluando también si uno o más de los siguientes biomarcadores PC-O 32:1, 15-HpETE, LTB4, 8,9 EpETre aumenta en 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 reducen en suero, en comparación con un valor de referencia previamente obtenido.

50 5. Un método *in vitro* para diagnosticar un estilo de vida que permite retardar y/o evitar trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento que comprende,

- obtener una muestra de orina de un sujeto,
- 55 - determinar el nivel de p-cresol sulfato (PCS) en la muestra, y
- comparar el nivel de PCS del sujeto con un valor de referencia predeterminado,

60 en el que el valor de referencia predeterminado se basa en un nivel de PCS en orina promedio en una población de control, y en el que un nivel de PCS en orina elevado en la muestra en comparación con el valor de referencia predeterminado indica un aumento de la probabilidad de retardar y/o evitar trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento.

65 6. El método del párrafo 5, que comprende además

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

en el que el valor de referencia predeterminado se basa en el nivel de PGA en orina promedio en una población de control y en el que los niveles de PCS y PGA en orina elevados en la muestra en comparación con los valores de referencia predeterminados indican una mayor probabilidad de retardar y/o evitar trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento.

5 7. Un método no invasivo para diagnosticar un estilo de vida que permite retardar y/o evitar trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento, que comprende

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

15 en el que el valor de referencia predeterminado se basa en un nivel de PAG en orina promedio en una población de control y en el que en un nivel de PAG en orina elevado en la muestra en comparación con el valor de referencia predeterminado indica una mayor probabilidad de retardar y/o evitar trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento.

8. El método del párrafo 7, que comprende además

- 20 - determinar el nivel de p-cresol sulfato (PCS) en la muestra, y
- comparar el nivel de PCS del sujeto con un valor de referencia predeterminado,

25 en el que el valor de referencia predeterminado se basa en el nivel de PCS en orina promedio en una población de control y en el que los niveles de PAG y PCS en orina elevados en la muestra en comparación con los valores de referencia predeterminados indican una mayor probabilidad de retardar y/o evitar trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento.

9. El método de uno de los párrafos 1 a 8 para diagnosticar un estilo de vida que permite envejecimiento sano.

30 10. El método de uno de los párrafos 1 a 9 para diagnosticar longevidad.

11. El método de uno de los párrafos 1 a 10 para diagnosticar interacciones de microflora intestinal-hospedador más sanas.

35 12. El método del párrafo 11, en el que las interacciones de microflora intestinal-hospedador más sanas se diagnostican en ancianos.

40 13. El método de uno de los párrafos 1 a 12 para diagnosticar un estilo de vida más sano, en el que los valores de referencia predeterminados se basan en niveles en suero u orina obtenidos del sujeto antes de un cambio en el estilo de vida.

14. El método de acuerdo con el párrafo 13, en el que el cambio en el estilo de vida es un cambio en la dieta.

45 15. El método de acuerdo con el párrafo 14, en el que el cambio en la dieta es el uso de al menos un producto nutricional que no se ha consumido previamente o se ha consumido en cantidades diferentes.

16. El método de acuerdo con el párrafo 14 o 15 para ensayar la eficacia de un nuevo régimen nutricional.

50 17. El método de uno de los párrafos 1 a 16 en el que los niveles de los biomarcadores se determinan por ¹H-RMN y/o espectrometría de masas en la muestra y en la referencia.

18. El método de uno de los párrafos 1 a 17 para diagnosticar un estilo de vida más sano, en el que los valores medios de referencia media predeterminados son

- 55 2 μM para 1-O-alkil-2-acilglicerofosfolina (PC-O) 32:1,
- 7,80 μM para 1-O-alkil-2-acilglicerofosfolina (PC-O) 34:1,
- 1,25 μg/100 μl de suero para ácido 15-hidroxi-eicosatetraenoico (15-HpETE),
- 0,013 μg/100 μl de suero para Leucotrieno E4 (LTE4),
- 0,020 μg/100 μl de suero para Leucotrieno B4 (4LTB), y/o
- 60 0,070 μg/100 μl de suero para 8,9-epoxieicosatrienoico (8,9 EpETre)
- 16,07 μM para Hidroxi-Esfingomielina (SM-OH) 22:1,
- 52,00 μM para Lisofosfatidilcolinas (LPC) 18:0,
- 25,00 μM para Esfingomielina (SM) 24:0,
- 5,07 μM para 1-O-alkil-2-acilglicerofosfolina (PC-O) 34:3,
- 65 14,30 μM para 1-O-alkil-2-acilglicerofosfolina (PC-O) 36:4,
- 1,41 μM para 1-O-alkil-2-acilglicerofosfolina (PC-O) 40:1,

10,00 µM para Fosfatidilcolina (PC) 36:2,
0,34 µg/100 µl de suero para ácido hidroxióctadecadienoico (9-HODE),
0,043 µg/100 µl de suero para ácido 9-oxo-octadecadienoico (9-oxo-HODE), y/o
0,017 µg/100 µl de suero para ácido 11,12-epoxieicosatrienoico (11,12-DiHETre).

- 5 19. El método de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 a 18, que comprende además:
- obtener una muestra de orina de un sujeto
 - determinar el nivel de fenilacetilglutamina (PAG) y/o p-cresol sulfato (PCS) en la muestra, y
 - 10 - comparar el nivel de fenilacetilglutamina (PAG) y/o PCS del sujeto con un valor de referencia predeterminado, en el que el valor de referencia predeterminado se basa en un nivel de PAG y/o PCS en orina promedio en una población de control y en el que los niveles de PAG y/o PCS en orina elevados en la muestra en comparación con los valores de referencia predeterminados indican un aumento de la probabilidad de retardar y/o evitar trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento.
- 15 20. Un biomarcador para el diagnóstico de un estilo de vida que permite retardar y/o evitar trastornos inflamatorios crónicos del envejecimiento, en el que el biomarcador es 9-Oxo-HODE.
- 20 21. Un biomarcador para el diagnóstico de un estilo de vida que permite retardar y/o evitar trastornos inflamatorios crónicos del envejecimiento, en el que el biomarcador es PC-O 40:1.
22. El biomarcador de acuerdo con el párrafo 20 o 21, en el que el biomarcador se va a detectar en suero.
- 25 23. Un biomarcador para el diagnóstico de un estilo de vida que permite retardar y/o evitar trastornos inflamatorios crónicos del envejecimiento, en el que el biomarcador es fenilacetilglutamina (PAG).
24. Un biomarcador para el diagnóstico de un estilo de vida que permite retardar y/o evitar trastornos inflamatorios crónicos del envejecimiento, en el que el biomarcador es p-cresol sulfato (PCS).
- 30 25. El biomarcador de acuerdo con el párrafo 23 o 24, en el que el biomarcador se va a detectar en orina.
26. Un método para diagnosticar (i) un estilo de vida que favorece el desarrollo de trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento, (ii) un estilo de vida que probablemente evite envejecimiento sano, (iii) un riesgo de una esperanza de vida acortada y/o (iv) interacciones de microflora intestinal-hospedador menos sanas, que comprende
- obtener una muestra de suero de un sujeto,
 - determinar el nivel de 9-Oxo-HODE y/o PC-O 40:1 en la muestra, y
 - comparar el nivel de 9-Oxo-HODE y/o PC-O 40:1 del sujeto con un valor de referencia predeterminado,
- 40 en el que el valor de referencia predeterminado se basa en un nivel de 9-Oxo-HODE y/o PC-O 40:1 en suero promedio en una población de control, y en el que un nivel de 9-Oxo-HODE y/o PC-O 40:1 en suero aumentado en la muestra en comparación con el valor de referencia predeterminado indica (i) un estilo de vida que favorece el desarrollo de trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento, (ii) un estilo de vida que probablemente evite envejecimiento sano, (iii) un riesgo aumentado de esperanza de vida acortada y/o (iv) interacciones de microflora intestinal-hospedador menos sanas.
- 45 27. Un método para diagnosticar (i) un estilo de vida que favorece el desarrollo de trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento, (ii) un estilo de vida que probablemente evite envejecimiento sano, (iii) un riesgo de una esperanza de vida acortada y/o (iv) interacciones de microflora intestinal-hospedador menos sanas, que comprende
- obtener una muestra de orina de un sujeto
 - 55 - determinar el nivel de PGA y/o PCS en la muestra, y
 - comparar el nivel de PGA y/o PCS del sujeto con un valor de referencia predeterminado,
- 60 en el que el valor de referencia predeterminado se basa en un nivel de PGA y/o PCS en orina promedio en una población de control y en el que un nivel de PGA y/o PCS en orina menor en la muestra en comparación con el valor de referencia predeterminado indica (i) un estilo de vida que favorece el desarrollo de trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento, (ii) un estilo de vida que probablemente evite envejecimiento sano, (iii) un riesgo aumentado de esperanza de vida acortada y/o (iv) interacciones de microflora intestinal-hospedador menos sanas.
- 65 28. Un método para (i) retardar, evitar y/o prevenir el desarrollo de trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento, (ii) promover el envejecimiento sano, (iii) promover la longevidad, (iv) reducir un riesgo de una

esperanza de vida acortada, (v) promover interacciones de microflora intestinal-hospedador más sanas y/o (vi) evitar interacciones de microflora intestinal-hospedador menos sanas, que comprende:

- (a) realizar un método de diagnóstico como se describe en los párrafos 26 o 27; y
- (b) modificar un estilo de vida del sujeto si el sujeto tiene (i) una mayor probabilidad de desarrollo de trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento, (ii) un estilo de vida que probablemente evite envejecimiento sano, (iii) un mayor riesgo de esperanza de vida acortada y/o (iv) interacciones de microflora intestinal-hospedador menos sanas.

29. Un método de acuerdo con el párrafo 28, en el que la modificación del estilo de vida en el sujeto comprende un cambio en la dieta.

30. Un método de acuerdo con el párrafo 29, en el que el cambio en la dieta comprende administrar al menos un producto nutricional al sujeto que tienen un efecto en el envejecimiento sano y/o en evitar trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento.

Tabla 1:

Factor	Centenarios	Ancianos	Jóvenes
Demografía			
Sexo, <i>masculino/femenino</i>	31/125	158/205	12/10
edad, años	100,9 ± 6 (99-111)	70,4 ± 6 (55-88)	30,6 ± 5 (25-40)
Clínico			
IMC 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/d
Diabetes ² , n	8	36	n/d
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 (1,3-31,0)	n/d
CRP ⁶ , mg/l	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 ± 21,9,6 (0,01-1861,9)	n/d
Metabólica			
¹ H-RMN en orina, Sexo, <i>masculino/femenino</i>	18/74	128/155	9/9
edad, años	100,9 ± 2 (99-111)	70,1 ± 6 (55-88)	30,9 ± 5 (24-40)
EM dirigido a suero Sexo, <i>masculino/femenino</i>	30/113	34/56	11/9
edad, años	100,9 ± 2 (99-111)	69,6 ± 6 (56-86)	30,6 ± 5 (24-40)
Lipidómica			
EM dirigido a suero Sexo, <i>masculino/femenino</i>	2/10	21/16	9/9
edad, años	101 ± 2 (99-104)	70 ± 6 (59-78)	31,2 ± 5 (25-40)

Tabla 2:

Visión de conjunto	R2X _(cum)	R2Y _(cum)	Q ² Y	AuROC	
Centenarios frente a ancianos	0,14	0,52	0,39	0,96	0,93
Centenarios frente a jóvenes	0,14	0,86	0,75	1,00	1,00
Jóvenes frente a ancianos	0,05	0,21	0,09	0,92	0,81

20

Tabla 3:

Grupo de edad		Centenarios	Ancianos	Jóvenes
		Media ± DT	Media ± DT	Media ± DT
Integral de pico (u.a.)	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:

Metabolitos [$\mu\text{M}/1$]	Jóvenes	Ancianos	Centenarios
	Media \pm DT	Media \pm DT	Media \pm DT
PC-O 32:1	2,02 \pm 0,36	2 \pm 0,51	2,35 \pm 0,63*
PC-O 34:1	7,34 \pm 1,07	7,88 \pm 1,71	9,54 \pm 2,19***
PC-O 34:3	5,73 \pm 1,4	5,07 \pm 1,71	3,94 \pm 1,54***
PC-O 36:2	9,54 \pm 1,75	9,58 \pm 2,39	9,29 \pm 2,26*
PCS-O 36:4	14,48 \pm 2,83	14,35 \pm 3,55	12,39 \pm 2,56*
PCS-O 40:1	1,23 \pm 0,23	1,41 \pm 0,41	1,02 \pm 0,32***
LPC 18:0	52,18 \pm 12,93	52 \pm 13,5	40,4 \pm 12,02**
SM 24:0	23,45 \pm 4,37	25,64 \pm 5,31	19,79 \pm 4,92***
SM-OH 22:1	14,52 \pm 2,94	16,07 \pm 3,37	11,51 \pm 3,04***

Tabla 5:

Metabolitos [(ng/100 μl de suero)]	Jóvenes	Ancianos	Centenarios
LTE4	0,015 \pm 0,014	0,013 \pm 0,011	0,035 \pm 0,03***
LTB4	0,011 \pm 0,014	0,019 \pm 0,047	0,016 \pm 0,009*
EPA	0,097 \pm 0,036	0,123 \pm 0,052	0,078 \pm 0,026**
15-HpETE	1,512 \pm 1,949	1,255 \pm 1,245	3,348 \pm 2,865***
11,12-DiHETrE	0,02 \pm 0,006	0,017 \pm 0,004	0,016 \pm 0,006*
9-oxo-ODE	0,042 \pm 0,028	0,043 \pm 0,039	0,022 \pm 0,013***
9-HODE	0,348 \pm 0,223	0,397 \pm 0,677	0,204 \pm 0,211 **
8,9-EpETrE	0,067 \pm 0,101	0,074 \pm 0,186	0,113 \pm 0,107***

REIVINDICACIONES

1. Un método para diagnosticar un estilo de vida que permite envejecimiento sano que comprende

- 5 - determinar el nivel de hidroxí-esfingomielina 22:1 (SM-OH 22:1), en una muestra de suero aislada de un sujeto,
y
- comparar el nivel de SM-OH 22:1 del sujeto con un valor de referencia predeterminado,

10 en el que el valor de referencia predeterminado se basa en un nivel de SM-OH 22:1 en suero promedio en una población de control, y en el que un nivel de SM-OH 22:1 en suero menor en la muestra en comparación con el valor de referencia predeterminado indica una mayor probabilidad de permitir envejecimiento sano.

2. El método de la reivindicación 1, que comprende además

- 15 - determinar el nivel de al menos uno de LPC 18:0, SM 24:0, PC-O 40:1, 9-HODE, 9-oxo-HODE, PC-O 34:1 o LTE4 en la muestra, y
- comparar el nivel del sujeto de al menos uno de LPC 18:0, SM 24:0, PC-O 40:1, 9-HODE, 9-oxo-HODE, PCO34:1 o LTE4 con un valor de referencia predeterminado,

20 en el que el valor de referencia predeterminado se basa en el nivel de LPC 18:0, SM 24:0, PC-O 40:1, 9-HODE, 9-oxo-HODE, PCO34:1 o LTE4 en suero promedio en una población de control, y en el que un nivel de SM-OH 22:1 en suero menor en la muestra y/o un nivel de LPC 18:0, SM 24:0, PC-O 40:1, 9-HODE o 9-oxo-HODE en suero menor en la muestra en comparación con los valores de referencia predeterminados indica una mayor probabilidad de permitir envejecimiento sano y/o
25 en el que los niveles de PC-P 34:1 y/o LTE4 en suero elevados en la muestra en comparación con los valores de referencia predeterminados indican una mayor probabilidad de permitir envejecimiento sano.

30 3. El método de una de las reivindicaciones precedentes, en el que la precisión del diagnóstico aumenta evaluando también si uno o más de los siguientes biomarcadores PC-O 32:1, 15-HpETE, LTB4, 8,9 EpETre aumenta en 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 reducen en suero, en comparación con un valor de referencia previamente obtenido.

4. El método de una de las reivindicaciones precedentes para diagnosticar longevidad.

35 5. El método de una de las reivindicaciones precedentes para diagnosticar un estilo de vida más sano, en el que los valores de referencia predeterminados se basan en niveles en suero obtenidos del sujeto antes de un cambio en el estilo de vida.

40 6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el cambio en el estilo de vida es un cambio en la dieta.

7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el cambio en la dieta es el uso de al menos un producto nutricional que previamente no se consumía o se consumía en cantidades diferentes.

45 8. El método de acuerdo con una de las reivindicaciones 6 o 7 para ensayar la eficacia de un nuevo régimen nutricional.

9. El método de una de las reivindicaciones precedentes en el que los niveles de SM-OH 22:1 y opcionalmente los otros biomarcadores se determinan por un 1H-RMN y/o espectrometría de masas en la muestra y en la referencia.

50 10. El método de una de las reivindicaciones precedentes para diagnosticar un estilo de vida más sano, en el que los valores medios de referencia predeterminados son

- 2 µM para 1-O-alkuil-2-acilglicerofosfolina (PC-O) 32:1,
7,80 µM para 1-O-alkuil-2-acilglicerofosfolina (PC-O) 34:1,
55 1,25 ng/100 µl para ácido 15-hidroxí-eicosatetraenoico (15-HpETE),
0,013 ng/100 µl de suero para Leucotrieno E4 (LTE4),
0,020 ng/100 µl de suero para Leucotrieno B4 (4LTB), y/o
0,070 ng/100 µl de suero para 8,9-epoxíeicosatrienoico (8,9 EpETre)
16,07 µM para Hidroxí-Esfingomielina (SM-OH) 22:1,
60 52,00 µM para Lisofosfatidilcolinas (LPC) 18:0,
25,00 µM para Esfingomielina (SM) 24:0,
5,07 µM para 1-O-alkuil-2-acilglicerofosfolina (PC-O) 34:3,
14,30 µM para 1-O-alkuil-2-acilglicerofosfolina (PC-O) 36:4,
1,41 µM para 1-O-alkuil-2-acilglicerofosfolina (PC-O) 40:1,
65 10,00 µM para Fosfatidilcolina (PC) 36:2,
0,34 ng/100 µl de suero para ácido hidroxiocadecadienoico (9-HODE),

0,043 ng/100 µl de suero para ácido 9-oxo-octadecadienoio (9-oxo-HODE), y/o
0,017 ng/100 µl de suero para ácido 11,12-epoxieicosatrienoico (11,12-DiHETre).

- 5 11. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende además:
- obtener una muestra de orina de un sujeto,
 - determinar el nivel de fenilacetilglutamina (PAG) y/o p-cresol sulfato (PCS) en la muestra, y
 - comparar el nivel de fenilacetilglutamina (PAG) y/o PCS del sujeto con un valor de referencia predeterminado,
- 10 en el que el valor de referencia predeterminado se basa en un nivel de PAG y/o PCS en orina promedio en una población de control, y en el que los niveles de PAG y/o PCS en orina elevados en la muestra en comparación con los valores de referencia predeterminados indican una mayor probabilidad de permitir envejecimiento sano.
- 15 12. Un método para diagnosticar un estilo de vida que probablemente evite envejecimiento sano y/o un riesgo de esperanza de vida acortada, que comprende
- determinar el nivel SM-OH 22:1 en una muestra de suero aislada del sujeto, y
 - comparar el nivel de SM-OH 22:1 del sujeto con un valor de referencia predeterminado,
- 20 en el que el valor de referencia predeterminado se basa en un nivel de SM-OH 22:1 en suero promedio en una población de control, y en el que un nivel de SM-OH 22:1 en suero mayor en la muestra en comparación con el valor de referencia predeterminados indica un estilo de vida que probablemente evite envejecimiento sano y/o un riesgo aumentado de esperanza de vida acortada.
- 25 13. Un método para promover envejecimiento sano, promover la longevidad y/o reducir un riesgo de esperanza de vida acortada que comprende:
- (a) realizar un método de diagnóstico como se describe en la reivindicación 12; y
 - (b) modificar un estilo de vida del sujeto si el sujeto tiene un estilo de vida que probablemente evite el
- 30 envejecimiento sano y/o un riesgo aumentado de una esperanza de vida acortada.
14. Un método de acuerdo con la reivindicación 13, en el que la modificación en el estilo de vida en el sujeto comprende un cambio en la dieta.
- 35 15. Un método de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el cambio en la dieta comprende administrar al menos un producto nutricional al sujeto que tiene un efecto en el envejecimiento sano.

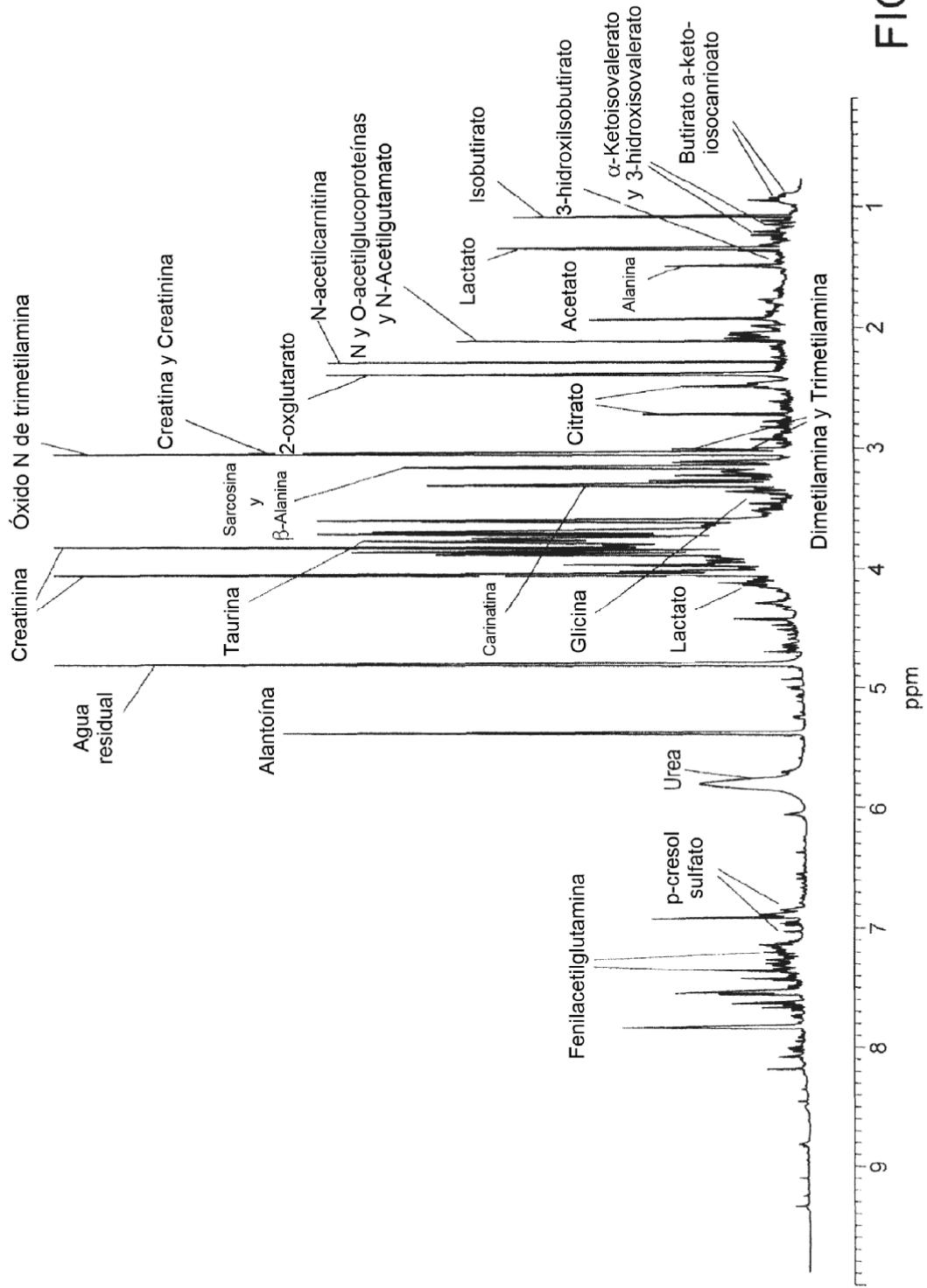
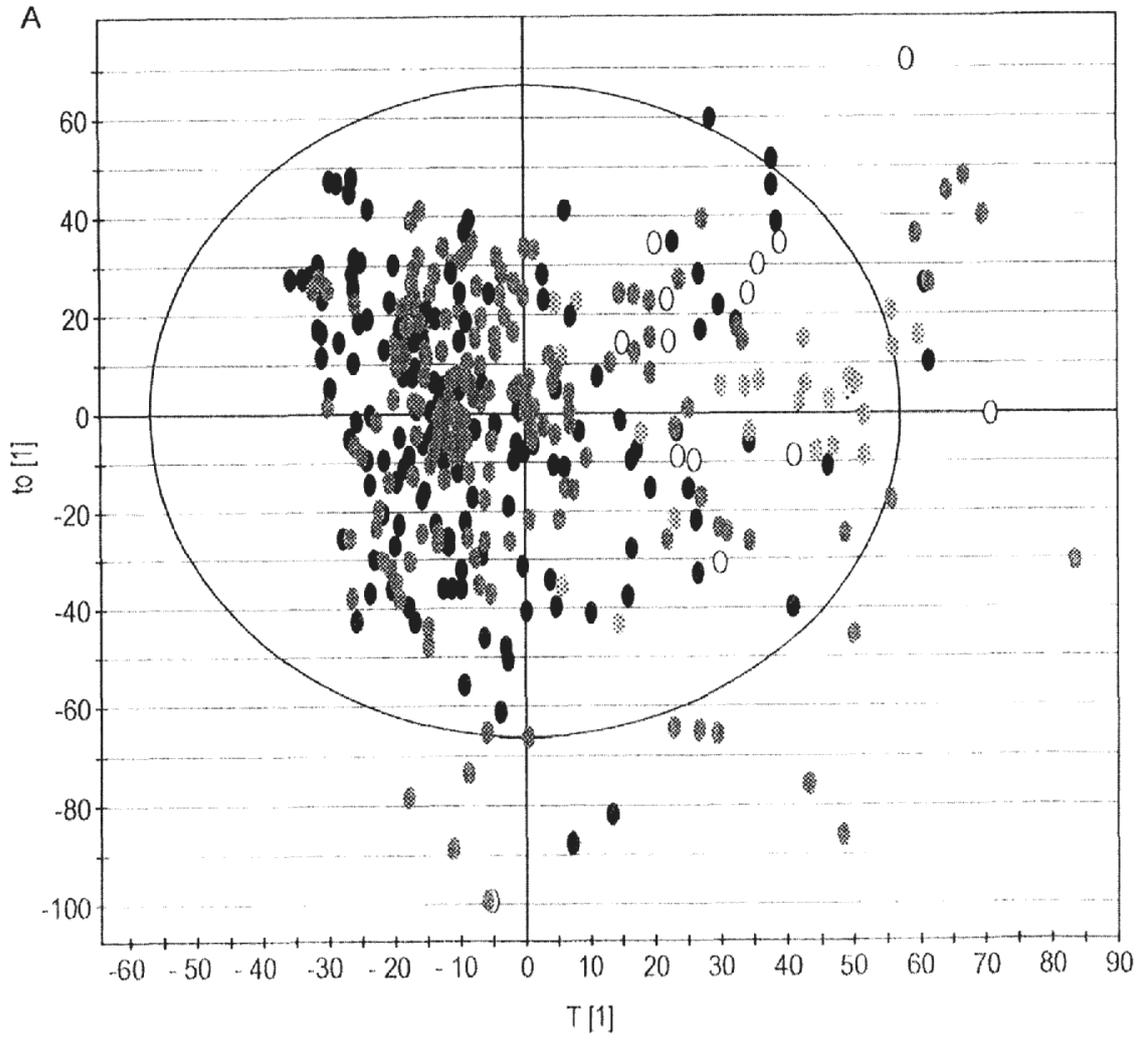


FIG. 1



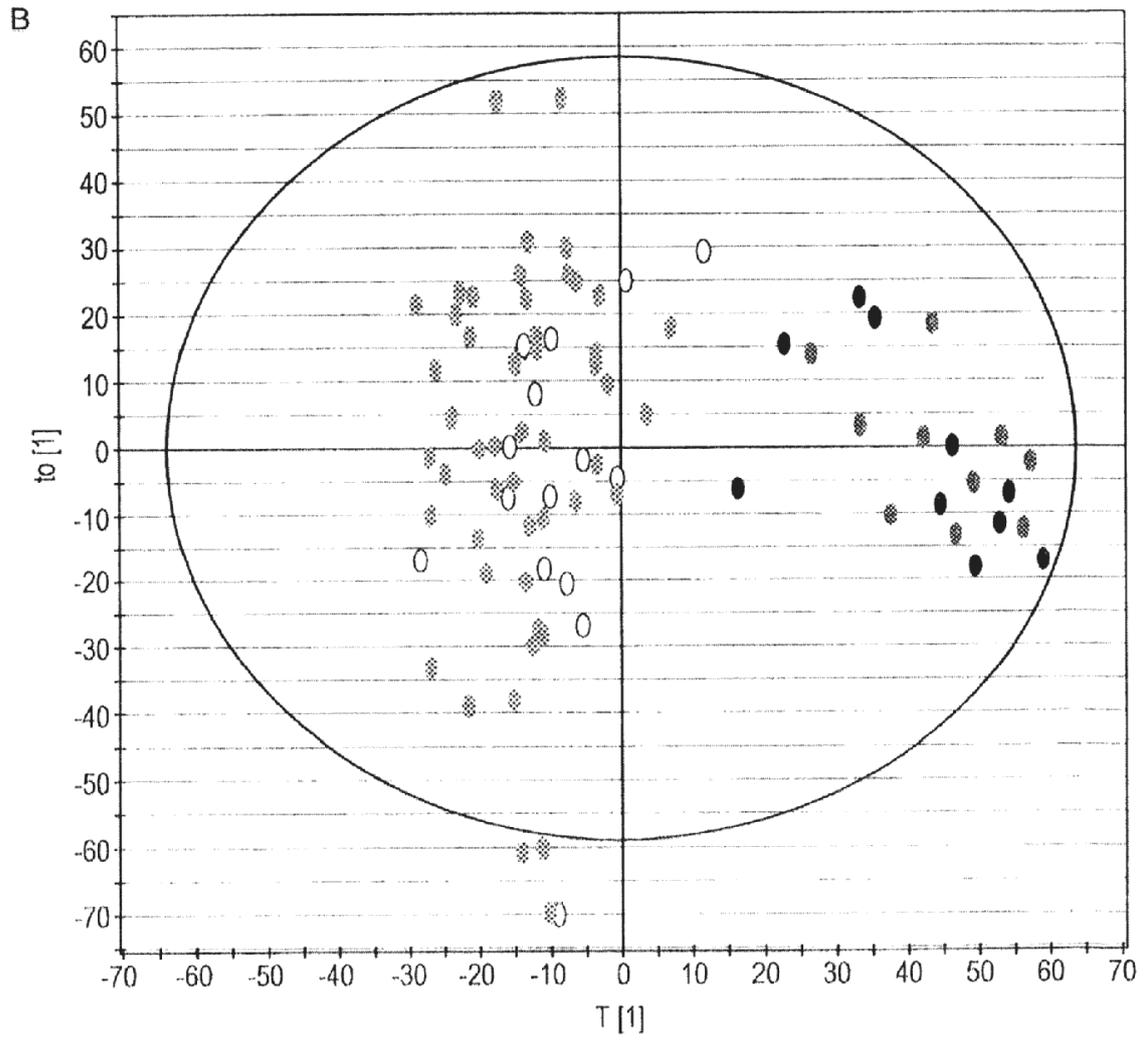


FIG. 2 Continuación

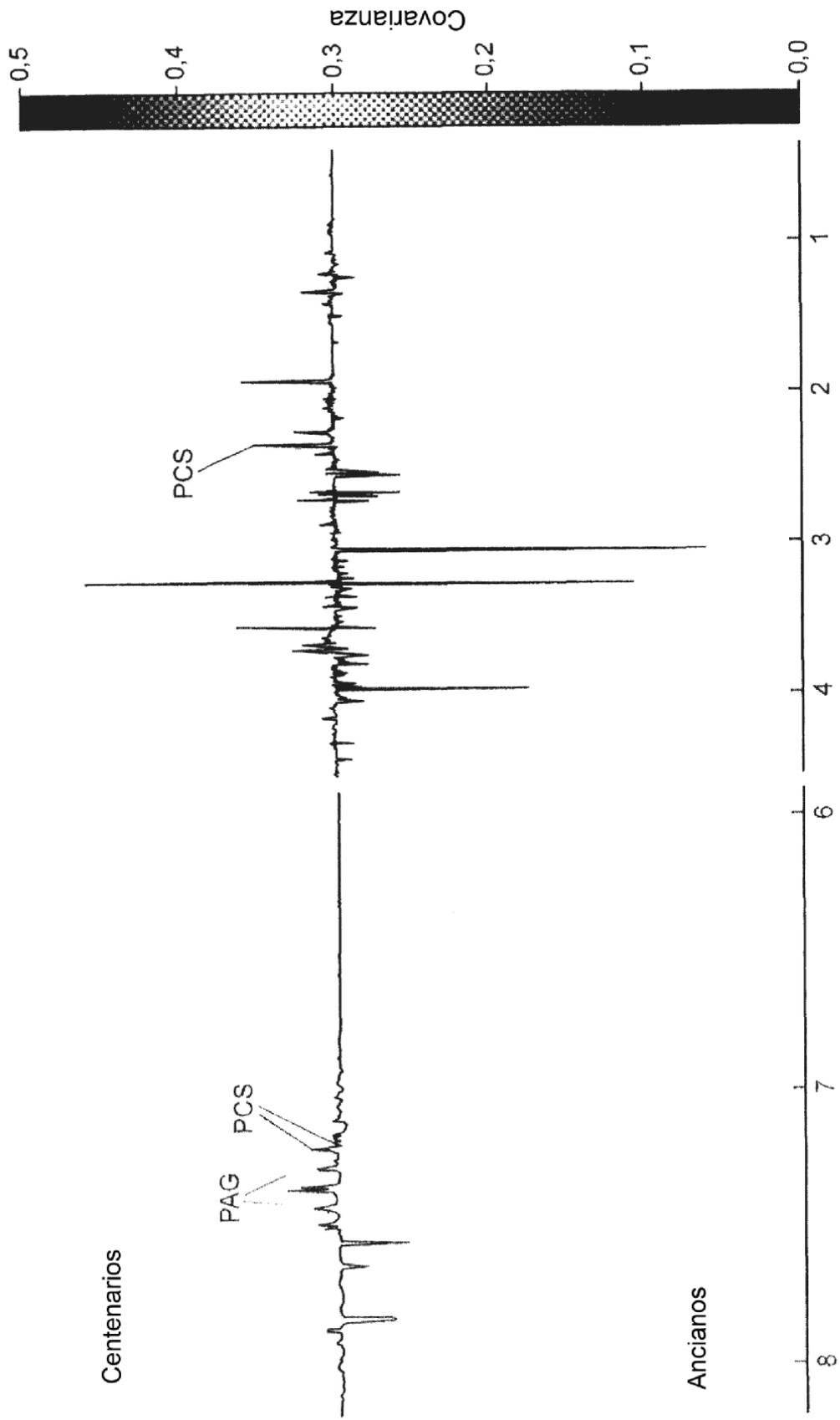


FIG. 3

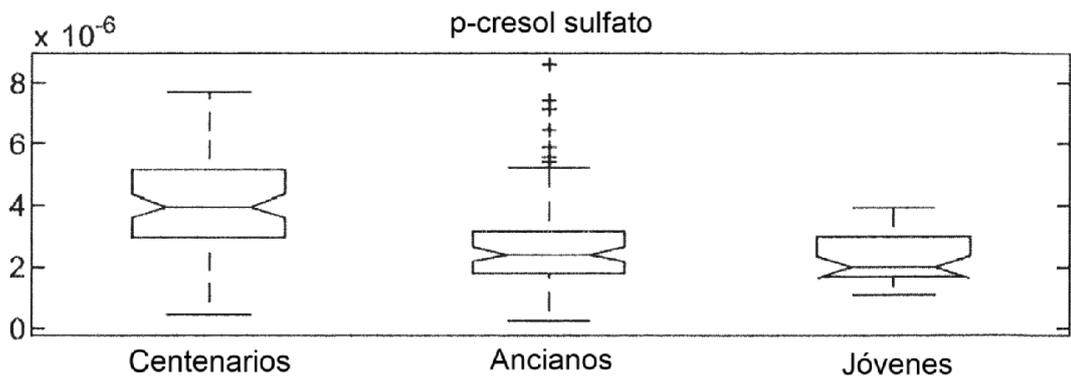
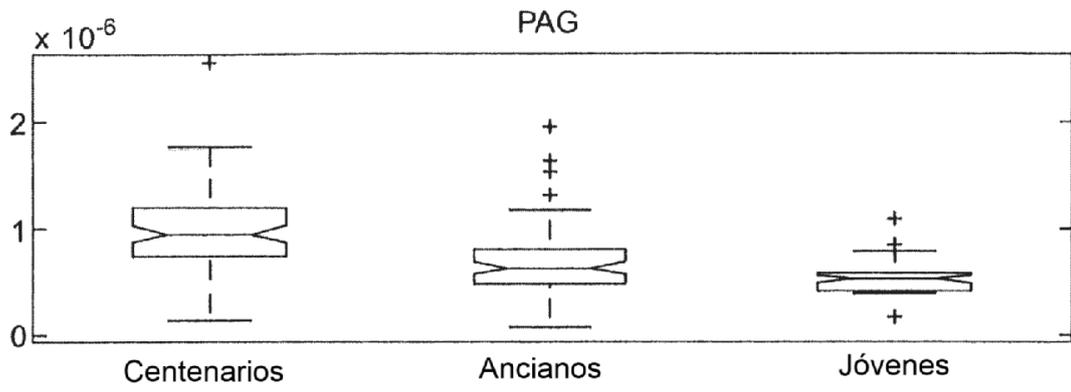


FIG. 4

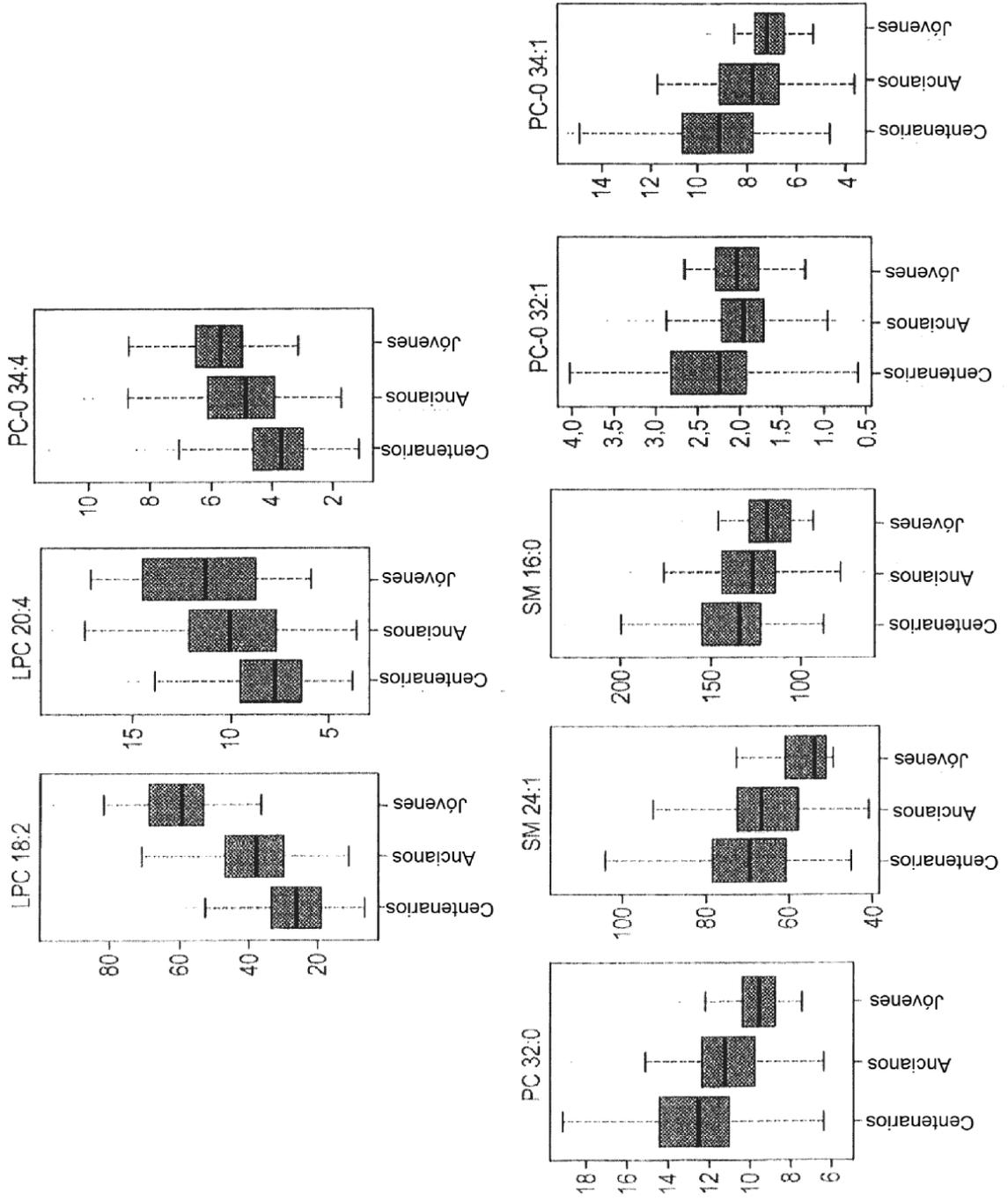


FIG. 5a

Figura 5b

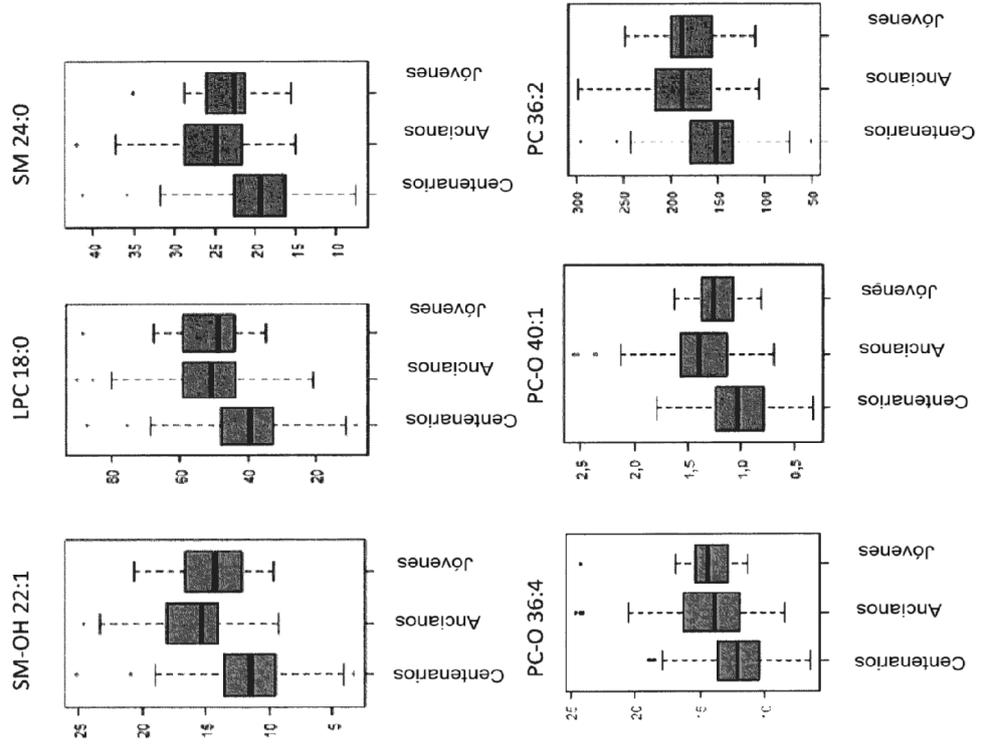


Figura 6:

