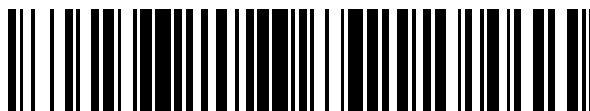


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 660 396**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

A61P 3/00 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.10.2012 PCT/FI2012/050979**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.04.2013 WO13054002**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.10.2012 E 12839611 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2017 EP 2766026**

54 Título: **Prevención y diagnóstico de grasa visceral**

30 Prioridad:

12.10.2011 FI 20116008

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

22.03.2018

73 Titular/es:

GUT GUIDE OY (100.0%)

Maoriantie 1

24800 Halikko, FI

72 Inventor/es:

MÄYRÄ-MÄKINEN, ANNIKA y

MUNUKKA, EVELIINA

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 660 396 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

Prevención y diagnóstico de grasa visceral

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a grasa visceral y al riesgo para la salud asociado a ella. Más concretamente, se describe un producto para uso en la prevención y la reducción de la formación de grasa visceral en el cuerpo. La invención también se refiere a un método para determinar grasa visceral en el cuerpo y para estimar el riesgo para la salud asociado a una enfermedad relacionada con la obesidad.

Antecedentes de la invención

10 En las últimas décadas se ha producido un aumento del sobrepeso y de las enfermedades relacionadas, como una epidemia en los países occidentales. Particularmente preocupante es el aumento de la obesidad en niños y jóvenes.

15 La epidemia de obesidad se explica parcialmente por el desequilibrio entre la ingesta de energía y el consumo de energía en la sociedad actual; en otras palabras, tomamos más calorías de los alimentos que comemos de las que consumimos. Las razones para sufrir sobrepeso son diversas: la dieta y la baja cantidad de ejercicio son factores esenciales, pero parcialmente el sobrepeso se ha considerado hereditario, mientras que en algunos casos se ha relacionado con trastornos de la acción hormonal y con algunas enfermedades. A lo largo de los últimos años, se ha investigado el posible rol de la microbiota intestinal en la patogénesis de la obesidad (Bäckhed F, *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004; 101: 15718-15723).

20 Se ha demostrado que la composición de la microbiota intestinal tiene numerosos efectos sobre el bienestar y la salud del hospedante (Hooper L.V., Gordon J.I., *Science* 2001; 292: 1115-8; y Bäckhed, F. *et al.* 2005. *Science* 307, 1915-1920). Se ha probado que tanto en tests con animales como con humanos hay diferencia en la composición de la microbiota de individuos normales e individuos con sobrepeso, y que la microbiota intestinal tiene un efecto sobre el suministro de nutrientes y la regulación de energía del hospedante (Bäckhed F *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004; 101: 15718-15723, Ley RE *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005; 102: 11070-11075, Ley RE *et al. Nature* 2006; 444: 1022-1023, Cani PD *et al., Diabetes* 2008; 57: 1470-1481, Turnbaugh PJ *et al. Nature* 2006; 444: 1027-1031, y Turnbaugh PJ *et al. Nature* 2009; 457: 480-484). En base a estos resultados de investigación, se puede asumir que los microbios intestinales son significativos para el control del peso y para el desarrollo de sobrepeso. De esta manera, una modificación de la microbiota intestinal podría, en el futuro, constituir un nuevo método para prevenir y tratar el sobrepeso, lo cual también sería naturalmente significativo para la salud pública.

30 Se alimentó a ratas con bifidobacterias, y se monitorizó el efecto sobre su peso. Los resultados fueron conflictivos en el sentido de que tras la primera semana, la ganancia de peso de las ratas que habían recibido bifidobacterias fue menor que la de las ratas de control, pero después de otra semana fue mayor (Desbonnet L *et al. J Psychiatr Res.* 2008; 43: 164-174). Una desventaja de las pruebas con animales es que los resultados son aplicables directamente a humanos. Sin embargo, se ha sugerido que el uso de bacterias probióticas promueve el desarrollo de la microbiota intestinal bifidogénica temprana para reducir el riesgo de sobrepeso u obesidad en niños pequeños a lo largo de su vida (EP 1 974 734).

40 Un punto débil de los estudios de este campo es que habitualmente se centran en el peso corporal o, con humanos, posiblemente en el índice de masa corporal (IMC), que es la masa corporal (kg) dividida entre el cuadrado de la altura (m). Sin embargo, no son fiables en la estimación de los riesgos para la salud asociados con la obesidad. La obesidad o el sobrepeso dañinos para la salud en humanos y en la mayoría de animales no son dependientes del peso corporal sino de la cantidad de grasa. Existe tejido adiposo bajo la piel, alrededor de los órganos internos y en la médula ósea, músculos y tejido mamario. La grasa que rodea los órganos internos se denomina grasa visceral, y difiere tanto de la grasa subcutánea como de la grasa muscular. Existe grasa visceral en la cavidad abdominal, por ejemplo alrededor del abdomen, el hígado, los intestinos y los riñones. Es sabido que un exceso de grasa visceral se correlaciona estrechamente con muchas enfermedades graves, algo que no ocurre con la grasa subcutánea. De hecho, incluso se ha sugerido que la grasa subcutánea podría tener un efecto protector.

45 De lo anterior resulta evidente que cuando se buscan productos contra la obesidad, es deseable encontrar productos que afecten específicamente a la grasa visceral. Convencionalmente, la formación de grasa visceral ha sido atacada mediante dieta y ejercicio. La presente descripción proporciona ahora un nuevo modo para evitar la grasa visceral y el riesgo para la salud relacionado. La grasa visceral normalmente se determina mediante imagen de resonancia magnética (IRM), que requiere tanto equipos como conocimientos especiales. La presente invención proporciona ahora un modo más sencillo y menos costoso para determinarla.

Breve descripción de la invención

55 La invención se basa en el descubrimiento de que la proporción relativa de bifidobacterias en los intestinos se correlaciona negativamente con la grasa visceral. Concretamente, se observó que la ratio de bifidobacterias a clostridia se correlaciona negativamente con la grasa visceral, mientras que la proporción relativa de clostridia en los intestinos se correlaciona positivamente con la grasa visceral. Adicionalmente, la invención se basa en el

descubrimiento de que la ratio de la cantidad total de bifidobacterias y *F. prausnitzii*, que están incluidas en la flora normal de los intestinos, respecto a la cantidad de clostridia no patogénica en los intestinos se correlaciona negativamente con la cantidad de grasa visceral. Las correlaciones mencionadas posibilitan la determinación de la grasa visceral mediante métodos diagnósticos, o la estimación del riesgo para la salud relacionado con la obesidad, determinando la proporción relativa de bifidobacterias a clostridia, o su ratio unas respecto a las otras en los intestinos.

En la presente memoria se describe un producto que aumenta la proporción relativa de bifidobacterias en los intestinos y está destinado a la prevención de la formación de grasa visceral o a la reducción de la cantidad de la misma en el cuerpo. También se describe un producto que aumenta la ratio de bifidobacterias a clostridia en los intestinos, y está destinado a la prevención de la formación de grasa visceral o a la reducción de la cantidad de la misma en el cuerpo. Concretamente, se describe un producto que aumenta la ratio de la cantidad total de bifidobacterias y *F. prausnitzii* a clostridia no patogénicas en los intestinos y que está destinado a la prevención de la formación de grasa visceral o a la reducción de la cantidad de la misma en el cuerpo.

También se describe un método para determinar la grasa visceral en el cuerpo, método que comprende determinar *in vitro* la proporción relativa de bifidobacterias en los intestinos, en donde la proporción relativa de bifidobacterias en los intestinos se correlaciona negativamente con la grasa visceral. También se describe un método para determinar grasa visceral en el cuerpo, que comprende la determinación *in vitro* de la ratio de bifidobacterias a clostridia en los intestinos, donde la ratio de bifidobacterias a clostridia se correlaciona negativamente con la grasa visceral. Particularmente, la invención se refiere a un método para determinar la grasa visceral en el cuerpo, que comprende la determinación *in vitro* en una muestra fecal de la ratio de la cantidad total de bifidobacterias y *F. prausnitzii* a clostridia en los intestinos, donde la ratio de la cantidad total de bifidobacterias y *F. prausnitzii* a clostridia se correlaciona negativamente con la grasa visceral. Adicionalmente, se describe un método para determinar la grasa visceral en el cuerpo, método que comprende la determinación *in vitro* de la proporción relativa de clostridia en los intestinos, donde la proporción relativa de clostridia en los intestinos se correlaciona positivamente con la grasa visceral.

Adicionalmente, se describe un método para estimar el riesgo para la salud asociado a la obesidad, método que comprende la determinación *in vitro* de la proporción relativa de bifidobacterias en los intestinos, donde la proporción de bifidobacterias se correlaciona negativamente con el riesgo para la salud. La invención se refiere a un método para estimar el riesgo para la salud asociado con la obesidad, método que comprende la determinación *in vitro* en una muestra fecal de la ratio de la cantidad total de bifidobacterias y *F. prausnitzii* a clostridia en los intestinos, donde la ratio se correlaciona negativamente con el riesgo para la salud. Adicionalmente, se describe un método para estimar el riesgo para la salud asociado con la obesidad, método que comprende la determinación *in vitro* de la proporción relativa de clostridia en los intestinos, donde la proporción relativa de clostridia se correlaciona positivamente con el riesgo para la salud.

Las realizaciones preferidas de la invención se describen en las reivindicaciones dependientes.

Una de las ventajas del producto usado de acuerdo a la invención es que es natural y seguro. Una ventaja de los métodos según la invención es que se pueden implementar fácilmente sin necesidad de dispositivos caros o de conocimientos especiales.

Descripción detallada de la invención

“La proporción relativa de bifidobacterias” se refiere a la ratio de bifidobacterias respecto a otras bacterias en los intestinos, normalmente a las bacterias totales y en particular a clostridia. El producto descrito en la presente memoria destinado a uso para la prevención o la reducción de la formación de grasa visceral, es capaz de aumentar la proporción relativa de bifidobacterias en las bacterias totales de los intestinos. En particular, es capaz de aumentar la ratio de bifidobacterias a clostridia en los intestinos. Incluso más particularmente, es capaz de aumentar la ratio de la cantidad total de bifidobacterias y *F. prausnitzii* respecto a clostridia en los intestinos. También puede tener un efecto reductor en la proporción relativa de clostridia respecto al total de bacterias de los intestinos.

El producto que aumenta la proporción relativa de bifidobacterias en los intestinos puede seleccionarse de un grupo que consiste en bifidobacteria, prebióticos, bifidobacterias + prebióticos, un producto estimulante de bifidobacterias, y cualquier combinación de los mismos. Las bifidobacterias se seleccionan preferiblemente de cepas usadas como probióticos, tales como *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve* y *Bifidobacterium infantis* y, por ejemplo, las cepas de *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* Bb-12 y *Bifidobacterium lactis* B1. “Un probiótico” es un microbio o un componente del mismo que tiene un efecto positivo sobre la salud del hospedante. Normalmente es un microbio vivo. “Un prebiótico” es un componente que normalmente es un carbohidrato (uno oligo o polisacárido) y que tiene un efecto promotor selectivo sobre el crecimiento o la actividad de una o más cepas bacterianas en el colon. Preferiblemente, un prebiótico es un fructo- o galacto-oligosacárido, fibra, particularmente fibra de cereal, tal como b-glucano de avena, poli-dextrosa, azúcar especial, tal como isomaltulosa, o por ejemplo un ácido graso, tal como el ácido graso omega-3, o cualquier mezcla de los mismos. El producto que aumenta la proporción relativa de bifidobacterias preferiblemente contiene tanto bifidobacterias como prebióticos. El producto

que estimula bifidobacterias puede ser un producto que contiene bacterias de ácido propiónico, y/o lactobacilos, tales como *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei* o *Lactobacillus lactis*.

5 Según una realización, el producto descrito es del tipo que incrementa la ratio de la cantidad total de bifidobacterias y *F. prausnitzii* respecto a clostridia en los intestinos, tal como las bacterias de ácido láctico, que se ha demostrado que inhiben el crecimiento de clostridia, tal como lactobacilos, por ejemplo determinadas cepas de *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus casei*.

10 Las bacterias descritas anteriormente y/o los prebióticos y/u otras sustancias activas que afecten a la flora intestinal se pueden administrar mezcladas con alimentos o bebidas, por ejemplo, o por separado en forma de una cápsula, granulado, polvo o líquido, por ejemplo. En otras palabras, el producto descrito en la presente memoria puede adoptar forma de comida, bebida, cápsula, granulado, polvo o líquido que contiene las sustancias que actúan sobre la flora intestinal. "Una cantidad efectiva" de un producto que actúa sobre la flora intestinal se refiere a una cantidad suficiente para cambiar la proporción relativa de bifidobacterias o clostridia en los intestinos y, en particular, la ratio de bifidobacterias a clostridia.

15 El anterior producto se puede usar para prevenir la formación de grasa visceral o para reducir la cantidad de la misma en el cuerpo. De este modo, se pueden prevenir o reducir los riesgos para la salud o los inconvenientes cosméticos relacionados con la grasa visceral. En este contexto, "grasa visceral" significa tejido adiposo formado sobre las superficies de los órganos internos de la cavidad abdominal. El modo más fiable de determinarla es la IRM. Por tanto, el producto que previene la formación de grasa visceral o que reduce la cantidad de la misma se puede usar para prevenir enfermedades relacionadas particularmente con la grasa visceral, tales como la prevención o el tratamiento del síndrome metabólico, la diabetes de aparición en adultos o la hipertensión arterial.

20 La cantidad de grasa visceral en el cuerpo y el riesgo para la salud relacionado con la obesidad se determinan indirectamente analizando la microbiota del cuerpo. Más específicamente, se puede determinar la proporción relativa de bifidobacterias y clostridia en los intestinos a partir de las bacterias totales de los intestinos y, en particular, la ratio de bifidobacterias a clostridia. Esta ratio se denomina en la presente memoria "índice MOOD" y se obtiene dividiendo la proporción relativa de bifidobacterias entre la proporción relativa de clostridia. El índice MOOD produce las mejores correlaciones.

25 La expresión "se correlaciona negativamente" significa que cuando una variable aumenta, otra decrece, mientras que la expresión "se correlaciona positivamente" significa que cuando una variable aumenta, otra también aumenta, y viceversa. De esta manera, cuanto mayor es la proporción relativa de bifidobacterias o particularmente el índice MOOD en un sujeto, menos grasa visceral tiene (correlación negativa). Correspondientemente, cuanto mayor es la proporción relativa de clostridia, más grasa visceral hay en el cuerpo (correlación positiva). Correspondientemente, cuanto mayor es en una persona la proporción relativa de bifidobacterias o particularmente su índice MOOD, menor es su riesgo de padecer una enfermedad asociada a la obesidad (correlación negativa). Adicionalmente, cuanto mayor es en una persona la proporción relativa de clostridia, mayor es su riesgo de padecer una enfermedad asociada a la obesidad (correlación positiva).

30 La microbiota intestinal es un ecosistema extremadamente complejo (de 50 a 100 especies, en total más de 10¹⁴ bacterias). Un cambio en la proporción porcentual de un grupo de bacterias, por ejemplo durante una dieta o una intervención con probiótico inevitablemente también cambia las proporciones porcentuales de otros grupos de bacterias significativos para la salud. Por esta razón, es importante considerar no solo el cambio en los grupos individuales de bacterias sino considerar también el cambio en todo el sistema. En la presente invención, la composición del sistema bacteriano está representado por un índice VF (del inglés "*visceral fat*") que se observó que está asociado negativamente con la cantidad de grasa visceral.

35 El índice VF es un parámetro comprensible que representa la composición de la microbiota intestinal. Se calcula a partir de las proporciones porcentuales de tres grupos de bacterias y de los géneros significativos para la salud, es decir, dividiendo la suma de la cantidad de bifidobacterias y *F. prausnitzii* de una muestra por la cantidad de clostridia XIVa. El balance entre estos tres grupos de bacterias es importante en lo que respecta a la salud y el bienestar. El índice VF se puede usar para un cambio favorable en la composición de las bacterias intestinales, por ejemplo cuando una persona está perdiendo peso.

40 A través del índice VF, se puede planificar para la persona una intervención personalizada con probióticos y/o prebióticos dirigida a reducir la cantidad de grasa visceral y a perder peso. En una realización de esta invención, el valor de 2,9 del índice VF representa un fenotipo con una baja área de grasa visceral (VFA), y el valor de 1,5, a su vez, representa un fenotipo con una gran cantidad de grasa visceral.

45 Normalmente se examina una muestra fecal del sujeto para determinar cuantitativamente las bifidobacterias, las clostridia y/o las bacterias totales mediante métodos conocidos per se. Las bifidobacterias y las clostridia son grupos de bacterias bien conocidos, taxonómicamente identificables. Las "bifidobacterias" son bacterias Gram positivas anaerobias inmóviles que aparecen en el tracto digestivo (y que pertenecen a la familia *Bifidobacteriaceae* y particularmente al género *Bifidobacterium*). Las "clostridia" son bacterias anaerobias Gram positivas formadoras de esporas (que pertenecen a la clase *Clostridia*), que incluyen los géneros *Clostridium* y *Eubacterium*, por ejemplo. En

el contexto de la invención, las clostridia son particularmente clostridia incluidas en la flora normal y que pertenecen al grupo de clostridia no patogénico XIVA. Las *F. prausnitzii* están incluidas en la microbiota intestinal normal en un adulto sano como uno de los representantes más numerosos de dicha microbiota. Preferiblemente, se determina la proporción de bifidobacterias, *F. prausnitzii* y/o clostridia en las bacterias totales y/o la ratio de bifidobacterias respecto a clostridia mediante un método basado en hibridación de rARN 16S, tinción de ADN y citometría de flujo (FCM-FISH), que permite determinar los diferentes grupos de bacterias rápidamente de un modo fiable.

“Un sujeto” en este contexto se refiere a un animal, particularmente a un mamífero, que incluye un humano. Preferiblemente el sujeto es una persona.

Ejemplo 1

Material y métodos de investigación

Se tomaron muestras fecales de 57 adultos fineses básicamente sanos (19 hombres, 38 mujeres). Las muestras fueron almacenadas congeladas y se aislaron las bacterias de las mismas usando el método descrito previamente (Vaahtovuori J et al. J Microbiol Methods. 2005; 63: 276-286). Las bacterias fueron fijadas y los números de bacterias totales (número por gramo de materia seca) se determinaron a partir de las muestras, y también se determinaron los siguientes seis grupos o géneros de bacterias significativos para la salud y el bienestar: bifidobacterias, *Bacteroides*, grupo entérico, *Atopobium*, *Faecalibacterium prausnitzii* y *Clostridium* XIVA, lo que significa un grupo de clostridia XIVA, es decir, también conocido como grupo Erec (Franks et al. 1998, *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3336-3345). Todos los grupos de bacterias anteriores son, a la luz del conocimiento actual, parte de lo que se denomina microbiota normal en un humano. La determinación se realizó usando un método patentado basado en hibridación rARN 16 S, tinción de ADN y citometría de flujo (FCM-FISH) (Vaahtovuori J et al. 2005, ver anterior, y WO 2004/015421). Adicionalmente, se determinó el porcentaje de materia seca de las muestras.

Se determinaron las composiciones corporales de las personas del ensayo mediante un método basado en la bioimpedancia y mediante IRM, donde se calcula el área superficial de grasa visceral en el área abdominal a partir de una imagen de tomografía por ordenador. Las personas del ensayo rellenaron cuestionarios sobre sus hábitos de vida, historial médico y medicaciones, si las había, y sobre su actividad física. También mantuvieron un diario de comida durante tres días. Las muestras fecales de dos personas del ensayo tuvieron que ser descartadas del material debido a enfermedades intestinales crónicas.

Se determinaron las correlaciones entre las diferentes variables usando el factor de correlación de Pearson.

Resultados

La Tabla 1 muestra los datos básicos determinados en las personas participantes en el estudio. En la Tabla 1 las personas analizadas se agrupan de acuerdo al género. Los hombres eran mayores y naturalmente también más pesados que las mujeres. Por el contrario, las mujeres presentaron un mayor porcentaje de grasa que los hombres.

Tabla 1. Datos básicos de las personas del ensayo (promedio, SD entre paréntesis)

	Hombres	Mujeres	test t
Edad	52 (4)	36 (6)	***, p = 0,001
Peso (kg)	84 (12)	69 (13)	***, p < 0,001
Contorno de cintura (cm)	97 (10)	84 (13)	***, p < 0,001
IMC (kg/m ²)	27,1 (4,1)	24,7 (4,6)	p = 0,066
Porcentaje de grasa	28 (7)	36 (10)	***, p = 0,002
Tensión arterial (mmHg)	135/80 (12/9)	127/77 (16/10)	p = 0,051/0,208

La Tabla 2 muestra los valores medios de contenido de materia seca en las heces, así como las proporciones relativas de los diferentes grupos de bacterias determinados mediante FCM-FISH.

Tabla 2. Análisis de muestras fecales (promedio, SD entre paréntesis)

	Hombres	Mujeres	test t
Materia seca en heces (%)	24 (7)	27 (8)	p = 0,189
Bifidobacterias (%)	4,4 (2,9)	5,6 (5,3)	p = 0,915
Bacteroides (%)	3,6 (2,6)	2,9 (1,2)	p = 0,352
Grupo entérico (%)	0,4 (0,2)	0,8 (1,3)	***, p = 0,007

	Hombres	Mujeres	test t
Atopobium (%)	3,7 (2,3)	3,5 (17)	p = 0,826
<i>F. prausnitzii</i> (%)	10,1 (4,8)	6,9 (4,1)	*, p = 0,012
<i>Clostridium</i> XIVa	12,4 (8,7)	8,5 (7,7)	p = 0,054

En el estudio, se observó que la grasa visceral se correlaciona positivamente con la proporción relativa del grupo *Clostridium* XIVa (p = 0,002), mientras que se observa claramente una tendencia negativa con la proporción relativa de bifidobacterias (p = 0,098). Adicionalmente, se calculó el denominado índice MOOD de cada muestra, es decir, la proporción relativa de bifidobacterias se dividió entre la proporción relativa de clostridia (*Clostridium* XIVa). Entre el índice MOOD y la grasa visceral la correlación fue negativa (p = 0,002). Los resultados se muestran en la Tabla 3.

5

Tabla 3. Correlaciones, muestras completas

	Bifidobacterias (%)	<i>Clostridium</i> XIVa (%)	Índice MOOD
Grasa visceral (%)	r negativa, p = 0,098	r mod. positiva, p = 0,002**	r mod. negativa, p = 0,002**

La edad y el género pueden afectar a los resultados. También se llevaron a cabo análisis estadísticos en un material que consistía solo de mujeres (n = 38, Tabla 2). En el material que consistía solo en mujeres, la grasa visceral se correlacionó negativamente con el índice MOOD (p = 0,011) y de forma casi significativa con las bifidobacterias (p = 0,066). Se observó una correlación positiva significativa entre el grupo de *Clostridium* XIVa y la grasa visceral (p = 0,033). Los resultados se muestran en la Tabla 4.

10

Tabla 4. Correlaciones, mujeres

	Bifidobacterias (%)	<i>Clostridium</i> XIVa (%)	Índice MOOD
Grasa visceral (%)	r mod. negativa, p = 0,066*	r mod. positiva, p = 0,033**	r mod. negativa, p = 0,011**

15 **Ejemplo 2. Índice de grasa visceral (índice VF)**

A partir del material de investigación descrito en el Ejemplo 1, se determinaron las cantidades de bacterias totales (número/g de materia seca en heces) y las proporciones de determinados grupos y géneros de bacterias intestinales (% de bacterias totales) con el método descrito en el Ejemplo 1.

El material se dividió en terciles en relación al área de grasa visceral (VFA):

20

- Grupo I (< 33,3%)
- Grupo II (> 33,3 % y < 66,6%)
- Grupo III (> 66,6%)

A partir de los resultados de microbiota, se calculó lo que se denomina índice de grasa visceral (VFI) dividiendo la suma de la cantidad de bifidobacterias y de *F. prausnitzii* en una muestra entre la cantidad de clostridium XIVa. Se calculó el índice VF para cada muestra a partir de las proporciones relativas (%). Los resultados se muestran en la Tabla 5.

25

Tabla 4. Correlaciones, mujeres

	Grupo I, VFA < 49,2 cm ²	Grupo II, 49,2 cm ² VFA < 91,1 cm ²	Grupo III, VFA > 91,1 cm ²	P I vs. III
Bacterias totales	2,8·10 ¹¹	2,0·10 ¹¹	2,5·10 ¹¹	0,461
<i>Bifidobacterium</i> (%)	5,8	5,8	4,0	0,487
<i>Clostridium</i> XIV a (%)	5,9	10,1	13,9	0,021
<i>F. prausnitzii</i> (%)	6,0	8,6	8,2	0,100
<i>Bifidobacterium</i>	1,5·10 ¹⁰	1,3·10 ¹⁰	1,1·10 ¹⁰	0,750
<i>Clostridium</i> XIVa	1,5·10 ¹⁰	2,0·10 ¹⁰	3,2·10 ¹⁰	0,001
Índice VF*	2,9	2,0	1,5	0,071

* El índice se calculó para todas las muestras, es decir, la cifra de la columna es el promedio de los índices de todas las muestras del grupo.

El valor P entre los grupos I y III se calculó usando el test de t de Student.

5 En el estudio se observó una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo III (alta VFA) y el grupo 1 (baja VFA) tanto en las proporciones relativas como en las cantidades de clostridium XIVa, así como una tendencia en el índice VF. Así, en base a este material, las composiciones de la microbiota intestinal en personas con una VFA elevada y una VFA baja, respectivamente, difieren entre ellas.

Las correlaciones entre la cantidad de grasa visceral (Área de Grasa Visceral, VFA) en los resultados bacterianos (porcentajes e índices) se calcularon para todo el material usando el factor de correlación de Pearson (Tabla 6).

10 **Tabla 6. Correlaciones entre la cantidad de grasa visceral (Área de Grasa Visceral, VFA) y los resultados bacterianos (porcentajes e índice VF)**

	Grasa visceral (VFA)	Valor p
Bacterias totales	0,238	0,157
Bifidos (%)	0,249	0,099
Clostridium (%)	0,515	< 0,001
F. prausnitzii (%)	0,268	0,079
Índice VF	0,395	0,008

Se observó una correlación negativa significativa (**, 0,008) entre la cantidad de grasa visceral (VFA) y el índice VF en este material. Entre el grupo de clostridium XIVa se produjo una correlación positiva moderada (**, < 0,001).

15 **Ejemplo 3. Intervención**

Cinco mujeres finas sanas, con sobrepeso ligero o con sobrepeso participaron en una intervención en la que se analizó la composición de su microbiota intestinal antes y después de una intervención con probióticos (Cell Biotech) y/o prebióticos (glucomanano).

20 El polvo probiótico usado en el estudio contenía > 1,0*10⁹ bacterias vivas/g. El polvo probiótico consistía en las cepas *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium breve* y *Bifidobacterium infantis*.

Durante el test, las personas evaluadas recibieron una bolsa (1 g) de polvo de probiótico al día, mezclado, por ejemplo, con yogur, leche entera agria (*villi*), queso fresco batido o líquido frío. La dosis de glucomanano fue de 3 g al día (3 x 1 g) en forma de cápsulas. La Tabla 7 muestra los resultados de la intervención.

Tabla 7.

Persona	Bifidos (%)		Clostridium XIVa (%)		<i>F. prausnitzii</i>		Índice VF	
	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
I	6,5	1,8	6,8	15,9	7,0	4,4	2,0	0,4
II	8,3	4,5	18,8	10,3	7,7	14,4	0,85	1,8
III	4,8	5,8	6,2	5,8	11,7	11,4	2,7	3,0
IV	12,7	9,1	33,3	22,6	12,4	5,6	0,75	0,65
V	1,7	13,4	22,0	13,4	10,2	5,0	0,54	1,4

25 Los índices VF de dos personas analizadas (II y V) aumentaron mucho durante el periodo de ensayo. Ambas participaron en la intervención probiótica. Por el contrario, el índice VF de la persona I disminuyó durante la intervención probiótica. La persona I informó de haber tenido una dieta baja en carbohidratos durante unos pocos días antes de proporcionar la muestra. Este tipo de dieta fuerte presumiblemente afectó a los resultados. La persona analizada III muestra un ligero aumento del índice. Por otro lado, el índice estaba en un buen nivel (2,7) ya en la situación inicial. El índice VF de la persona analizada IV permaneció prácticamente igual durante la totalidad del periodo de estudio. La persona padeció complicaciones estomacales inexplicables durante el periodo de estudio. Las personas analizadas I, II y V tomaron solo probióticos mientras que la III y la IV tomaron probiótico + glucomanano.

35 Se observó en el estudio que existe una conexión entre la composición de la microbiota intestinal y la cantidad de grasa visceral. Adicionalmente, se puede resaltar que la intervención probiótica descrita en el estudio permite afectar a la composición de la microbiota intestinal y, a través de ella, también a la grasa visceral en el cuerpo.

Será evidente para el especialista en la técnica que según avance la tecnología, la idea básica de la invención se puede implementar de muchas maneras diferentes. La invención y sus realizaciones, por tanto, no están restringidas a los ejemplos descritos anteriormente, sino que pueden variar dentro del alcance de las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

- 5
1. Un método para determinar la grasa visceral en el cuerpo, método que comprende la determinación *in vitro* en una muestra fecal de la ratio de la cantidad total de bifidobacterias y *F. prausnitzii* a clostridia en los intestinos, donde la ratio de la cantidad total de bifidobacterias y *F. prausnitzii* a clostridia se correlaciona negativamente con la grasa visceral.
 2. Un método según la reivindicación 1, donde las clostridia son clostridia no patogénicas del grupo XIVa.
 3. Un método para estimar el riesgo para la salud asociado a la obesidad, método que comprende determinar *in vitro* en una muestra fecal la ratio de bifidobacterias y *F. prausnitzii* a clostridia en los intestinos, donde la ratio se correlaciona negativamente con el riesgo para la salud.