

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 999 269**

51 Int. Cl.:

G01N 33/566 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.01.2019** **PCT/EP2019/050819**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.07.2019** **WO19141627**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.01.2019** **E 19700310 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2024** **EP 3740200**

54 Título: **Métodos para predecir el riesgo y estratificar la sarcopenia y la deficiencia de NAD**

30 Prioridad:

17.01.2018 EP 18152186
07.08.2018 EP 18187656

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
25.02.2025

73 Titular/es:

UNIVERSITY OF SOUTHAMPTON (50.00%)
University Road, Highfield
Southampton SO17 1BJ, GB y
AGENCY FOR SCIENCE, TECHNOLOGY AND
RESEARCH (50.00%)

72 Inventor/es:

FEIGE, JEROME;
GODFREY, KEITH MALCOLM;
KARNANI, NEERJA y
MIGLIAVACCA, EUGENIA

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 999 269 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

Métodos para predecir el riesgo y estratificar la sarcopenia y la deficiencia de NAD

Antecedentes de la invención

La pérdida relacionada con la edad de masa y función muscular es inevitable en todos los individuos; sin embargo, su progresión depende en gran medida de factores genéticos y ambientales, tales como la actividad física y la ingesta nutricional.

La sarcopenia se ha definido como el punto en el que la pérdida relacionada con la edad de masa y función muscular se vuelve debilitante e impacta en la calidad de vida. En contraste, la fragilidad es otra clasificación de la disminución de la función física relacionada con la edad que se caracteriza por baja fuerza y funcionalidad muscular, pero no masa muscular. La sarcopenia se define clínicamente de acuerdo con la baja masa y función muscular, utilizando puntos de corte que estratifican a la población de edad avanzada en individuos en un estado de movilidad patológica. La sarcopenia predice futuras discapacidades y mortalidad, y en 2016 se le asignó un código oficial ICD-10 de enfermedad (Anker et al., 2016).

La sarcopenia es común tanto en hombres como en mujeres mayores de 65 años, con una prevalencia mundial estimada entre 3 % y 30 % según la definición operativa implementada. La sarcopenia está asociada a una serie de resultados físicos y metabólicos adversos, entre ellos fragilidad, discapacidad, obesidad, diabetes y osteoporosis. Como consecuencia, hay costes sustanciales de atención médica atribuibles a la sarcopenia. Aunque la edad, el género, el tamaño, la herencia y la actividad física son influencias reconocidas en adultos, sigue habiendo una variación considerable no explicada en la masa y fuerza muscular entre personas mayores.

La sarcopenia es un síndrome multifactorial que se asocia a cambios fisiopatológicos tales como el deterioro de la transición neuromuscular, la alteración del acoplamiento excitación/contracción, el deterioro de la capacidad regenerativa vinculado al agotamiento de las células madre, defectos del metabolismo mitocondrial y energético en las fibras musculares, y finalmente, el marmoleado del músculo esquelético con grasa y fibrosis. La etiología del síndrome es, por lo tanto, compleja y poco comprendida, pero la baja actividad física, el declive hormonal en hormonas anabólicas (andrógenos, IGF-1) y la desnutrición/deficiencias nutricionales desempeñan un papel importante.

El estudio MEMOSA (por sus siglas en inglés, Determinantes moleculares multiétnicos de la sarcopenia humana) fue diseñado para determinar los cambios moleculares y nutricionales asociados a la sarcopenia en seres humanos.

Kashani et al ("Evaluating Muscle Mass by Using Markers of Kidney Function: Development of the Sarcopenia Index", Critical Care Medicine, vol. 45, 2017) da a conocer el índice de sarcopenia, es decir, creatinina sérica/cistatina sérica, para medir la masa muscular en pacientes en estado crítico y predecir la mortalidad hospitalaria a los 90 días de los pacientes.

A Coto Montes et al. ("Potential early biomarkers of sarcopenia among independent older adults", Maturitas, vol. 104, 2017), da a conocer productos circulantes en sangre de la peroxidación lipídica como biomarcador de la sarcopenia, derivados de asociaciones estadísticas a corto plazo en los participantes.

Existe la necesidad de proporcionar biomarcadores alternativos simples y más precisos de la sarcopenia que puedan ser indicativos en cualquier estadio de la enfermedad.

Los inventores de la presente solicitud han encontrado que los niveles de ácido antranílico y trigonelina en el cuerpo, y la proporción de niveles de trigonelina:ácido antranílico son indicativos de sarcopenia en un sujeto.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Los niveles séricos de trigonelina difieren en pacientes sarcopénicos y están positivamente asociados a la masa muscular magra, a la fuerza de agarre y a la marcha.

Figura 2. Los niveles séricos de ácido antranílico difieren en pacientes sarcopénicos y están asociados negativamente a la masa muscular magra, a la fuerza de agarre y a la marcha.

Figura 3. Los niveles séricos de proporción trigonelina:ácido antranílico difieren en pacientes sarcopénicos y están positivamente asociados a la masa muscular magra, a la fuerza de agarre y a la marcha.

Figuras 4A y 4B. Figura 4A. Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes de músculo sarcopénico vs músculo de control y Figura 4B. Gráfico de enriquecimiento GSEA para el conjunto de genes de fosforilación oxidativa seleccionado de la Figura 4A. La secuenciación de ARN del músculo esquelético humano sarcopénico revela que la disfunción mitocondrial es el principal cambio transcripcional durante la sarcopenia.

Figuras 5A y 5B. Figura 5A. Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes de músculo sarcopénico vs músculo de control y Figura 5B. Gráfico de enriquecimiento GSEA para el conjunto de genes de fosforilación oxidativa seleccionado de la Figura 5A. Correlación positiva de la expresión génica de la función mitocondrial del músculo esquelético con los niveles séricos de trigonelina.

Figuras 6A y 6B. Figura 5A. Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes de músculo sarcopénico vs músculo de control y Figura 6B. Gráfico de enriquecimiento GSEA para el conjunto de genes de fosforilación oxidativa seleccionado de la Figura

6A. Correlación negativa de la expresión génica de la función mitocondrial del músculo esquelético con los niveles séricos de ácido antranílico.

Figuras 7A y 7B. Figura 7A. Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes de músculo sarcopénico vs músculo de control y Figura 7B. Gráfico de enriquecimiento GSEA para el conjunto de genes de fosforilación oxidativa seleccionado de la Figura 7A. Correlación positiva de la expresión génica de la función mitocondrial del músculo esquelético con los niveles séricos de trigonelina:ácido antranílico.

Figura 8. El músculo sarcopénico humano presenta una menor expresión de genes tales como NMDA1, NAMPT y PNP.

Figura 9. Niveles de NAD⁺ en biopsias musculares de participantes de control y sarcopénicos.

Figura 10. Niveles séricos de la proporción trigonelina:ácido antranílico están positivamente asociados al índice de masa muscular magra.

Descripción de la invención

La invención se refiere a un método para determinar si un sujeto presenta sarcopenia, que comprende:

- (a) determinar el nivel de trigonelina en una muestra obtenida del sujeto,
- (b) comparar el nivel de trigonelina en la muestra con un valor de referencia,

donde un nivel reducido de trigonelina en la muestra en comparación con el valor de referencia es indicativo de sarcopenia en el sujeto.

En la realización, el método de la presente invención comprende:

- (c) determinar adicionalmente el nivel de ácido antranílico en una muestra obtenida del sujeto,
- (d) determinar la proporción de trigonelina y ácido antranílico en la muestra,
- (e) comparar la proporción de trigonelina y ácido antranílico en la muestra con un valor de referencia,

en donde la proporción de trigonelina y ácido antranílico en la muestra en comparación con el valor de referencia es indicativa de sarcopenia.

En una realización, una reducción en la proporción de trigonelina y ácido antranílico en la muestra del sujeto en comparación con el valor de referencia es indicativa de sarcopenia en el sujeto.

La sarcopenia se caracteriza por uno o más de baja masa muscular, baja fuerza muscular y bajo rendimiento físico. Más preferentemente, la sarcopenia se caracteriza por dos o más de baja masa muscular, baja fuerza muscular y bajo rendimiento físico. Lo más preferentemente, la sarcopenia se caracteriza por baja masa muscular, baja fuerza muscular y bajo rendimiento físico. La totalidad de los anteriores pueden medirse mediante métodos bien conocidos por el experto en la materia.

La masa muscular se puede medir mediante TC (tomografía computarizada), DXA (por sus siglas en inglés, absorciometría de rayos X de energía dual), RM (imágenes de resonancia magnética) o métodos de dilución de creatina D3.

La fuerza muscular puede medirse por la fuerza de prensión manual (por ejemplo, utilizando dinamometría manual) o la fuerza de los extensores de la rodilla (por ejemplo, utilizando la medición del torque del cuádriceps).

El rendimiento físico puede medirse por la velocidad de la marcha, SPPB, prueba de caminata de 400 m, prueba de levantarse y caminar, o prueba de subida de escaleras.

En una realización, los niveles de trigonelina y ácido antranílico se determinan mediante espectrometría de masas. Preferentemente, los niveles de trigonelina y ácido antranílico se determinan mediante cromatografía líquida seguida de espectrometría de masas.

En una realización, el sujeto es un sujeto humano.

En una realización, el sujeto humano es un adulto mayor. En una realización, el sujeto humano es de edad avanzada.

En una realización, el sujeto es un animal de compañía, preferentemente un perro.

Las siguientes realizaciones se refieren a uno o más de los métodos anteriormente indicados de la invención.

En una realización, el valor de referencia se determina a partir de una muestra obtenida del mismo sujeto o de un grupo de sujetos.

5 En una realización, el valor de referencia se mide en una muestra del mismo sujeto.

En una realización, el valor de referencia se mide en el mismo sujeto antes de una intervención nutricional, por ejemplo con una composición nutricional, y se compara con la medición después de la intervención nutricional.

10 En una realización, el valor de referencia se mide en una muestra de un grupo de sujetos, por ejemplo un grupo de sujetos de edad similar.

En una realización, el sujeto es un adulto mayor.

15 En una realización el sujeto es de edad avanzada.

En una realización, la muestra obtenida del sujeto es una muestra de plasma.

En una realización, la muestra obtenida del sujeto es una muestra de suero.

20 En una realización, la muestra obtenida del sujeto es una muestra de orina.

La presente invención se refiere, además, a un método para predecir la capacidad de respuesta a la composición nutricional para la utilización en el tratamiento o la prevención de la sarcopenia en el sujeto, que comprende:

25 (a) detectar el nivel de uno o más biomarcadores en una muestra obtenida del sujeto,
(b) comparar el nivel de uno o más biomarcadores en la muestra con un valor de referencia,
(c) predecir la capacidad de respuesta del sujeto a la composición nutricional basándose en los resultados de la etapa (b),

30 en donde dicho biomarcador o biomarcadores es ácido antranílico y/o trigonelina y en donde se predecirá si el sujeto será respondedor a una composición nutricional o intervención nutricional si el nivel de ácido antranílico está incrementado en la muestra en comparación con el valor de referencia y si el nivel de trigonelina está disminuido en la muestra en comparación con el valor de referencia, y/o si la proporción entre trigonelina y ácido antranílico está disminuida en la muestra en comparación con la proporción de referencia.

35

En una realización, el biomarcador es trigonelina.

En una realización, la composición nutricional comprende vitamina B3.

40 En una realización, la composición nutricional comprende un precursor de NAD, por ejemplo, ribósido de nicotinamida, mononucleótido de nicotinamida y nicotinamida.

45 En una realización, la composición nutricional comprende trigonelina. En una realización, la composición nutricional comprende un precursor de trigonelina. En una realización, la composición nutricional comprende un derivado de trigonelina. La trigonelina es un alcaloide de fórmula química $C_7H_7NO_2$ y número CAS 535-83-1.

50 En una realización, la composición nutricional comprende extracto de café, por ejemplo, un extracto de grano de café o una bebida de café. En una realización, dicho extracto de café comprende uno o más de ácido cafeico, trigonelina, ácido quinolínico y precursores de ácido quinolínico.

Sujetos

55 El término "sujeto" se refiere a cualquier animal, incluidos seres humanos y animales de compañía. Generalmente, el sujeto es un ser humano o un animal ave, bovino, canino, equino, felino, caprino, murino, ovino o porcino. El sujeto puede ser un caballo o un animal de compañía, por ejemplo, un gato o un perro. Preferentemente el sujeto es un ser humano. La expresión "de edad avanzada" en el contexto de un ser humano significa una edad cronológica de por lo menos 60 años, más preferentemente de más de 64 años, y lo más preferentemente, de más de 68 años. La expresión "adulto mayor" en el contexto de un ser humano significa una edad cronológica de por lo menos 45 años, preferentemente de más de 50 años, y más preferentemente de más de 55 años, e incluye sujetos de edad avanzada.

Sarcopenia

65 La sarcopenia puede caracterizarse por uno o más de baja masa muscular, baja fuerza muscular y bajo rendimiento físico.

La sarcopenia puede diagnosticarse en un sujeto basándose en la definición del AWGSOP (por sus siglas en inglés, Grupo de trabajo asiático para la sarcopenia en personas mayores), por ejemplo, tal como se describe en Chen et al., 2014. La baja masa muscular puede basarse generalmente en una baja masa magra apendicular normalizada respecto al cuadrado de la altura (índice ALM), particularmente un índice ALM inferior a 7,00 kg/m² para hombres y 5,40 kg/m² para mujeres. El bajo rendimiento físico puede basarse generalmente en la velocidad de la marcha, particularmente una velocidad de marcha de <0,8 m/s. La baja fuerza muscular puede basarse generalmente en una baja fuerza de prensión manual, particularmente una fuerza de prensión manual inferior a 26 kg en hombres e inferior a 18 kg en mujeres.

La sarcopenia puede diagnosticarse en un sujeto basándose en la definición del EWGSOP (Grupo de trabajo asiático para la sarcopenia en personas mayores), por ejemplo, tal como se describe en Cruz-Jentoff et al., 2010. La baja masa muscular puede basarse generalmente en una baja masa magra apendicular normalizada respecto al cuadrado de la altura (índice ALM), particularmente un índice ALM inferior a 7,23 kg/m² para hombres y 5,67 kg/m² para mujeres. El bajo rendimiento físico puede basarse generalmente en la velocidad de la marcha, particularmente una velocidad de marcha de <0,8 m/s. La baja fuerza muscular puede basarse generalmente en una baja fuerza de prensión manual, particularmente una fuerza de prensión manual inferior a 30 kg en hombres e inferior a 20 kg en mujeres.

La sarcopenia puede diagnosticarse en un sujeto basándose en la definición de la Foundation for the National Institutes of Health (FNIH), por ejemplo, tal como se describe en Studenski et al., 2014. La baja masa muscular generalmente puede estar basada en una baja masa magra apendicular (ALM) normalizada respecto al índice de masa corporal (IMC; kg/m²), particularmente ALM respecto a IMC inferior a 0,789 para hombres y a 0,512 para mujeres. El bajo rendimiento físico puede basarse generalmente en la velocidad de la marcha, particularmente una velocidad de marcha de <0,8 m/s. La baja fuerza muscular puede basarse generalmente en una baja fuerza de prensión manual, particularmente una fuerza de prensión manual inferior a 26 kg en hombres e inferior a 16 kg en mujeres. La baja fuerza muscular también puede estar basada generalmente en una baja fuerza de prensión manual en relación al índice de masa corporal, particularmente una fuerza de prensión manual en relación al índice de masa corporal inferior a 1,00 en hombres e inferior a 0,56 en mujeres.

El método de dilución de creatina D3 es otro enfoque para medir la masa muscular. Este método se está aceptando más ampliamente como un estándar robusto y potencialmente como una futura alternativa a la DXA. El método de dilución de creatina D3 ha sido descrito anteriormente por Clark et al. (2014) y Stimpson et al. (2013).

El presente método implica determinar los niveles de trigonelina, ácido antranílico y/o la proporción de sus niveles en una muestra obtenida de un sujeto. Lo anterior puede denominarse "muestra de ensayo". De esta manera, el presente método se pone en práctica normalmente fuera del cuerpo humano o animal, p. ej., en una muestra de líquido corporal anteriormente obtenida del sujeto que va a someterse a ensayo.

La muestra puede ser, por ejemplo, una muestra de suero, plasma u orina. La muestra puede derivarse de sangre, es decir, la muestra comprende sangre completa o una fracción de sangre. La muestra puede comprender plasma sanguíneo o suero. Preferentemente, la muestra es una muestra de suero.

Las técnicas para recolectar muestras de sangre y separar fracciones de sangre son bien conocidas de la técnica. Por ejemplo, se pueden recolectar muestras de sangre venosa de pacientes utilizando una aguja y depositarlas en tubos de plástico. Los tubos de recolección pueden contener, por ejemplo, sílice recubierta mediante pulverización y un gel de polímero para la separación del suero. El suero se puede separar mediante centrifugación a 1300 RCF durante 10 min a temperatura ambiente y almacenarse en pequeños tubos de plástico a -80 °C.

Comparación con el valor de referencia

El presente método implica una comparación de los niveles de ácido antranílico y trigonelina con los niveles de valor de referencia de ácido antranílico y trigonelina. La expresión "valor de referencia" es sinónima de "valor de control" e incluye ampliamente los datos que el experto en la materia utilizaría para facilitar la interpretación precisa de los datos técnicos.

Los niveles de ácido antranílico, los niveles de trigonelina y/o la proporción entre niveles de trigonelina:ácido antranílico en una muestra de un sujeto pueden compararse con los del mismo sujeto o con los de una o más cohortes (poblaciones/grupos) de sujetos de control. Los valores de referencia pueden establecerse mediante el ensayo de muestras del mismo sujeto, por ejemplo mediante el ensayo de muestras repetidas. Los valores de referencia también pueden establecerse mediante el ensayo de muestras de individuos de la población general o de la población seleccionada y utilizando un modelo estadístico, tal como el método de valor predictivo, para seleccionar un criterio de positividad o curva característica operativa del receptor, que define la especificidad óptima (la tasa más alta de verdaderos negativos) y la sensibilidad (la tasa más alta de verdaderos positivos), tal como se describe en Knapp, R. G. y Miller, M. C. (1992). Clinical Epidemiology and Biostatistics. William & Wilkins, Harual Publishing Co. Malvern, Pa.

Los valores de referencia pueden establecerse mediante el ensayo de por lo menos 1 individuo, preferentemente por

lo menos 5 individuos, más preferentemente por lo menos 10 individuos, más preferentemente por lo menos 15 individuos, y más preferentemente por lo menos 20 individuos. Todos o una cantidad sustancial de dichos individuos preferentemente no presentan sarcopenia.

- 5 Es conocido de la técnica cómo asignar los valores de referencia correctos, ya que variarán con el género, origen étnico, herencia genética, estado de salud o edad, por ejemplo.

Composición nutricional

- 10 Una composición nutricional de acuerdo con la descripción, pero que no forma parte de la invención reivindicada, puede ser una composición nutracéutica, alimento funcional, producto de nutrición funcional, alimento médico con estatus regulatorio, tal como medicamentos, productos de nutrición médica o suplementos dietéticos.

- 15 El término "nutracéutico" combina las palabras "nutrición" y "farmacéutico". Es un alimento o producto alimentario que proporciona beneficios para la salud y médicos, incluyendo la prevención y el tratamiento de enfermedades. Un nutracéutico es un producto aislado o purificado a partir de alimentos que generalmente se comercializa en formas medicinales no habitualmente asociadas a alimentos. Un nutracéutico se muestra que presenta un beneficio fisiológico o que proporciona protección frente a enfermedades crónicas. Dichos productos pueden variar desde nutrientes aislados, suplementos dietéticos y dietas específicas hasta alimentos genéticamente modificados, productos herbales y alimentos procesados, tales como cereales, sopas y bebidas.

- 20 El término "nutracéutico" tal como se utiliza en la presente memoria denota utilidad tanto en los campos de aplicación de la nutrición como el farmacéutico. De esta manera, las composiciones nutracéuticas pueden utilizarse como suplementos para alimentos y bebidas y como formulaciones farmacéuticas para aplicación entérica o parenteral que pueden ser formulaciones sólidas, tales como cápsulas o tabletas, o en forma de formulaciones líquidas, tales como soluciones o suspensiones.

- 25 La composición nutricional puede comprender trigonelina, un precursor de trigonelina y/o un derivado de trigonelina. El precursor de trigonelina puede ser, por ejemplo, ácido quinolínico, ácido nicotínico y/o nicotinamida.

- 30 Preferentemente, la composición nutricional comprende un precursor de NAD, por ejemplo, ribósido de nicotinamida, mononucleótido de nicotinamida, nicotinamida y/o ácido nicotínico.

- 35 Las composiciones nutricionales pueden contener, además, hidrocoloides protectores (tales como gomas, proteínas, almidones modificados), aglutinantes, agentes formadores de película, agentes/materiales encapsulantes, materiales de pared/cubierta, compuestos de matriz, recubrimientos, emulsionantes, agentes activos en superficie, agentes solubilizantes (aceites, grasas, ceras, lecitinas, etc.), adsorbentes, portadores, rellenos, co-compuestos, agentes dispersantes, agentes humectantes, adyuvantes de procesamiento (solventes), agentes de flujo, agentes enmascaradores del sabor, agentes de pesaje, agentes gelificantes, agentes formadores de gel, antioxidantes y antimicrobianos.

- 40 Además, se puede añadir un suplemento multivitamínico y mineral a las composiciones nutricionales para obtener una cantidad adecuada de un nutriente esencial, que falta en algunas dietas. El suplemento multivitamínico y mineral también puede resultar útil para la prevención de enfermedades y la protección contra pérdidas nutricionales y deficiencias debido a patrones de estilo de vida.

- 45 Las composiciones nutricionales pueden encontrarse en cualquier forma galénica que resulte adecuada para administrar al cuerpo, especialmente en cualquier forma que resulte convencional para la administración oral, p. ej., en formas sólidas, tales como (aditivos/suplementos para) alimentos o piensos, premezclas de alimentos o piensos, alimentos o piensos fortificados, tabletas, píldoras, gránulos, grageas, cápsulas y formulaciones efervescentes, tales como polvos y tabletas, o en formas líquidas, tales como soluciones, emulsiones o suspensiones, tales como, p. ej., bebidas, pastas y suspensiones oleosas. Las pastas pueden incorporarse en cápsulas de cubierta dura o blanda, en donde las cápsulas presentan, p. ej., una matriz de (pescado, cerdo, ave, vaca) gelatina, proteínas vegetales o lignosulfonato. Son ejemplos de otras formas de aplicación, aquellas destinadas a la administración transdérmica, parenteral o inyectable. Las composiciones nutricionales pueden encontrarse en forma de formulaciones de liberación controlada (retardada).

- 50 Las composiciones nutricionales pueden incluir bebidas. El término "bebidas" comprende tanto las bebidas no alcohólicas como las alcohólicas, así como las preparaciones líquidas para la adición de agua potable y los alimentos líquidos. Las bebidas no alcohólicas son, p. ej., refrescos, bebidas deportivas, zumos de frutas, té y bebidas a base de leche. Los alimentos líquidos pueden incluir sopas y productos lácteos. La composición nutracéutica que comprende el compuesto puede añadirse a un refresco, una barra energética o un caramelo.

- 55 Si la composición nutricional es una formulación nutracéutica, la composición contiene adicionalmente excipientes, diluyentes o adyuvantes farmacéuticamente aceptables, entonces se pueden utilizar técnicas estándares para su formulación, tal como se da a conocer en, p. ej., Remington's Pharmaceutical Sciences, 20a edición, Williams &

Wilkins, PA, EE. UU.. Para la administración oral, se utilizan preferentemente tabletas y cápsulas que contienen un agente aglutinante adecuado, p. ej., gelatina o polivinilpirrolidona, un relleno adecuado, p. ej., lactosa o almidón, un lubricante adecuado, p. ej., estearato de magnesio, y opcionalmente aditivos adicionales.

Las expresiones "alimento funcional", "producto de nutrición funcional", "alimento médico" y "producto de nutrición médica" se refieren a cualquier alimento saludable que se declara que presenta una propiedad promotora de la salud o de prevención de enfermedades más allá de la función básica de suministrar nutrientes. La categoría general de alimentos funcionales incluye alimentos procesados o alimentos fortificados con aditivos promotores de la salud, tales como productos "enriquecidos con vitaminas".

Un suplemento dietético, también conocido como suplemento alimentario o suplemento nutricional, es una preparación destinada a complementar la dieta y proporcionar nutrientes, tales como vitaminas, minerales, fibra, ácidos grasos o aminoácidos, que pueden faltar o no consumirse en cantidades suficientes en la dieta de una persona. Algunos países definen los suplementos dietéticos como alimentos, mientras que en otros se definen como medicamentos o productos de salud natural. Los suplementos que contienen vitaminas o minerales dietéticos están incluidos como una categoría de alimentos en el Codex Alimentarius, una colección de normas, códigos de prácticas, directrices y otras recomendaciones reconocidas internacionalmente relacionadas con los alimentos, la producción de alimentos y la seguridad alimentaria. Estos textos son elaborados por la Comisión del Codex Alimentarius, una organización patrocinada por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés) y la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Prevención o tratamiento de enfermedades

El término "prevención" incluye la reducción del riesgo y/o la gravedad de una afección o trastorno. Los términos "tratamiento", "tratar", "atenuar" y "aliviar" incluyen tanto el tratamiento profiláctico o preventivo (que previenen y/o ralentizan el desarrollo de una afección o trastorno patológico diana), como el tratamiento curativo, terapéutico o modificador de la enfermedad, incluidas las medidas terapéuticas que curan, ralentizan, disminuyen los síntomas y/o detienen la progresión de una afección o trastorno patológico diagnosticado; y el tratamiento de los pacientes en riesgo de contraer una enfermedad o que se sospecha que han contraído una enfermedad, así como pacientes que están enfermos o que se ha diagnosticado que sufren una enfermedad o afección médica. El término no implica necesariamente que un sujeto sea tratado hasta la recuperación total. La totalidad de dichos términos también se refiere al mantenimiento y/o promoción de la salud en un sujeto que no padece una enfermedad pero que podría ser susceptible de desarrollar una afección no saludable. Dichos términos también están destinados a incluir la potenciación o, de otro modo, mejora, de una o más medidas profilácticas o terapéuticas principales. Los términos "tratamiento", "tratar", "atenuar" y "aliviar" pretenden, además, incluir la gestión de la dieta de una enfermedad o afección o la gestión de la dieta para la profilaxis o prevención de una enfermedad o afección. Un tratamiento puede estar relacionado con el paciente o con el médico.

A continuación se describe adicionalmente la invención mediante Ejemplos, que pretenden servir para ayudar al experto habitual en la materia a llevar a cabo la invención y no pretenden en modo alguno limitar el alcance de la misma.

Ejemplos

Ejemplo 1

Mediciones de metabolitos en el suero

Se reclutaron veinte participantes masculinos de ascendencia predominantemente china de entre 65 y 79 años y 20 sujetos de control del mismo grupo de edad sin diagnóstico de sarcopenia de 2 estudios sobre varones mayores que viven independientemente en Singapur (Grupo de sarcopenia de Singapur y Estudio sobre el envejecimiento en un entorno comunitario [ACES, por sus siglas en inglés]). La sarcopenia se diagnosticó utilizando la definición del Grupo de trabajo asiático para la sarcopenia en personas mayores (Chen et al., 2014), siguiendo la definición operativa estandarizada de la sarcopenia (Cruz-Jentoft et al., 2010).

El Comité de investigación específico de dominio del grupo nacional de salud (NHG DSRB, por sus siglas en inglés) aprobó el estudio, con número de referencia 2014/01304 y cada participante dio su consentimiento informado por escrito. Se midieron el peso y la altura con precisión de 0,1 kg o 1 cm. La masa magra total se midió mediante escaneo de absorciometría de rayos X de energía dual (DXA) (software APEX, versión 4.0.1, sistema Discovery Wi DXA). Se utilizó un protocolo estandarizado para medir la fuerza isométrica de prensión manual con un dinamómetro portátil Jamar y se utilizó la media de 3 intentos de la mano dominante como medida final. El rendimiento físico se evaluó mediante medición de la velocidad de la marcha en una prueba de caminata a ritmo habitual de 6 metros. El diagnóstico de sarcopenia se basó en la definición de AWGSOP de masa magra apendicular total normalizada respecto a la altura inferior a 7,00 kg/m², pruebas ya sea de bajo rendimiento físico basadas en una velocidad de marcha <0,8 m/s O BIEN baja fuerza muscular basada en prensión manual <26 kg. Los parámetros antropométricos fueron los siguientes en los grupos de control y sarcopénico:

	Control (n=20)			Sarcopénico (n=20)			valor de p
	Media	+/-	SD	Media	+/-	SD	
Altura (m)	1,67	+/-	0,06	1,63	+/-	0,07	N.S.
Peso (kg)	63,08	+/-	6,06	57,60	+/-	5,45	0,005
Índice de masa corporal (kg/m ²)	22,70	+/-	1,01	21,47	+/-	1,54	0,005
Edad (años)	70,20	+/-	4,10	72,75	+/-	4,18	N.S.
Masa corporal magra total (por absorciometría de rayos X de energía dual) (kg)	44,53	+/-	3,86	38,36	+/-	3,01	2,18 E-06
Masa grasa (por absorciometría de rayos X de energía dual) (kg)	15,39	+/-	3,67	15,73	+/-	4,02	N.S.
Índice de masa magra apendicular (kg/m ²)	7,42	+/-	0,39	6,20	+/-	0,48	1,44 E-08
Fuerza de prensión (kg)	35,11	+/-	5,93	24,91	+/-	2,56	2.02E-08
Velocidad de la marcha (m/s)	1,40	+/-	0,23	1,09	+/-	0,29	0,0006

Se tomaron muestras de sangre en ayunas de la fosa antecubital utilizando tubos Vacutainer y una palomilla subcutánea de calibre 20. Se centrifugó la sangre a 3000 rpm a 4°C durante 10 minutos y se dividió el suero en alícuotas y éstas se congelaron a -80 °C hasta el análisis, posteriormente. Los niveles de ácido antranílico y trigonelina en suero se midieron mediante cromatografía líquida seguida de espectrometría de masas (LC-MS/MS, por sus siglas en inglés) en los laboratorios BEVITAL (Bergen, Noruega). Se recogieron biopsias musculares semi-abiertas del músculo vasto lateral utilizando una aguja para biopsia de núcleo completo de 16G BioPince™ (Angiotech) con 3 longitudes de carrera ajustables (13 mm, 23 mm y 33 mm) de los 20 participantes varones y 20 controles de la misma edad, y se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta el análisis, posteriormente.

Se sometieron a ensayo las diferencias en los niveles séricos de trigonelina, ácido antranílico y su proporción (trigonelina:ácido antranílico) entre casos sarcopénicos y controles utilizando la prueba de Wilcoxon y la prueba t de Student después de la transformación con log₂. Los inventores observaron la asociación entre dichos analitos y las variables clínicas continuas utilizadas para la caracterización de la sarcopenia (índice de masa muscular magra apendicular (ALMi; kg/m²), fuerza de prensión manual y velocidad de la marcha) aplicando tanto la correlación de rangos de Spearman como la correlación de Pearson después de la transformación con log₂ de la concentración sérica de los analitos.

Las Figuras 1 a 3 muestran que los niveles en suero de trigonelina, ácido antranílico y la relación trigonelina:ácido antranílico difieren en pacientes sarcopénicos y están asociados a la masa muscular magra, la fuerza de prensión manual y la marcha. Los niveles de trigonelina (Figura 1), ácido antranílico (Figura 2) y la relación trigonelina/ácido antranílico (Figura 3) se midieron en el suero en una cohorte humana de 20 pacientes sarcopénicos y en 20 controles de la misma edad, todos de 65 o más años de edad. Los paneles de la izquierda representan los valores de log₂ de los analitos en suero de pacientes sarcopénicos frente a los de los pacientes de control. Los paneles de la derecha representan la asociación de los analitos en suero con el índice de masa corporal magra apendicular (ALMi) medido mediante DXA como sustituto de la masa muscular, la fuerza de prensión manual y la velocidad de la marcha. La línea naranja muestra la línea de regresión ajustada de las variables clínicas sobre los analitos y la zona gris muestra los intervalos de confianza al 95 % del modelo ajustado. Los valores de p informados se calcularon con un estadístico T de Student (caso control) o correlación de Pearson (análisis de correlación) en valores transformados con log₂.

Ejemplo 2

Análisis de expresión génica muscular

Para el análisis de expresión génica muscular, se extrajo el ARN total de biopsias musculares utilizando un kit de Qiagen siguiendo las instrucciones del fabricante. Se midió la cantidad de ARN con Ribogreen (Life Technologies) y se verificó la calidad del ARN utilizando el kit de análisis de ARN de sensibilidad estándar en un analizador de fragmentos (Advanced Analytical Technologies). Todas las muestras de ARN eran homogéneas y pasaron el control de calidad con una proporción 260/280nm >1,8 y puntuaciones RIN >7. Para la secuenciación del ARN, se utilizaron 250 ng de ARN total de cada muestra como material de partida para la preparación de la biblioteca y se utilizó el kit magnético Ribo-Zero (Illumina) para eliminar el ARN ribosómico. Las bibliotecas de secuenciación se prepararon utilizando el TruSeq Stranded RNA HT con el kit Ribo-Zero Gold (Illumina) seguido de 13 ciclos de amplificación de PCR con KAPA HiFi HotStart ReadyMix (Kapa BioSystems). Las bibliotecas se cuantificaron con Picogreen (Life Technologies) y el patrón de tamaños se controló con el kit de reactivo de alta sensibilidad de ADN en un LabChip GX (Perkin Elmer). A continuación, se agruparon las bibliotecas en una proporción equimolar y se agruparon a una concentración de 7 pmol en una celda de flujo de secuenciación de extremo apareado (Illumina). La secuenciación se llevó a cabo durante 2 x 101 ciclos en un HiSeq 2500 (Illumina) con química V3. Los datos generados se desmultiplexaron utilizando Casava. Las lecturas se alinearon con el genoma humano (hs_GRCh38.p2) utilizando

STAR (Dobin et al., 2013), y el número de lecturas localizadas dentro de los genes se cuantificó mediante HTSeq (Anders et al., 2015) (versión HTSeq-0.6.1p1, modo unión, cadena inversa, alineación de calidad superior a 10). Las muestras presentaban una profundidad de secuenciación de 75 a 104 millones de lecturas por muestra, de las cuales 34 a 77 millones de lecturas se localizaron de manera única.

Los genes diferencialmente expresados entre las muestras de control y sarcopénicas se definieron utilizando el paquete Limma (Smyth, 2004). Brevemente, después de eliminar los genes con una expresión media inferior a 20 lecturas, se normalizaron los datos mediante el método de la media recortada de valores M (TMM, por sus siglas en inglés) tal como se implementa en la función calcNormFactors de EdgeR (Robinson et al., 2010), y se aplicó la función voomWithQualityWeights para modelizar la relación media-varianza y estimar los pesos de calidad específicos de la muestra (Liu et al., 2015). Los valores de p se corrigieron mediante pruebas múltiples utilizando el método de Benjamini-Hochberg. Se aplicó el mismo procedimiento al caracterizar las asociaciones entre la expresión genética y los parámetros continuos o categóricos (ALMi, fuerza de prensión manual y velocidad de la marcha) utilizados para definir la sarcopenia. El análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes se llevó a cabo utilizando CAMERA (Wu y Smyth, 2012), una prueba competitiva de conjuntos de genes que averigua si un conjunto de genes anotados en la Base de datos de firmas moleculares (MSigDB) (Subramanian et al., 2005) está enriquecido en genes expresados diferencialmente. Las colecciones de MSigDB v5.2 H (conjuntos de genes característicos), C2 (conjuntos de genes seleccionados) y C5 (conjuntos de genes GO) se utilizaron para llevar a cabo el análisis de rutas.

En la figura 4, la secuenciación de ARN del músculo esquelético humano sarcopénico revela que la disfunción mitocondrial es el principal cambio transcripcional durante la sarcopenia. (A) Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes de músculo sarcopénico vs músculo de control utilizando CAMERA y la colección de conjuntos de genes característicos de MSigDB. Las barras rojas representan conjuntos de genes enriquecidos en músculo sarcopénico, y las barras azules representan conjuntos de genes reprimidos en el músculo sarcopénico. Los conjuntos de genes están ordenados según la significancia de su enriquecimiento. (B) Gráfico de enriquecimiento GSEA para el conjunto de genes de fosforilación oxidativa seleccionado de A.

Se calculó la correlación de rangos de Spearman entre la expresión génica muscular normalizada según TMM y cada analito sérico de interés (trigonelina, ácido antranílico y la relación trigonelina:ácido antranílico), y se utilizó la correlación de rangos de Spearman para llevar a cabo el análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes utilizando la colección biológica de conjuntos de genes característicos.

Clave de la Figura 4A: 1. FOSFORILACIÓN_OXIDATIVA, 2. METABOLISMO_ÁCIDOS_GRASOS, 3. DIANAS_MYC_V14, 4. RECHAZO_ALOINJERTO, 5. SEÑALIZACIÓN_MTORC1, 6. PEROXISOMA, 7. ADIPOGÉNESIS, 8. TRANSICIÓN_MESENQUIMAL_EPITELIAL, 9. UNIÓN_APICAL, 10. PUNTO DE CONTROL_G2M, 11. METABOLISMO_ÁCIDOS_BILIARES, 12. RESPUESTA_PROTEÍNA_NO_PLEGADA, 13. RUTA_ESPECIES_OXÍGENO_REACTIVO, 14. HUSO_MITÓTICO, 15. RESPUESTA_UV_POSITIVA, 16. RESPUESTA_UV_DN, 17. SEÑALIZACIÓN_PI3K_AKT_MTOR, 18. DIANAS_MYC_V2, 19. SEÑALIZACIÓN_KRAS_DN, 20. SEÑALIZACIÓN_HEDGEHOG, 21. DIANAS_E2F, 22. RESPUESTA_INTERFERÓN_GAMMA, 23. SUPERFICIE_APICAL, 24. SEÑALIZACIÓN_TGF_BETA, 25. SECRECIÓN_PROTEÍNAS, 26. SEÑALIZACIÓN_IL2_STAT5.

Las Figuras 5 a 7 muestran la correlación de la expresión génica del músculo esquelético con los niveles séricos de trigonelina, ácido antranílico y la proporción trigonelina:ácido antranílico. Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (GSEA, por sus siglas en inglés) de la expresión génica muscular que se correlaciona con los niveles séricos de trigonelina (Figura 5), ácido antranílico (Figura 6) y la proporción trigonelina/ácido antranílico (Figura 7). Se llevó a cabo el análisis GSEA utilizando la prueba de conjuntos de genes de media de rangos y la colección biológica de conjuntos de genes característicos de MSigDB. Las barras rojas representan conjuntos de genes cuya expresión en el músculo esquelético se correlaciona positivamente con los niveles séricos del analito, y las barras azules representan conjuntos de genes cuya expresión en el músculo esquelético se correlaciona negativamente con los niveles séricos del analito. Los conjuntos de genes están ordenados según la significancia de su enriquecimiento y solo se representan los conjuntos de genes con una tasa de falsas identificaciones (FDR, por sus siglas en inglés) <1 %. Los paneles izquierdos representan el gráfico de enriquecimiento GSEA para el conjunto de genes de fosforilación oxidativa.

Clave de la Figura 5A: 1. FOSFORILACIÓN_OXIDATIVA, 2. SEÑALIZACIÓN_MTORC1, 3. SECRECIÓN_PROTEÍNAS, 4. ADIPOGÉNESIS, 5. METABOLISMO_ÁCIDOS_GRASOS, 6. DIANAS_MYC_V17, 7. PEROXISOMA, 8. REPARACIÓN_ADN, 9. GLUCÓLISIS, 10. HUSO_MITÓTICO, 11. MIOGÉNESIS, 12. RESPUESTA_INTERFERÓN_GAMMA, 13. SEÑALIZACIÓN_PI3K_AKT_MTOR, 14. SEÑALIZACIÓN_WNT_BETA_CATENINA, 15. RESPUESTA_INTERFERÓN_ALFA, 16. RECHAZO_ALOINJERTO, 17. METABOLISMO_ÁCIDOS_BILIARES, 18. RESPUESTA_ÁNDROGENOS, 19. HOMEOSTASIS_COLESTEROL

Clave de la Figura 6A: 1. FOSFORILACIÓN_OXIDATIVA, 2. METABOLISMO_ÁCIDOS_GRASOS, 3. ADIPOGÉNESIS, 4. PUNTO DE CONTROL_G2M, 5. METABOLISMO_ÁCIDOS_BILIARES, 6. PEROXISOMA, 7. MIOGÉNESIS.

Clave de la Figura 7A: 1. FOSFORILACIÓN_OXIDATIVA, 2. METABOLISMO_ÁCIDOS_GRASOS, 3. ADIPOGÉNESIS, 4. SEÑALIZACIÓN_MTORC1, 5. PEROXISOMA, 6. SECRECIÓN_PROTEÍNAS, 7. MIOGÉNESIS, 8. PUNTO DE CONTROL_G2M, 9. DIANAS_MYC_V110 METABOLISMO_ÁCIDOS_BILIARES, 11. REPARACIÓN_ADN, 12. HOMEOSTASIS_COLESTEROL, 13. SEÑALIZACIÓN_KRAS_DN, 14. GLUCÓLISIS.

La Figura 8 muestra que el músculo sarcopénico humano presenta una menor expresión de genes tales como NMAT1, NAMPT y PNP, que controlan la biosíntesis de NAD a partir de precursores de NAD o de la dieta y el reciclado de NAD. Se midió la expresión génica muscular mediante secuenciación de ARN de alta cobertura. NMNAT: nicotinamida nucleótido adeniltransferasa 1; NAMPT: nicotinamida fosforibosiltransferasa; PNP: purina nucleósido fosforilasa).

Ejemplo 3

Medición de los niveles de NAD⁺ en biopsias musculares

Con el fin de determinar si los niveles de NAD podrían ser un inductor corriente arriba de la firma mitocondrial del músculo sarcopénico, se midió el NAD en el material de biopsia muscular de seres humanos de edad avanzada. Se midieron los niveles de NAD⁺ en biopsias musculares humanas tal como se describe en Dall et al, 2018. Brevemente, se lisaron 5 mg de tejido muscular de biopsias restantes en 200 μ l de ácido perclórico 0,6 M y el sobrenadante se diluyó 250 veces en Na₂HPO₄ 10 mM, pH 8,0. Se agruparon 100 μ l de muestra diluida con 100 μ l de mezcla de reacción (Na₂HPO₄ 100 mM pH 8, etanol al 2 %, 90 U/ml de alcohol deshidrogenasa, 130 mU/ml de diaforasa, resazurina 10 μ M, mononucleótido flavina 10 μ M y nicotinamida 10 mM), y se midió el aumento de fluorescencia (Exc.: 540 nm/Em.: 580) durante 10 min. Se calculó el contenido de NAD⁺ a partir de una curva patrón y se normalizó respecto al peso de tejido.

La Figura 9 muestra que se produjo una reducción significativa (32 %) de los niveles de NAD en el músculo esquelético humano de pacientes sarcopénicos de edad avanzada. Dicha gran reducción de los niveles de NAD⁺ en el músculo esquelético de personas con sarcopenia asocia por primera vez los bajos niveles de NAD⁺ con una patología relacionada con la edad en seres humanos y constituye la primera demostración de deficiencia de NAD en el músculo esquelético humano. En combinación con la eficacia preclínica de precursores de NAD como NR y NMN en músculos envejecidos en ratones, este resultado ampliará la relevancia clínica de la biología de NAD en el envejecimiento, así como guiará la traducción en aplicación clínica para la sarcopenia y los déficits de movilidad asociados a la edad.

Ejemplo 4

Mediciones de metabolitos en suero para un grupo étnico diferente e incluyendo mujeres.

En el presente ejemplo se consideraron setenta participantes de origen predominantemente caucásico, 52 mujeres y 18 hombres, con una mediana de 78 años de edad (intervalo entre cuartiles 76, 81).

Dichos 70 participantes formaron parte del Estudio de sarcopenia de Hertfordshire (HSS, por sus siglas en inglés), un subestudio del Estudio de cohorte de Hertfordshire del Reino Unido (HCS, por sus siglas en inglés) diseñado para investigar las influencias del curso de la vida en la morfología muscular, la masa y la fuerza en personas mayores que viven independientemente, o que formaban parte de la fase de extensión del estudio (HSSe, por sus siglas en inglés). La caracterización del músculo esquelético realizada en dicho estudio incluyó la composición corporal y la masa magra determinadas mediante escaneo de absorciometría de rayos X de energía dual (DXA).

Se obtuvieron muestras de sangre en ayunas de la fosa antecubital utilizando tubos Vacutainer y una palomilla subcutánea de calibre 20. Se centrifugó la sangre a 3000 rpm a 4 °C durante 10 minutos y se dividió el suero en alícuotas y éstas se congelaron a -80 °C hasta el análisis, posteriormente. Los niveles de ácido antranílico y trigonelina en suero se midieron mediante cromatografía líquida seguida de espectrometría de masas (LC-MS/MS) en los laboratorios BEVITAL (Bergen, Noruega).

La asociación entre la proporción trigonelina:ácido antranílico y el índice de masa muscular magra apendicular (ALMi; kg/m²) se estimó mediante la aplicación de una regresión ajustada para la edad después de la transformación con log₂ de la concentración en suero de los analitos.

La Figura 10 muestra que los niveles séricos de la proporción trigonelina:ácido antranílico están asociados a la masa muscular magra evaluada por el índice de masa magra apendicular. Los niveles de trigonelina y ácido antranílico se midieron en el suero de una cohorte humana de 70 sujetos (52 mujeres y 18 hombres), todos de 65 o más años de edad. El gráfico representa la asociación entre los valores log₂ de la proporción de los analitos (trigonelina:ácido antranílico) en suero (eje x), y el índice de masa corporal magra apendicular (ALMi) medido mediante DXA como sustituto de la masa muscular (eje y). La línea muestra la línea de regresión ajustada del ALMi sobre log₂(trigonelina/ácido antranílico). De acuerdo con la regresión lineal simple se obtuvo un coeficiente de correlación de Pearson de 0,23, valor de p=0,031; basándose en la regresión ajustada para la edad se obtuvo una R² ajustada de 51 % y un valor de p=0,024 para el coeficiente relativo a la proporción de los analitos.

BIBLIOGRAFÍA

Anders, S., Pyl, P.T., and Huber, W. (2015). HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* 31, 166-169.

Anker, S.D., Morley, J.E., and von Haehling, S. (2016). Welcome to the ICD-10 code for sarcopenia. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle* 7, 512-514.

Chen, L.K., Liu, L.K., Woo, J., Assantachai, P., Auyeung, T.W., Bahyah, K.S., Chou, M.Y., Chen, L.Y., Hsu, P.S., Kairit, O., et al. (2014). Sarcopenia in Asia: consensus report of the Asian Working Group for Sarcopenia. *Journal of the American Medical Directors Association* 15, 95-101.

Clark RV, Walker AC, O'Connor-Semmes RL, Leonard MS, Miller RR, Stimpson SA, Turner SM, Ravussin E, Cefalu WT, Hellerstein MK, Evans WJ. Total body skeletal muscle mass: estimation by creatine (methyl-d3) dilution in humans. *J Appl Physiol* (1985). 2014 Jun 15;116(12):1605-13.

Cruz-Jentoft, A.J., Baeyens, J.P., Bauer, J.M., Boirie, Y., Cederholm, T., Landi, F., Martin, F.C., Michel, J.P., Rolland, Y., Schneider, S.M., et al. (2010). Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age Ageing* 39, 412-423.

Dall, M., Penke, M., Sulek, K., Matz-Soja, M., Holst, B., Garten, A., Kiess, W., and Treebak, J.T. Hepatic NAD(+) levels and NAMPT abundance are unaffected during prolonged high-fat diet consumption in C57BL/6JBomTac mice. *Molecular and Cellular Endocrinology* (2018) S0303-7207 (18) 30048.

Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., and Gingeras, T.R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29, 15-21.

Liu, R., Holik, A.Z., Su, S., Jansz, N., Chen, K., Leong, H.S., Blewitt, M.E., Asselin-Labat, M.L., Smyth, G.K., and Ritchie, M.E. (2015). Why weight? Modelling sample and observational level variability improves power in RNA-seq analyses. *Nucleic acids research* 43, e97.

Robinson, M.D., McCarthy, D.J., and Smyth, G.K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26, 139-140.

Smyth, G.K. (2004). Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical applications in genetics and molecular biology* 3, Article3.

Studenski SA, Peters KW, Alley DE, Cawthon PM, McLean RR, Harris TB, Ferrucci L, Guralnik JM, Fragala MS, Kenny AM, Kiel DP, Kritchevsky SB, Shardell MD, Dam TT, Vassileva MT (2014). The FNIH sarcopenia project: rationale, study description, conference recommendations, and final estimates. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 69(5), 547-558.

Stimpson SA, Leonard MS, Clifton LG, Poole JC, Turner SM, Shearer TW, Remlinger KS, Clark RV, Hellerstein MK, Evans WJ. (2013) Longitudinal changes in total body creatine pool size and skeletal muscle mass using the D₃-creatine dilution method. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. Jun 25.

Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Golub, T.R., Lander, E.S., et al. (2005). Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 15545-15550.

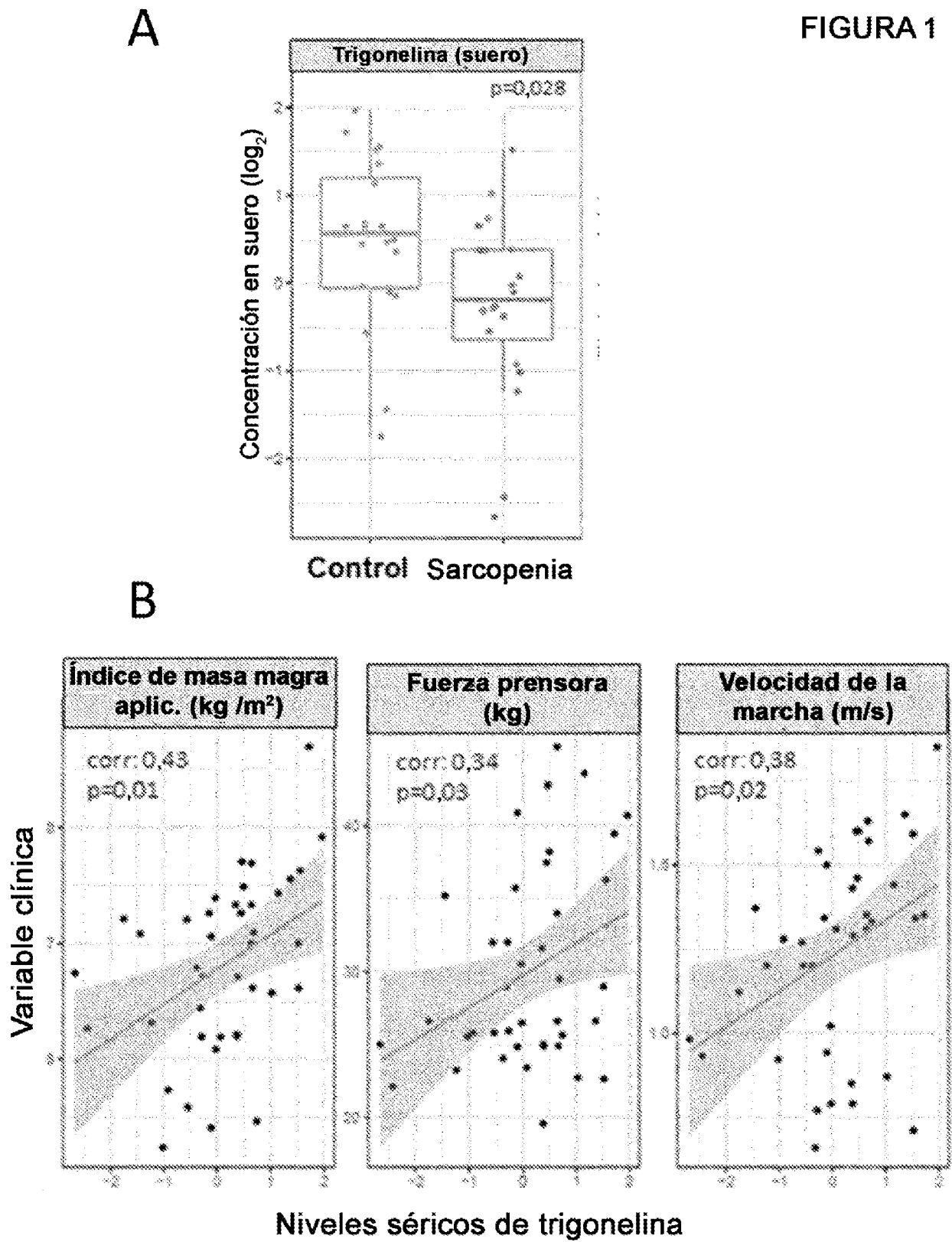
Wu, D., and Smyth, G.K. (2012). Camera: a competitive gene set test accounting for inter-gene correlation. *Nucleic acids research* 40, e133.

REIVINDICACIONES

1. Método para determinar si un sujeto presenta sarcopenia, que comprende:
 - (a) determinar el nivel de trigonelina en una muestra obtenida del sujeto,
 - (b) comparar el nivel de trigonelina en la muestra con un valor de referencia,
 en el que un nivel reducido de trigonelina en la muestra en comparación con el valor de referencia es indicativo de sarcopenia en el sujeto.
2. Método según la reivindicación 1, que comprende:
 - (c) determinar adicionalmente el nivel de ácido antranílico en una muestra obtenida del sujeto,
 - (d) determinar la proporción entre trigonelina y ácido antranílico en la muestra,
 - (e) comparar la proporción de trigonelina y ácido antranílico en la muestra con un valor de referencia,
 en el que la proporción entre trigonelina y ácido antranílico en la muestra en comparación con el valor de referencia es indicativa de sarcopenia.
3. Método según la reivindicación 2, en el que una reducción de la proporción entre trigonelina y ácido antranílico en la muestra del sujeto en comparación con el valor de referencia es indicativa de sarcopenia en el sujeto.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la sarcopenia se caracteriza por uno o más de los siguientes: baja masa muscular, baja fuerza muscular y bajo rendimiento físico.
5. Método según la reivindicación 4, en el que (i) la masa muscular se mide mediante DXA, RM o el método de dilución de creatina D3, (ii) la fuerza muscular se mide por la fuerza de prensión manual o la fuerza de los extensores de rodilla, y (iii) el rendimiento físico se mide a partir de la velocidad de la marcha, SPPB, prueba de la caminata de 400 m, prueba de tiempo para levantarse y caminar, o la prueba de subida de escaleras.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los niveles de trigonelina y/o ácido antranílico se determinan mediante espectrometría de masas.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el sujeto es un sujeto humano.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el sujeto humano es un adulto mayor o un adulto de edad avanzada.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el valor de referencia se determina a partir de una muestra obtenida del mismo sujeto o de un grupo de sujetos.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la muestra obtenida del sujeto es una muestra derivada de sangre.
11. Método según las reivindicaciones 1 a 10, en el que la muestra obtenida del sujeto es una muestra de orina.
12. Método para predecir la capacidad de respuesta a una composición nutricional de utilización en el tratamiento o prevención de la sarcopenia en el sujeto, que comprende:
 - (a) detectar el nivel de uno o más biomarcadores o una proporción de los niveles de los biomarcadores en una muestra obtenida del sujeto,
 - (b) comparar el nivel de uno o más biomarcadores o una proporción de los niveles de los biomarcadores en la muestra con un valor de referencia,
 - (c) predecir la capacidad de respuesta del sujeto a la composición nutricional basándose en los resultados de la etapa (b),
 en el que dicho biomarcador o biomarcadores es trigonelina y/o trigonelina y ácido antranílico, y en el que se predecirá que el sujeto es respondedor a la composición nutricional si:
 - el nivel de ácido antranílico está incrementado en la muestra en comparación con el valor de referencia y
 - si el nivel de trigonelina está reducido en la muestra en comparación con el valor de referencia,
 - y/o si la proporción entre trigonelina y ácido antranílico está reducida en la muestra en comparación con la proporción de valor de referencia.
13. Método según la reivindicación 12, en el que la composición nutricional comprende vitamina B3.
14. Método según la reivindicación 12, en el que la composición nutricional comprende un precursor de NAD.

15. Método según la reivindicación 14, en el que el precursor de NAD es ribósido de nicotinamida.
16. Método según la reivindicación 12, en el que el biomarcador es trigonelina.
17. Método según la reivindicación 16, en el que la composición nutricional comprende trigonelina.
18. Método según la reivindicación 16, en el que la composición nutricional comprende extracto de café.

FIGURA 1



A

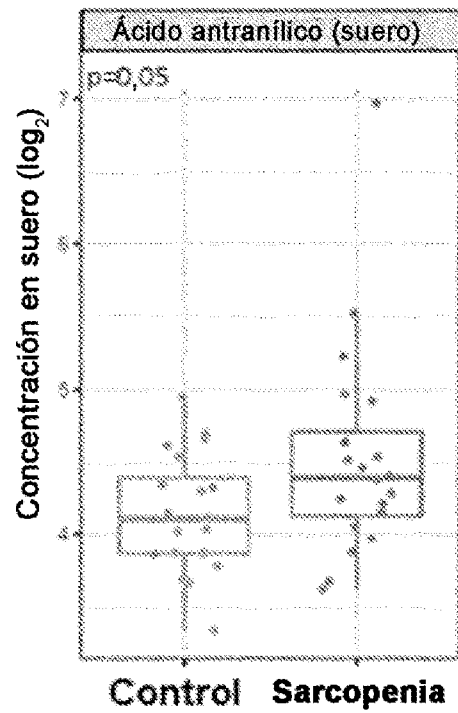
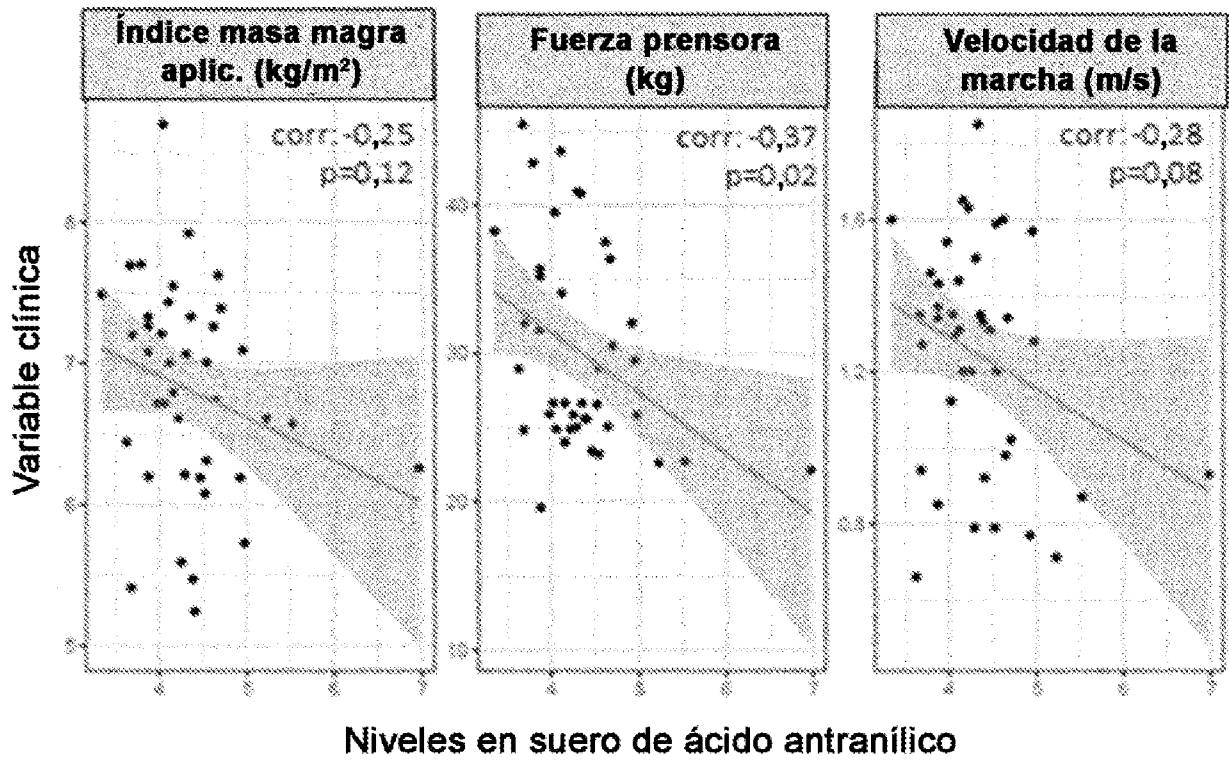


FIGURA 2

B



A

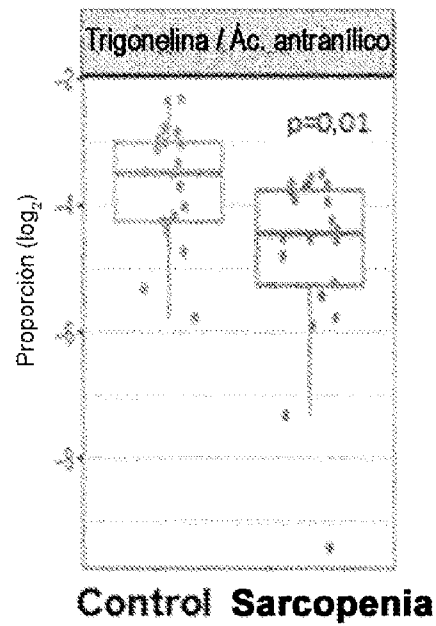


FIGURA 3

B

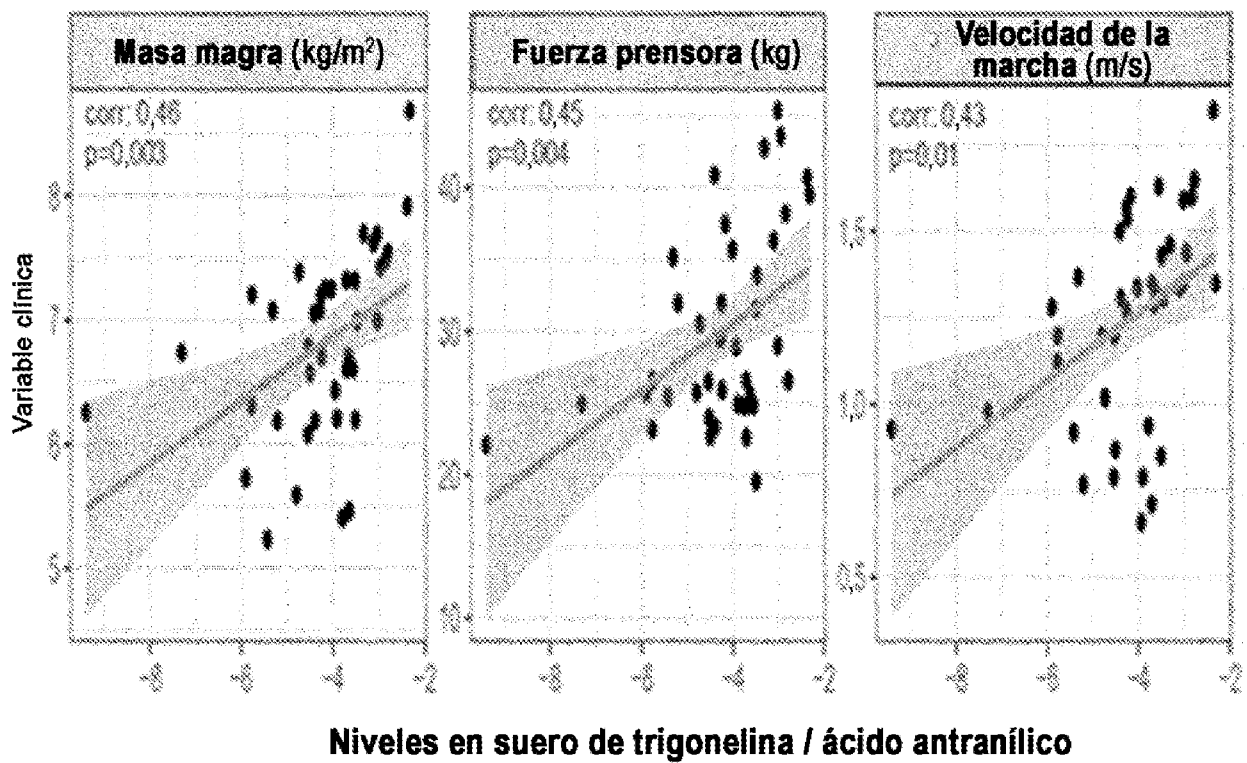


FIGURA 4A

Cambios de expresión génica muscular entre sarcopenia y controles

A

1. Fosforilación
oxidativa

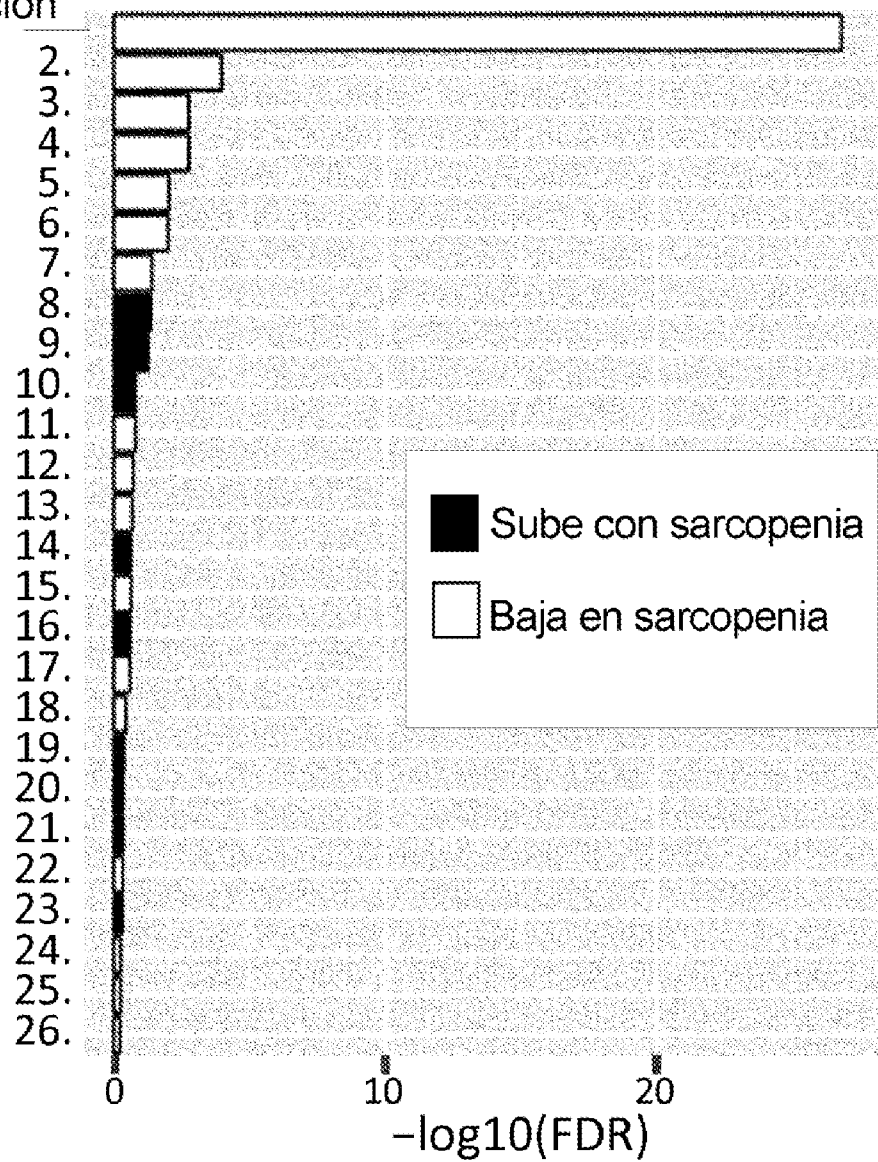


FIGURA 4B

Cambios de expresión génica muscular entre sarcopenia y controles

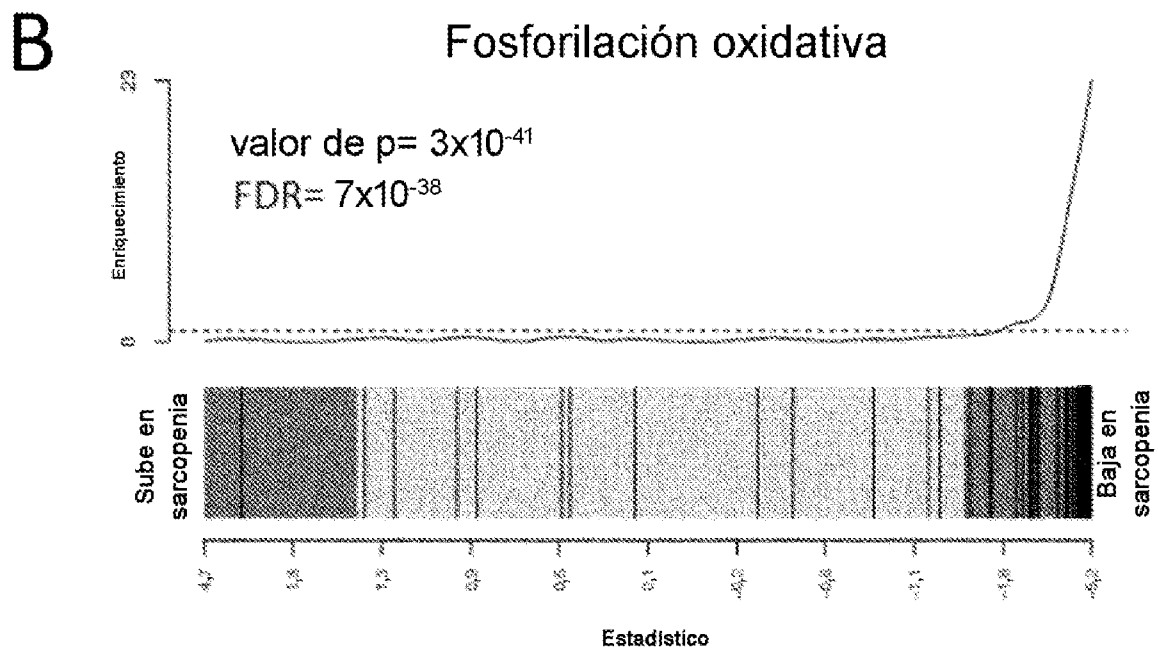


FIGURA 5A

Correlación de trigonelina en suero con la expresión génica muscular

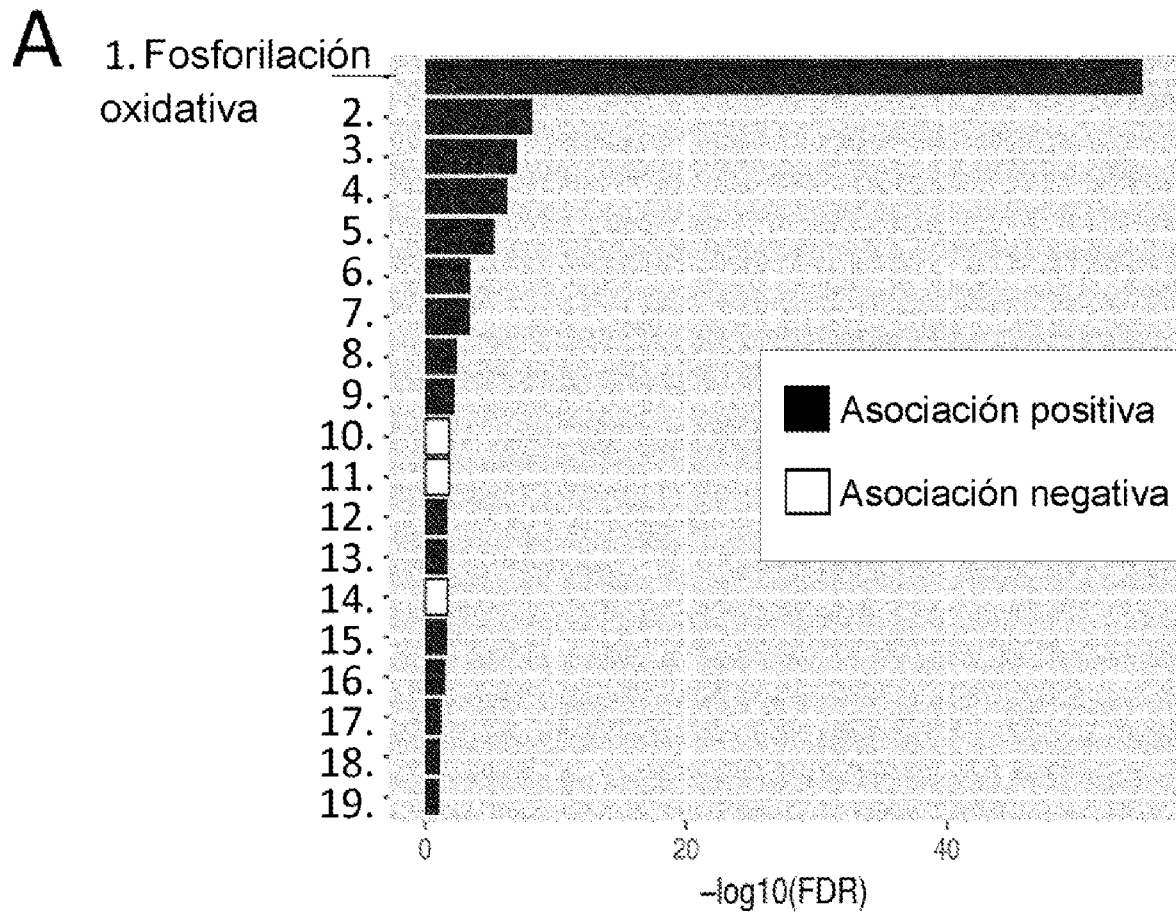


FIGURA 5B

Correlación de trigonelina en suero con la expresión génica muscular

B

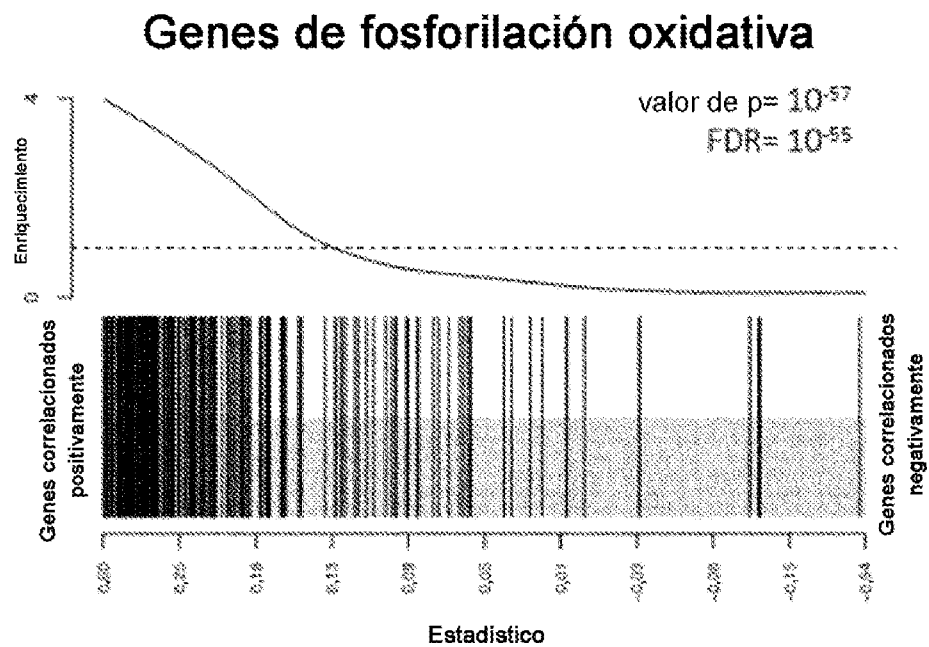


FIGURA 6A

Correlación de ácido antranílico en suero con la expresión génica muscular

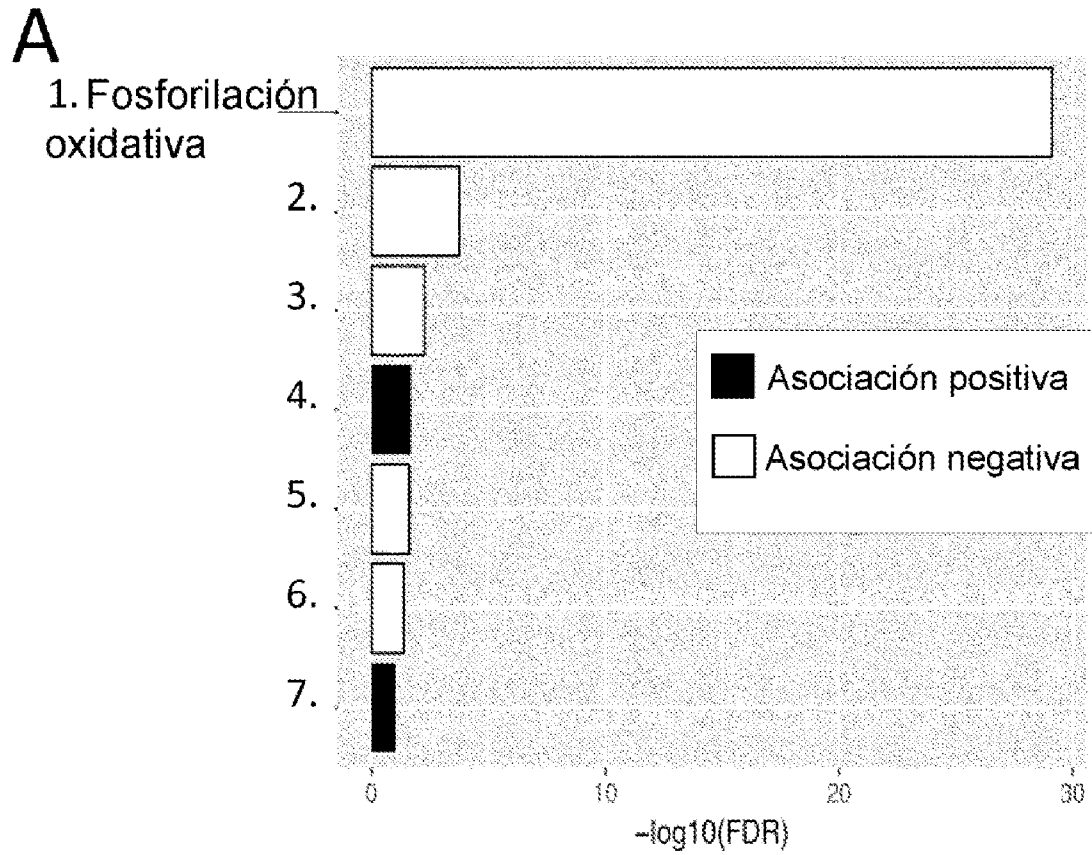


FIGURA 6B

Correlación de **ácido antranílico** en suero con expresión génica muscular

B

Genes de fosforilación oxidativa

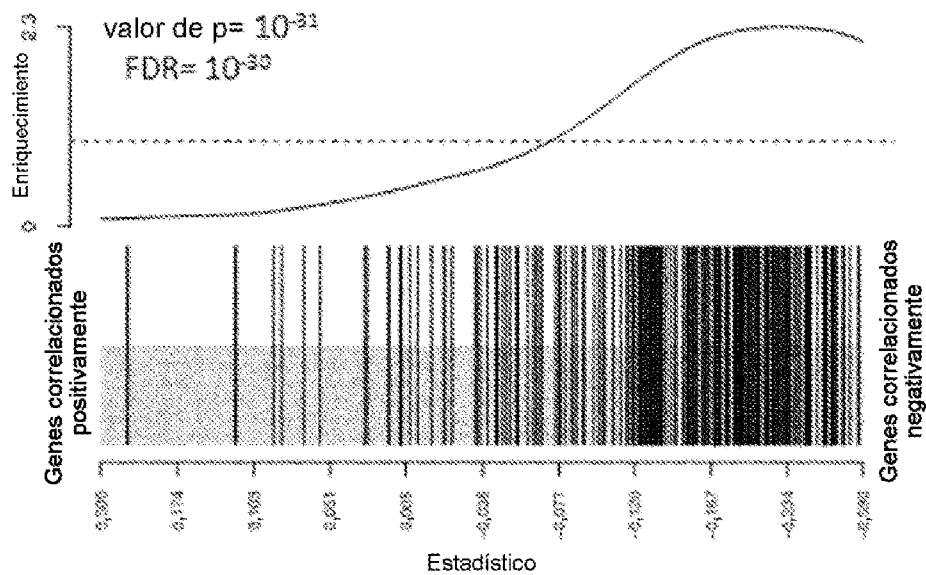


FIGURA 7A

Correlación de la proporción **trigonelina / ácido antranílico** séricas con la expresión génica muscular

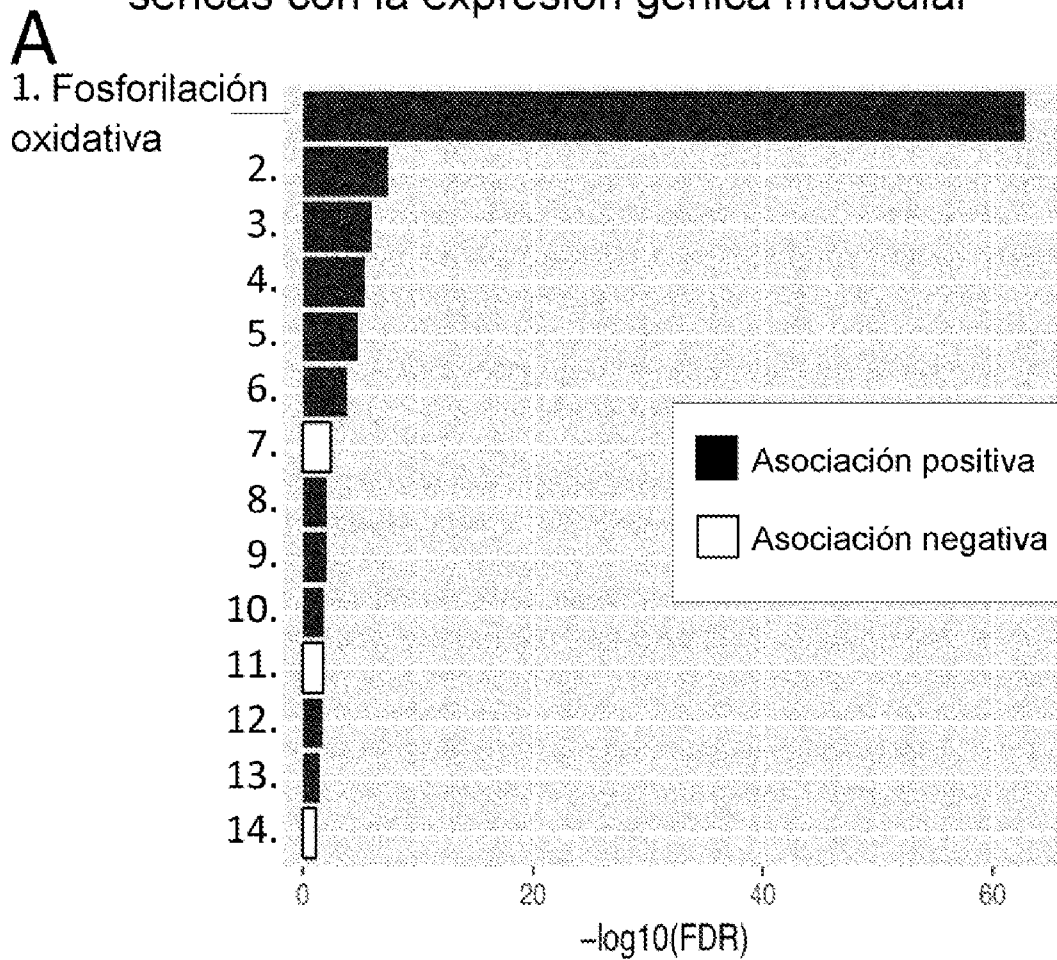
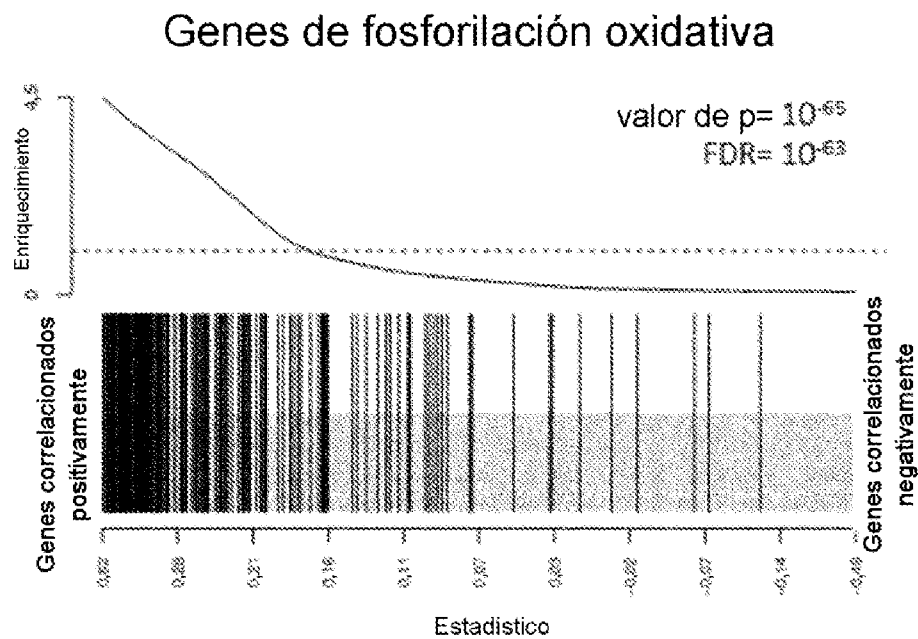


FIGURA 7B

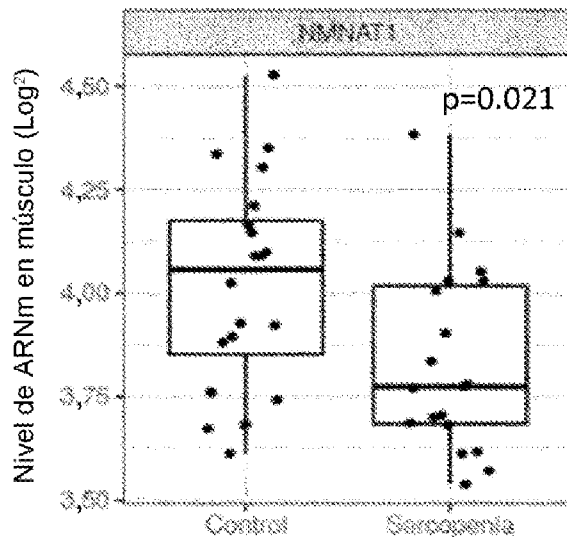
Correlación de la proporción trigonelina /
ácido antranílico séricas con la expresión
génica muscular

B

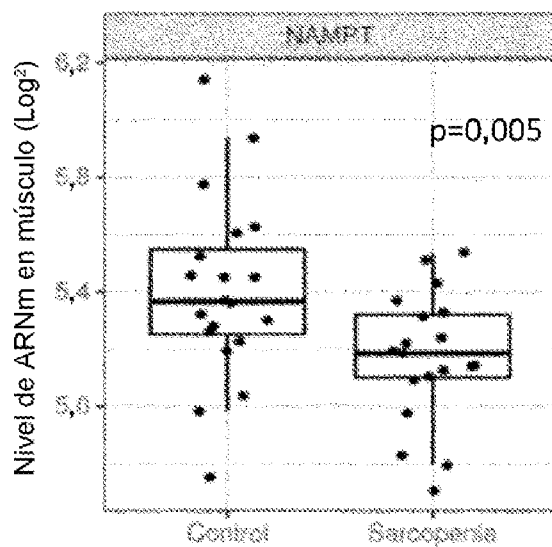


Cambios de expresión génica muscular entre sarcopenia y controles de genes de biosíntesis de NAD

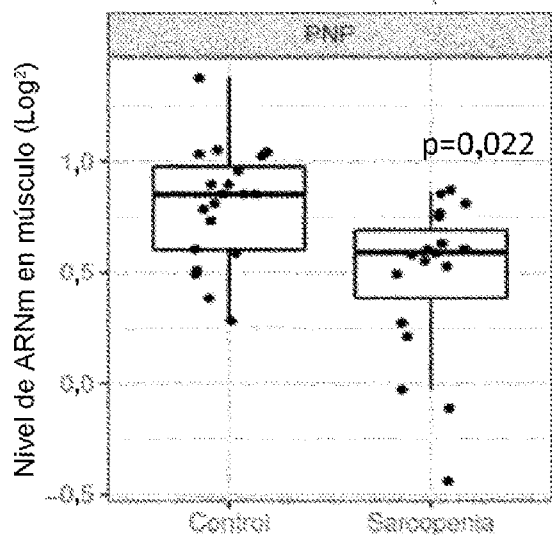
FIGURA 8



NMNAT1:
Nicotinamida-nucleótido
adenililtransferasa 1



NAMPT:
Nicotinamida
fosforibosiltransferasa



PNP:
Nucleósido purina
fosforilasa

FIGURA 9

Niveles de NAD⁺ en biopsias musculares de participantes de control y sarcopénicos

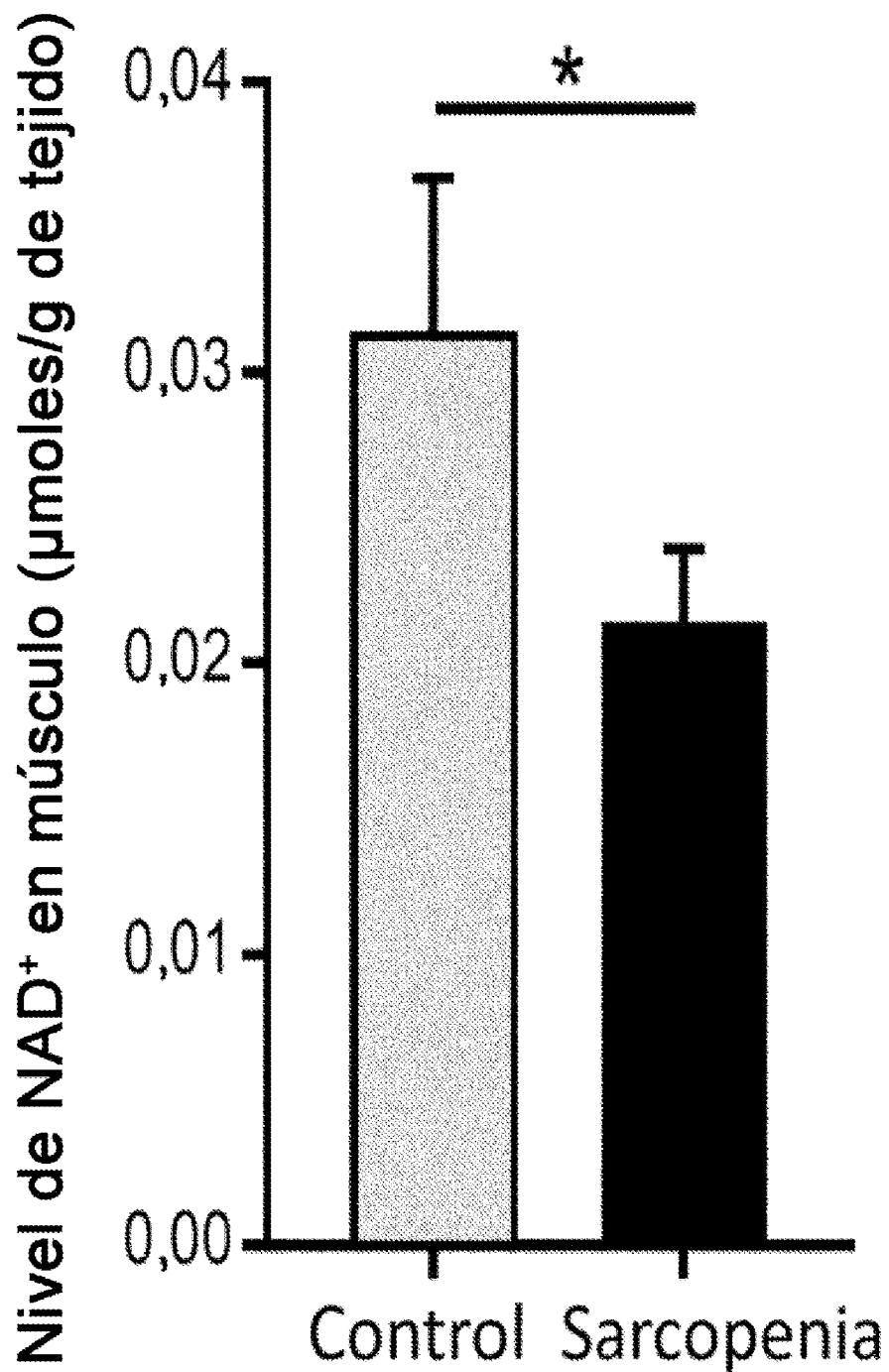


FIGURA 10

