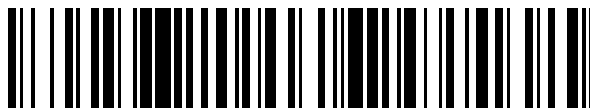


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 743**

21 Número de solicitud: 201430444

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

28.03.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

28.09.2015

Fecha de la concesión:

30.06.2016

45 Fecha de publicación de la concesión:

07.07.2016

73 Titular/es:

**INSTITUT D'INVESTIGACIÓ BIOMÈDICA DE
BELLVITGE (IDIBELL) (90.0%)
Hospital Duran i Reynals, 3ª planta, Gran Via del
l'Hospitalet, 199
08908 Hospitalet de Llobregat (Barcelona) ES y
UNIVERSITAT DE BARCELONA (10.0%)**

72 Inventor/es:

**BARRACHINA CASTILLO, Marta ;
FERRER ABIZANDA, Isidre y
BLANCH LOZANO, Marta**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

54 Título: **Marcadores mitocondriales de enfermedades neurodegenerativas**

57 Resumen:

Marcadores mitocondriales de enfermedades neurodegenerativas.

La presente invención se refiere a un método in vitro para diagnosticar o para determinar el riesgo de desarrollar una enfermedad neurodegenerativa en un sujeto basado en la determinación del patrón de metilación en ciertas regiones del ADN mitocondrial de dicho sujeto o en la determinación del nucleótido en la posición polimórfica 16519 del ADN mitocondrial de dicho sujeto. Finalmente, la presente invención se refiere a ácidos nucleicos adecuados para poner en práctica la invención.

ES 2 546 743 B1

MARCADORES MITOCONDRIALES DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

DESCRIPCIÓN

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se encuadra dentro de los métodos de diagnóstico de enfermedades neurológicas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Existe un número considerable de enfermedades neurodegenerativas que están causadas o están asociadas con alteraciones en la función mitocondrial. La enfermedad de Alzheimer (EA) y la enfermedad de Parkinson (EP) se encuentran dentro de este grupo. Las características fisiopatológicas de la EA y de la EP están relacionadas con depósitos de proteínas agregadas. En concreto, la EA está asociada con la formación de agregados intracelulares de tau fosforilado en los ovillos neurofibrilares y agregados extracelulares del péptido β -amiloide en las placas seniles y la EP está asociada con la formación de agregados anormales de α -sinucleína que constituyen el componente principal de los
15 llamadas cuerpos de Lewy y neuritas de Lewy.

Es conocido que enfermos de Alzheimer muestran niveles reducidos de la subunidad ND4
20 en tejido cerebral y que enfermos de Parkinson muestran niveles reducidos de ND6 en la sustancia negra. Además, estudios genéticos han permitido identificar mutaciones en varios genes COX y en la región D-Loop así como deleciones en el ADNmt de cerebros de sujetos con EA y en la sustancia negra en sujetos con EP.

25 En la técnica se han desarrollado diferentes métodos y estrategias para el diagnóstico, la predicción del inicio y el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas y, en particular de EA y EP. Así, se han descrito métodos de diagnóstico de enfermedades neurodegenerativas basados en la identificación de mutaciones en el ADN mitocondrial mediante la el empleo de la técnica RFLP (polimorfismos de longitud de fragmentos de
30 restricción) o de otras técnicas relacionadas. El documento WO98038334 describe un método de diagnóstico de EA basado en la identificación de mutaciones en genes COX. También se ha propuesto un método de diagnóstico de la EP en un sujeto mediante la identificación de polimorfismos de nucleótido simple en muestras de ADN mitocondrial de un sujeto (WO 2000063441). Otros documentos del estado de la técnica describen métodos
35 para el diagnóstico de Alzheimer o Parkinson basados en la identificación de polimorfismos

en genes nucleares que codifican proteínas que controlan el proceso de transcripción mitocondrial.

A pesar de los esfuerzos hechos hasta la fecha, todavía existe la necesidad de disponer de métodos fiables para diagnosticar enfermedades neurodegenerativas tales como EA y EP, así como para diagnosticar del estadio de dichas enfermedades y pronosticar la evolución de las mismas.

COMPENDIO DE LA INVENCION

En un primer aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para diagnosticar o para determinar el riesgo de desarrollar una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson en un sujeto que comprende determinar en una muestra de dicho sujeto que comprende ADN mitocondrial, el patrón de metilación en la región D-loop y/o en el gen ND1, en donde el patrón de metilación se determina en al menos un sitio seleccionado del grupo formado por:

- (i) los sitios CpG de la región D-loop mostrados en la Tabla 1
- (ii) los sitios CpG del gen ND1 mostrados en la Tabla 2,
- (iii) los sitios CHG de la región D-loop mostrados en la Tabla 3,
- (iv) los sitios CHG del gen ND1 mostrados en la Tabla 4, y/o
- (v) los sitios CHH de la región D-loop mostrados en la Tabla 5,

en donde una hipermetilación en al menos uno de dichos sitios CpG de la región D-loop, una hipermetilación en al menos uno de dichos sitios CHG de la región D-loop, una hipermetilación en al menos uno de dichos sitios CHH de la región D-loop, una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CpG del gen ND1 y/o una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CHG en el gen ND1 es indicativo de que el sujeto sufre de la enfermedad de Alzheimer o de que el sujeto tiene un riesgo elevado de desarrollar la enfermedad de Alzheimer o

en donde una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CpG de la región D-loop, una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CHG de la región D-loop y/o una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CHH de la región D-loop es indicativo de que el sujeto sufre de la enfermedad de Parkinson o de que el sujeto tiene un riesgo elevado de desarrollar la enfermedad de Parkinson.

En un segundo aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para seleccionar un sujeto para someterlo a un tratamiento preventivo de una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson en un sujeto que comprende determinar en una muestra de dicho sujeto que comprende ADN

mitocondrial, el patrón de metilación en la región D-loop y/o en el gen ND1, en donde el patrón de metilación se determina en al menos un sitio seleccionado del grupo formado por:

- (i) los sitios CpG de la región D-loop mostrados en la Tabla 1,
- (ii) los sitios CpG del gen ND1 mostrados en la Tabla 2;
- 5 (iii) los sitios CHG de la región D-loop mostrados en la Tabla 3,
- (iv) los sitios CHG del gen ND1 mostrados en la Tabla 4, y/o
- (v) los sitios CHH de la región D-loop mostrados en la Tabla 5

en donde una hipermetilación en al menos uno de dichos sitios CpG de la región D-loop, una hipermetilación en al menos uno de dichos sitios CHG de la región D-loop, una
10 hipermetilación en al menos uno de dichos sitios CHH de la región D-loop, una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CpG del gen ND1 y/o una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CHG en el gen ND1 es indicativo de que el sujeto es candidato a recibir un tratamiento dirigido a prevenir la enfermedad de Alzheimer o

en donde una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CpG de la región D-loop, una
15 hipometilación en al menos uno de dichos sitios CHG de la región D-loop y/o una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CHH de la región D-loop es indicativo de que el sujeto es candidato a recibir un tratamiento dirigido a prevenir la enfermedad de Parkinson.

20 En un tercer aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para monitorizar la progresión de una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson en un sujeto que comprende:

a) determinar en una muestra de dicho sujeto que comprende ADN mitocondrial el patrón de metilación en la región D-loop, y/o en el gen ND1, en donde el patrón de metilación
25 se determina en al menos un sitio seleccionado del grupo formado por:

- (i) los sitios CpG de la región D-loop mostrados en la Tabla 1,
- (ii) los sitios CpG del gen ND1 mostrados en la Tabla 2;
- (iii) los sitios CHG de la región D-loop mostrados en la Tabla 3,
- (iv) los sitios CHG del gen ND1 mostrados en la Tabla 4, y/o
- 30 (v) los sitios CHH de la región D-loop mostrados en la Tabla 5

b) comparar el patrón de metilación determinado en la etapa a) con dicho patrón de metilación obtenido en un estadio anterior de la enfermedad,

en donde una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CpG de la región D-loop, una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CHG de la región D-loop, una
35 hipometilación en al menos uno de dichos sitios CHH de la región D-loop, una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CpG del gen ND1 y/o una hipometilación en

al menos uno de dichos sitios CHG en el gen ND1 con respecto dicho patrón de metilación determinado en un estadio anterior de la enfermedad, es indicativo del avance de la enfermedad de Alzheimer; y

en donde una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CpG de la región D-loop, una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CHG de la región D-loop y/o una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CHH de la región D-loop con respecto a dicho patrón de metilación determinado en un estadio anterior de la enfermedad es indicativo del avance de la enfermedad de Parkinson.

En un cuarto aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para diagnosticar o para determinar el riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer en un sujeto que comprende determinar en una muestra que comprende ADN mitocondrial de dicho sujeto el nucleótido en la posición polimórfica 16519 según la secuencia definida con el número de acceso NC_012920 en la base de datos NCBI, en donde la detección del nucleótido C en dicha posición polimórfica o la presencia del nucleótido C en dicha posición polimórfica en al menos un 60% de las moléculas de ADN mitocondrial de dicho sujeto es indicativo de que el sujeto sufre dicha enfermedad o de que el sujeto tiene un riesgo elevado de desarrollar dicha enfermedad.

En un quinto aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para seleccionar un sujeto para someterlo a un tratamiento preventivo de la enfermedad de Alzheimer que comprende determinar en una muestra que comprende ADN mitocondrial de dicho sujeto el nucleótido en la posición polimórfica 16519 según la secuencia definida con el número de acceso NC_012920 en la base de datos NCBI, en donde la detección del nucleótido C en dicha posición polimórfica o la presencia del nucleótido C en dicha posición polimórfica en al menos un 60% de las moléculas de ADN mitocondrial de dicho sujeto es indicativo de que el sujeto es candidato a recibir un tratamiento dirigido a prevenir la enfermedad de Alzheimer.

En un sexto aspecto, la invención se relaciona con un ácido nucleico seleccionado del grupo formado por:

(i) un ácido nucleico que comprende al menos 9 nucleótidos contiguos de una región del ADN mitocondrial en donde dicha región comprende al menos un sitio de metilación seleccionado del grupo formado por:

- a) los sitios CpG de la región D-loop mostrados en la Tabla 1,
- b) los sitios CpG del gen ND1 mostrados en la Tabla 2;
- c) los sitios CHG de la región D-loop mostrados en la Tabla 3,

- d) los sitios CHG del gen ND1 mostrados en la Tabla 4, y
 e) los sitios CHH de la región D-loop mostrados en la Tabla 5,
- (ii) un ácido nucleico que comprende al menos 9 nucleótidos contiguos de una región de ADN mitocondrial en donde dicha región comprende al menos un sitio de metilación seleccionado del grupo formado por:
- 5 a) los sitios CpG de la región D-loop mostrados en la Tabla 1,
 b) los sitios CpG del gen ND1 mostrados en la Tabla 2;
 c) los sitios CHG de la región D-loop mostrados en la Tabla 3,
 d) los sitios CHG del gen ND1 mostrados en la Tabla 4, y
 10 e) los sitios CHH de la región D-loop mostrados en la Tabla 5.
 en donde la posición correspondiente a la citosina en el sitio CpG, CHG o CHH es uracilo; y
- (iii) un polinucleótido que hibrida de forma específica con los ácidos nucleicos de (i) o (ii).
- 15 En un séptimo aspecto, la invención se relaciona con un kit que comprende al menos un oligonucleótido capaz de hibridar específicamente y de forma dependiente de metilación con una secuencia en el ADN mitocondrial que comprende un sitio de metilación seleccionado del grupo formado por:
- 20 (i) los sitios CpG de la región D-loop mostrados en la Tabla 1,
 (ii) los sitios CpG del gen ND1 mostrados en la Tabla 2;
 (iii) los sitios CHG de la región D-loop mostrados en la Tabla 3,
 (iv) los sitios CHG del gen ND1 mostrados en la Tabla 4, y/o
 (v) los sitios CHH de la región D-loop mostrados en la Tabla 5.
- 25 En un octavo aspecto, la invención se relaciona con un kit que comprende al menos un oligonucleótido capaz de hibridar específicamente con una zona en posición 5' o en posición 3' con respecto a un sitio de metilación en el ADN mitocondrial seleccionado del grupo formado por:
- 30 (i) los sitios CpG de la región D-loop mostrados en la Tabla 1,
 (ii) los sitios CpG del gen ND1 mostrados en la Tabla 2;
 (iii) los sitios CHG de la región D-loop mostrados en la Tabla 3,
 (iv) los sitios CHG del gen ND1 mostrados en la Tabla 4, y/o
 (v) los sitios CHH de la región D-loop mostrados en la Tabla 5,
 en donde la citosina metilada en dicha posición se ha convertido a uracilo o en otra base
 35 que es distinguible de citosina en sus propiedades de hibridación.

Finalmente, en un noveno aspecto, la invención se relaciona con el uso los kits definidos en el séptimo y octavo aspecto inventivo para determinar el patrón de metilación del ADN mitocondrial o para determinar el diagnóstico de una enfermedad neurodegenerativa en un sujeto seleccionada de la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson.

5

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Gráficos Log2(OR) para los sitios CpG (A) CHG (B) y CHH (C) en el amplicón D-Loop en la corteza entorrinal de los casos relacionados con patología EA. En el eje de las x se encuentran representados los sitios de metilación ordenados de 5' a 3'. Los sitios marcados con un diamante son los sitios diferencialmente metilados ($FDR < 0.05$). Los puntos son los valores de estimación OR, uno para cada sitio, y la banda es la banda de unión de todos los intervalos de confianza del 95%. C: muestras control, AD: Enfermedad Alzheimer.

Figura 2: Gráficos Log2(OR) para los sitios CpG (A) CHG (B) y CHH (C) en el amplicón ND1 en la corteza entorrinal de los casos relacionados con patología EA. En el eje de las x se encuentran representados los sitios de metilación ordenados de 5' a 3'. Los sitios marcados con un diamante son los sitios diferencialmente metilados ($FDR < 0.05$). Los puntos son los valores de estimación OR, uno para cada sitio, y la banda es la banda de unión de todos los intervalos de confianza del 95%. C: muestras control, AD: Enfermedad de Alzheimer.

Figura 3: Gráficos Log2(OR) para sitios CpG y no CpG (CHG y CHH) en el amplicón D-loop en la sustancia negra de pacientes con EP. En el eje de las x se encuentran representados los sitios de metilación ordenados de 5' a 3'. Los sitios marcados con un diamante son los sitios diferencialmente metilados ($FDR < 0.05$). Los puntos son los valores de estimación OR, uno para cada sitio, y la banda es la banda de unión de todos los intervalos de confianza del 95%. C: muestras control, PD: Enfermedad de Parkinson.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han desarrollado un método para diagnosticar enfermedades neurodegenerativas basado en la determinación del patrón de metilación en una muestra de ADN mitocondrial de un sujeto. Los autores de la invención han observado que, sorprendentemente, existen variaciones en el patrón de metilación en la región D-loop y en el gen ND1 en sujetos que padecen EA o EP cuando se compara con sujetos sanos tal y

como se demuestra en los ejemplos. Además, los autores de la invención han descubierto patrones de metilación diferenciales asociados con la evolución de dichas enfermedades.

Primer método de la invención

5

En un primer aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para diagnosticar o para determinar el riesgo de desarrollar una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson en un sujeto (de aquí en adelante, primer método de la invención) que comprende determinar en una muestra de dicho sujeto
10 que comprende ADN mitocondrial el patrón de metilación en la región D-loop y/o en el gen ND1, en donde el patrón de metilación se determina en al menos un sitio seleccionado del grupo formado por:

- (i) los sitios CpG de la región D-loop mostrados en la Tabla 1,
- (ii) los sitios CpG del gen ND1 mostrados en la Tabla 2;
- 15 (iii) los sitios CHG de la región D-loop mostrados en la Tabla 3,
- (iv) los sitios CHG del gen ND1 mostrados en la Tabla 4, y/o
- (v) los sitios CHH de la región D-loop mostrados en la Tabla 5

en donde una hipermetilación en al menos uno de dichos sitios CpG de la región D-loop, una hipermetilación en al menos uno de dichos sitios CHG de la región D-loop, una
20 hipermetilación en al menos uno de dichos sitios CHH de la región D-loop, una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CpG del gen ND1 y/o una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CHG en el gen ND1 es indicativo de que el sujeto sufre de la enfermedad de Alzheimer o de que el sujeto tiene un riesgo elevado de desarrollar la enfermedad de Alzheimer o

25 en donde una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CpG de la región D-loop, una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CHG de la región D-loop y/o una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CHH de la región D-loop es indicativo de que el sujeto sufre de la enfermedad de Parkinson o de que el sujeto tiene un riesgo elevado de desarrollar la enfermedad de Parkinson.

30

El término “diagnóstico” como se usa en el presente documento, se refiere tanto al proceso de intentar determinar y/o identificar una posible enfermedad en un sujeto, es decir el procedimiento de diagnóstico, como a la opinión alcanzada por este proceso, es decir, la opinión diagnóstica. Como tal, también se puede considerar como un intento de clasificación
35 del estado de un individuo en categorías separadas y distintas que permitan que se tomen decisiones médicas sobre el tratamiento y pronóstico. Como entenderá el experto en la

materia, tal diagnóstico puede no ser correcto para el 100% de los sujetos a diagnosticar, aunque se prefiere que lo sea. Sin embargo, el término requiere que una parte estadísticamente significativa de los sujetos se puedan identificar como que padecen una enfermedad, particularmente una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de la enfermedad de Alzheimer y de la enfermedad de Parkinson en el contexto de la invención, o que tiene una predisposición a la misma. El experto en la materia puede determinar si una parte es estadísticamente significativa usando diferentes herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, mediante la determinación de intervalos de confianza, la determinación del valor de p, la prueba de la t de Student, la de Mann-Whitney, etc. (véase, Dowdy y Wearden, 1983). Los intervalos de confianza preferidos son al menos del 50%, al menos del 60%, al menos del 70%, al menos del 80%, al menos del 90% o al menos del 95%. Los valores de p son preferiblemente, 0,05, 0,025, 0,001 o menores.

La expresión "riesgo de desarrollar una enfermedad neurodegenerativa", tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a la predisposición, la susceptibilidad o la propensión de un sujeto de desarrollar una enfermedad neurodegenerativa. El riesgo de desarrollar una enfermedad neurodegenerativa generalmente implica que existe un alto o bajo riesgo o un mayor o menor riesgo. Así, un sujeto con riesgo alto de desarrollar una enfermedad neurodegenerativa, particularmente la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson, tiene una probabilidad de desarrollar dicha enfermedad de al menos un 50%, o al menos un 60%, o al menos un 70%, o al menos un 80%, o al menos un 90, o al menos un 95%, o al menos un 97%, o al menos un 98%, o al menos un 99%, o al menos un 100%. Del mismo modo, un sujeto con bajo riesgo de desarrollar una enfermedad neurodegenerativa, particularmente la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson, es un sujeto que tiene al menos una probabilidad de desarrollar dicha enfermedad de al menos un 0%, o al menos un 1%, o al menos un 2%, o al menos un 3%, o al menos un 5%, o al menos un 10%, o al menos un 20%, o al menos un 30%, o al menos un 40%, o al menos un 49%.

En general, la expresión "predecir el riesgo", "predicción del riesgo", o similares, se refiere al riesgo de que un paciente desarrolle una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson, ya sea alto o bajo. Como se entenderá por los expertos en la materia, la predicción (o el riesgo), aunque sea preferible, no tiene que ser correcta para el 100% de los sujetos a ser evaluados, aunque es preferible que lo sea. El término, sin embargo, requiere que una parte estadísticamente significativa de los sujetos pueda ser identificada con una mayor probabilidad de tener un determinado

resultado. La persona experta en la materia puede determinar sin mayor problema si una parte es estadísticamente significativa utilizando varias herramientas estadísticas bien conocidas de evaluación, por ejemplo, la determinación de intervalos de confianza, determinación de valor de p, validación cruzada con índices de clasificación, etc (más
5 detalles en “Estadística para la investigación” Dowdy y Wearden, John Wiley & Sons, New York, 1983). Los intervalos de confianza preferidos son al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% o al menos 95%. Los valores de p son, preferiblemente, 0,1, 0,05, 0,02, 0,01 o inferiores.

10 El término “enfermedad neurodegenerativa” tal y como se usa en la presente invención, incluye los procesos crónicos y progresivos que están caracterizados por pérdidas selectivas y simétricas de neuronas en los sistemas motor sensorial y cognitivo.

El término “enfermedad de Alzheimer” o “demencia senil” o EA se refiere a un deterioro
15 mental asociado con una enfermedad cerebral degenerativa específica que se caracteriza por la aparición de placas seniles, marañas neuríticas y pérdida neuronal progresiva que se manifiesta clínicamente en deficiencias progresivas de memoria, confusión, problemas de comportamiento, incapacidad de cuidarse por sí mismo, deterioro físico gradual y, por último, la muerte. En formas preferidas de realización, la enfermedad de Alzheimer es
20 enfermedad en cualquiera de los estadios de acuerdo a la escala Braak:

- Estadios I-II: el área cerebral afectada por la presencia de ovillos neurofibrilares se corresponde a la región transentorrinal del cerebro
- Estadios III-IV: el área cerebral afectada se extiende también a zonas de la región límbica como el hipocampo
- 25 - Estadios V-VI: el área cerebral afectada implica también la región neocortical

Esta clasificación por estadios neuropatológicos se correlaciona con la evolución clínica de la enfermedad existiendo un paralelismo entre la disminución de la memoria con los cambios neurofibrilares y la formación de placas neuríticas en la corteza entorrinal y el hipocampo
30 (estadios I a IV). Asimismo, la presencia isocortical de estos cambios (estadios V y VI) se correlaciona con alteraciones clínicamente severas. El estado transentorrinal (I-II) corresponde a periodos clínicamente silenciosos de la enfermedad. El estado límbico (III-IV) corresponde a una EA clínicamente incipiente. El estado necortical corresponde a una EA completamente desarrollada.

El término “enfermedad de Parkinson” o “parkinsonismo idiopático” o “parálisis agitante” o EP tal y como se usa en el presente documento, se refiere a una enfermedad crónica y degenerativa que lleva consigo problemas de control del movimiento, tremor, rigidez, bradiquinesia en todo tipo de movimientos como el andar, estar sentado, comer hablar, etc., así como inestabilidad postural. Los síntomas de la enfermedad están claramente asociados a la degeneración selectiva de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra. El déficit dopaminérgico induce una consiguiente pérdida de neuronas estriatales ocasionando una variedad de cambios citológicos que incluyen la agregación de α -sinucleína en los denominados cuerpos de Lewy. La “sustancia negra” es un núcleo de los ganglios basales cerebrales localizada en las porciones superiores del cerebro medio, bajo el tálamo y toma su color de la neuromelanina. En formas preferidas de realización, la EP se encuentra en alguno de los estadios de acuerdo a la escala Braak:

- Estadio I: el área afectada es el núcleo dorsal motor y/o la zona intermedia reticular.
- Estadio II: el área afectada se extiende al locus coeruleus y al núcleo del rafe
- Estadio III: el área afectada se extiende al mesencéfalo, en particular a la sustancia negra pars compacta.
- Estadio IV: el área afectada se extiende a la región transentorrinal del mesocórtex temporal y al allocórtex.
- Estadio V: el área afectada se extiende a la corteza insular, a la circunvolución cingulada y a la circunvolución temporal.
- Estadio VI: el área afectada se extiende al área frontal y parietal de la corteza cerebral.

El término “sujeto” tal como aquí se utiliza, se refiere a una persona, tal como un ser humano, un primate no humano (p. ej., chimpancé y otros simios y especies de monos), animales de granja, tales como aves, peces, ganado vacuno, ovejas, cerdos, cabras y caballos; mamíferos domésticos, tales como perros y gatos; animales de laboratorio incluyendo roedores, tales como ratones, ratas y cobayas. El término no denota una determinada edad o sexo. En una realización particular de la invención, el sujeto es un mamífero. En una realización preferida de la invención, el sujeto es un humano.

La expresión “muestra que comprende ADN mitocondrial” tal y como se usa aquí, se refiere a cualquier muestra que se puede obtener de un sujeto en la que exista material genético procedente de la mitocondria adecuado para detectar el patrón de metilación.

El término “ADN mitocondrial” o “ADNmt” tal y como se usa aquí, se refiere al material genético localizado en las mitocondrias de los organismos vivos. Es una molécula

bicatenaria, circular, cerrada sin extremos. En los seres humanos tiene un tamaño de 16569 pares de bases, conteniendo un pequeño número de genes, distribuidos entre la cadena H y la cadena L. El ADN mitocondrial codifica 37 genes: dos ARN ribosómicos, 22 ARN de transferencia y 13 proteínas que participan en la fosforilación oxidativa.

5

En una realización particular de la invención, la muestra que comprende ADN mitocondrial se selecciona de una biopsia de un tejido sólido o de un biofluido. Las muestras pueden ser obtenidas por métodos convencionales conocidos por el experto en la materia.

10 En una realización todavía más particular, el biofluido se selecciona de sangre periférica o líquido cefalorraquídeo.

En una realización todavía más particular, dicho tejido sólido es tejido cerebral. En una realización preferida de la invención, si se desea diagnosticar a un sujeto o si se desea
15 determinar el riesgo de desarrollar la EP, dicha muestra de tejido cerebral es una muestra obtenida de la sustancia negra.

Si el material en donde se desea determinar el patrón de metilación según el presente método, es decir ADNmt, se encuentra en un tejido sólido o un biofluido preferiblemente, se
20 procede a una extracción previa del ácido nucleico de la muestra empleando cualquier técnica apropiada para ello. En una realización preferida de la invención, la fracción de ADN adecuada para la puesta en práctica de la invención es el ADN total. La extracción del ADN puede ser llevado a cabo usando cualquier método conocido por los expertos en la materia (Sambrock *et al.*, 2001. "Molecular cloning: a Laboratory Manual", 3rd ed., Cold Spring
25 Harbor Laboratory Press, N.Y., Vol. 1-3) que incluyen sin limitación, centrifugaciones en gradientes de densidad, extracción en dos fases usando fenol acuoso o cloroformo con etanol, cromatografía en columna, métodos basados en la capacidad del ADN para unirse en superficies de cristal y/o silicatos, como preparaciones de tierra diatomeas o lechos de cristal, empleando kits comerciales, por ejemplo, los kits "Q-Biogene fast DNA® kit" o el
30 "QIAamp®(R) DNA Blood Mini Kit" (Qiagen, Hilden, Alemania) el "G-Spin IIp" (Intron Biotechnology, Corea) o el "Fast Prep System Bio 101" (Qbiogene®, Madrid, España) o los métodos descritos en US5.057.426, US4.923.978 y la solicitud de patente europea EP0512767A1.

Si se desea, el presente método puede llevarse a cabo en muestras en donde previamente
35 se ha aislado la fracción mitocondrial y posteriormente se ha aislado el ADN de las mismas.

El aislamiento de la fracción mitocondrial puede ser llevado a cabo usando cualquier método conocido de fraccionamiento celular. Dichos métodos comprenden la ruptura celular previa mediante técnicas que incluyen disrupción física de las membranas, aplicación de ultrasonidos, aplicación de presión o técnicas enzimáticas, seguida de una centrifugación diferencial mediante la aplicación de gradientes de densidad (como gradientes de Ficoll o Percoll). También pueden emplearse kits comerciales, por ejemplo, Qproteome "Mitochondrial isolation kit" (Qiagen, Hilden, Alemania) o "Mitochondrial isolation kit for culturd cells" (Thermo Scientific; Estados Unidos). Estos kits se basan en el mismo principio básico, es decir la lisis celular y la centrifugación diferencial para aislar o enriquecer la fracción mitocondrial.

El primer método de la invención comprende determinar en una muestra de un sujeto el patrón de metilación en una muestra que comprende ADN mitocondrial. El término "metilación del ADN", como se usa aquí, se refiere a un proceso bioquímico que implica la adición de un grupo metilo ($-CH_3$) a los nucleótidos de ADN citosina (C) o adenina (A). La metilación del ADN en la posición 5 de la citosina tiene el efecto específico de represión de la expresión de genes y se ha encontrado en todos los vertebrados examinados.

El término "patrón de metilación", como se usa aquí, se refiere pero no se limita, a la presencia o ausencia de metilación de uno o más nucleótidos. De esta manera, dichos uno o más nucleótidos están comprendidos en una única molécula de ácido nucleico. Dichos uno o más nucleótidos tienen la capacidad de estar metilados o no. El término "estado de metilación" también se puede utilizar, cuando sólo se considera un único nucleótido. Un patrón de metilación se puede cuantificar, en el cual se considera más de una molécula de ácido nucleico.

El término "D-loop" o "región control" tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a una región de ADN mitocondrial no codificante que contiene aproximadamente, 1100 pares de bases, visible bajo microscopía electrónica, que se genera durante la replicación de la cadena H por la síntesis de un corto segmento de la hebra pesada, ADN 7S.

El término "ND1" o "NAHD deshidrogenasa 1" o "ND1mt", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere al gen localizado en el genoma mitocondrial que codifica la proteína NADH deshidrogenasa 1 o ND1. La secuencia del gen ND1 humano se encuentra depositada en la base de datos GenBank (versión del 2 de enero de 2014) bajo el número de acceso NC_012920. (SEQ ID NO: 1). La proteína ND1 forma parte del complejo

enzimático denominado complejo I que es activo en las mitocondrias e interviene en el proceso de fosforilación oxidativa.

El término "sitio CpG", como se usa aquí, se refiere a las regiones de ADN, particularmente regiones de ADN mitocondrial, donde un nucleótido citosina se encuentra al lado de un nucleótido guanina en la secuencia lineal de bases a lo largo de su longitud. "CpG" es la abreviatura de "C-fosfato-G", es decir, citosina y guanina separadas por sólo un fosfato; el fosfato enlaza dos nucleósidos cualesquiera juntos en el ADN. El término "CpG" se utiliza para distinguir esta secuencia lineal del apareamiento de bases CG de citosina y guanina. Citosinas en los dinucleótidos CpG pueden estar metiladas para formar 5-metilcitosina.

El término "sitio CHG", como se usa aquí, se refiere a las regiones de ADN, particularmente regiones de ADN mitocondrial, en donde un nucleótido citosina y un nucleótido guanina están separados por un nucleótido variable (H) que puede ser adenina, citosina o timina. La citosina del sitio CHG puede estar metilada para formar 5-metilcitosina.

El término "sitio CHH", como se usa aquí, se refiere a las regiones de ADN, particularmente regiones de ADN mitocondrial, en donde un nucleótido citosina es seguido de un primer y un segundo nucleótido variable (H) que puede ser adenina, citosina o timina. La citosina del sitio CHH puede estar metilada para formar 5-metilcitosina.

En una realización particular, el primer método de la invención comprende determinar en una muestra de un sujeto que comprende ADN mitocondrial, el patrón de metilación en al menos un sitio seleccionado de los sitios CpG de la región D-loop, seleccionado de los sitios mostrados en la Tabla 1.

Sitio CpG	Posición (bp)
CpG 2	16427
CpG 3	16449
CpG 4	16454
CpG 5	16495
CpG 6	16542
CpG 7	16565
CpG 8	33
CpG 9	61
CpG 10	78
CpG 11	80
CpG 12	91
CpG 13	96
CpG 14	105
CpG 15	120
CpG 16	162
CpG 17	170
CpG 18	186

Tabla 1: Lista de los sitios CpG entre las posiciones 16386 y 256 de la región D-loop.

El término "determinación del patrón de metilación en un sitio CpG", como se usa aquí, se refiere a la determinación del estado de metilación de un sitio CpG particular. La determinación del patrón de metilación en un sitio CpG se puede realizar por múltiples procesos conocidos por la persona experta en la materia.

En una realización particular, el primer método de la invención comprende determinar el patrón de metilación en al menos un sitio CpG de la región D-loop seleccionado de los sitios mostrados en la Tabla 1. En otra realización particular, el primer método de la invención comprende determinar el patrón de metilación en al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15 o al menos 16 sitios CpG seleccionados de la Tabla 1.

En una realización todavía más particular y preferida de la invención, el primer método de la invención comprende determinar el patrón de metilación en todos los sitios CpG de la región D-loop mostrados en la Tabla 1.

En otra realización particular, el primer método de la invención comprende determinar en una muestra de un sujeto que comprende ADN mitocondrial, el patrón de metilación en al menos un sitio seleccionado de los sitios CpG del gen ND1 seleccionado de los sitios mostrados en la Tabla 2.

Sitio CpG	Posición (bp)
CpG 1	3351
CpG 2	3375
CpG 3	3379
CpG 4	3406
CpG 7	3453
CpG 12	3549
CpG 13	3642

Tabla 2: Lista de los sitios CpG en el gen ND1 entre las posiciones 3313 y 3686.

En otra realización particular, el primer método de la invención comprende determinar el patrón de metilación en un sitio CpG del gen ND1 seleccionado de los sitios mostrados en la Tabla 2. En otra realización particular, el primer método de la invención comprende determinar el patrón de metilación en al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5 o al menos 6 sitios CpG seleccionados de la Tabla 2.

En una realización todavía más particular y preferida de la invención, el primer método de la invención comprende determinar el patrón de metilación en todos los sitios CpG del gen ND1 mostrados en la Tabla 2.

En otra realización particular, el primer método de la invención comprende determinar en una muestra de un sujeto que comprende ADN mitocondrial, el patrón de metilación en al menos un sitio seleccionado de los sitios CHG de la región D-loop mostrados en la Tabla 3.

Sitio CHG	Posición (bp)
CHG 2	16426
CHG 3	16453
CHG 4	16459
CHG 5	16466
CHG 6	16479
CHG 7	16514
CHG 8	6
CHG 9	33
CHG 10	64
CHG 11	104
CHG 12	122
CHG 13	128
CHG 14	141
CHG 16	253

Tabla 3: Lista de los sitios CHG entre las posiciones 16386 y 256 de la región D-loop.

El término "determinación del patrón de metilación en un sitio CHG", como se usa aquí, se refiere a la determinación del estado de metilación de un sitio CHG particular. La determinación del patrón de metilación en un sitio CHG se puede realizar por múltiples procesos conocidos por la persona experta en la materia.

En una realización particular, el primer método de la invención comprende determinar el patrón de metilación en al menos un sitio CHG de la región D-loop seleccionado de los sitios mostrados en la Tabla 3. En otra realización particular, el primer método de la invención comprende determinar el patrón de metilación en al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13 o al menos 14 o al menos 15 sitios CHG seleccionados de la Tabla 3.

En una realización todavía más particular y preferida de la invención, el primer método de la invención comprende determinar el patrón de metilación en todos los sitios CHG de la región D-loop mostrados en la Tabla 3.

En otra realización particular, el primer método de la invención comprende determinar en una muestra de un sujeto que comprende ADN mitocondrial, el patrón de metilación en al menos un sitio seleccionado de los sitios CHG del gen ND1 seleccionado de los sitios mostrados en la Tabla 4.

5

Sitio CHG	Posición (bp)
CHG 1	3374
CHG 2	3435
CHG 4	3524
CHG 5	3529
CHG 6	3589
CHG 7	3641
CHG 8	3657

Tabla 4: Lista de los sitios CHG en el gen ND1 entre las posiciones 3313 y 3686.

En otra realización particular, el primer método de la invención comprende determinar el patrón de metilación en al menos un sitio CHG del gen ND1 seleccionado de los sitios mostrados en la Tabla 4. En otra realización particular, el primer método de la invención comprende determinar el patrón de metilación en al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5 o al menos 6 sitios CHG seleccionados de la Tabla 4.

En una realización todavía más particular y preferida de la invención, el primer método de la invención comprende determinar el patrón de metilación en todos los sitios CHG del gen ND1 mostrados en la Tabla 4.

En otra realización particular, el primer método de la invención comprende determinar en una muestra de un sujeto que comprende ADN mitocondrial, el patrón de metilación en al menos un sitio seleccionado de los sitios CHH de la región D-loop, seleccionado de los sitios CHH mostrados en la Tabla 5.

Sitio CHH	Posición (bp)
CHH 5	16419
CHH 6	16425
CHH 7	16429
CHH 8	16439
CHH 9	16442
CHH 10	16446
CHH 11	16451
CHH 12	16458
CHH 13	16465
CHH 14	16478
CHH 15	16498
CHH 16	16507
CHH 17	16511
CHH 18	16520
CHH 19	16527
CHH 20	16536
CHH 21	16540
CHH 22	16546
CHH 23	16549
CHH 24	16560
CHH 25	16563
CHH 26	4
CHH 27	11
CHH 28	15
CHH 29	18
CHH 30	26
CHH 31	29
CHH 32	39
CHH 33	43
CHH 34	48
CHH 35	76
CHH 36	86
CHH 37	110
CHH 38	113
CHH 39	132
CHH 40	140
CHH 41	144
CHH 42	147
CHH 43	150

CHH 44	164
CHH 45	167
CHH 46	190
CHH 47	194
CHH 49	198

Tabla 5: Lista de los sitios CHH entre las posiciones 16386 y 256 de la región D-loop.

El término "determinación del patrón de metilación en un sitio CHH", como se usa aquí, se refiere a la determinación del estado de metilación de un sitio CHH particular. La determinación del patrón de metilación en un sitio CHH se puede realizar por múltiples procesos conocidos por la persona experta en la materia.

En otra realización particular, el primer método de la invención comprende determinar el patrón de metilación en al menos un sitio CHH de la región D-loop seleccionado de los mostrados en la Tabla 5. En otra realización particular, el primer método de la invención comprende determinar el patrón de metilación en al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos al menos 22, al menos 23, al menos 24, al menos 25, al menos 26, al menos 27, al menos 28, al menos 29, al menos 30, al menos 31, al menos 32, al menos 33, al menos 34, al menos 35, al menos 36, al menos 37, al menos 38, al menos 39, al menos 40, al menos 41, al menos 42, o al menos 43 sitios CHH seleccionados de la Tabla 5.

En una realización todavía más particular y preferida de la invención, el primer método de la invención comprende determinar el patrón de metilación en todos los sitios CHH de la región D-loop mostrados en la Tabla 5.

En formas preferidas de realización, el primer método de la invención comprende:

- (i) determinar el patrón de metilación en todos los sitios CpG de la región D-loop mostrados en la Tabla 1 y en todos los sitios CpG del gen ND1 mostrados en la Tabla 2
- (ii) determinar el patrón de metilación en todos los sitios CpG de la región D-loop mostrados en la Tabla 1 y en todos los sitios CHG de la región D-loop mostrados en la Tabla 3

- (iii) determinar el patrón de metilación en todos los sitios CpG de la región D-loop mostrados en la Tabla 1 y en todos los sitios CHG del gen ND1 mostrados en la Tabla 4
 - (iv) determinar el patrón de metilación en todos los sitios CpG de la región D-loop mostrados en la Tabla 1 y en todos los sitios CHH de la región D-loop mostrados en la Tabla 5
 - (v) determinar el patrón de metilación en todos los sitios CpG del gen ND1 mostrados en la Tabla 2 y en todos los sitios CHG de la región D-loop mostrados en la Tabla 3
 - (vi) determinar el patrón de metilación en todos los sitios CpG del gen ND1 mostrados en la Tabla 2 y en todos los sitios CHG del gen ND1 mostrados en la Tabla 4
 - (vii) determinar el patrón de metilación en todos los sitios CpG del gen ND1 mostrados en la Tabla 2 y en todos los sitios CHH de la región D-loop mostrados en la Tabla 5.
 - (viii) determinar el patrón de metilación en todos los sitios CHG de la región D-loop mostrados en la Tabla 3 y en todos los sitios CHG del gen ND1 mostrados en la Tabla 4
 - (ix) determinar el patrón de metilación en todos los sitios CHG de la región D-loop mostrados en la Tabla 3 y/o
 - (x) determinar el patrón de metilación en todos los sitios CHG del gen ND1 mostrados en la Tabla 4 y en todos los sitios CHH de la región D-loop mostrados en la Tabla 5
- En algunas realizaciones, la determinación del patrón de metilación en al menos un sitio CpG, al menos un sitio CHG y/o al menos un sitio CHH de acuerdo al primer método de la invención se lleva a cabo en una muestra de sangre entera, en cuyo caso la determinación se puede realizar directamente. En otras realizaciones, la muestra que comprende ADN mitocondrial, preferiblemente una muestra de ADN total, se extrae de células que están presentes en un fluido biológico (p. ej., sangre entera, líquido cefalorraquídeo) como etapa inicial y en tales casos, el ácido nucleico total extraído a partir de dichas muestras representa el material de trabajo adecuado para el análisis posterior. El aislamiento del ADN total o del ADN mitocondrial puede realizarse por métodos convencionales conocidos por la persona experta en la materia (citado at supra). Después de aislar y amplificar (si es necesario) el ácido nucleico que comprende ADN mitocondrial, el patrón de metilación de uno o más sitio(s) CpG, uno o más sitio(s) CHG y/o uno o más sitio(s) CHH es determinado.

Los expertos en la materia reconocerán fácilmente que el análisis del patrón de metilación presente en uno o varios de los sitios CpG, CHG y/o CHH descritos aquí presentes en el ADN mitocondrial de un sujeto, se puede realizar mediante cualquier método o técnica capaz de medir el patrón de metilación presente en dichos sitios.

5

En una realización particular, el primer método de la invención comprende determinar el patrón de metilación en dichos sitios CpG, CHG y/o CHH mediante una técnica seleccionada del grupo que consiste en PCR específica de metilación (MSP), un método basado en enriquecimiento (p. ej. MeDIP, MBD-seq y MethylCap), secuenciación por bisulfito y por un método basado en bisulfito (p. ej. RRBS, Infinium, GoldenGate, Cobra, MSP, MethyLight) y un método por digestión de restricción (p. ej., MRE-seq, o ensayo HELP), pirosecuenciación, ensayo de ChIP-on-chip, o conversión diferencial, restricción diferencial, peso diferencial de los sitio(s) CpG, CHG y/o CHH metilados del ADN.

10

15 En una realización particular y preferida de la invención, el patrón de metilación de uno o más sitios CpG, CHG y/o CHH en la región D-loop y/o uno o más sitios CpG y/o CHG en el gen ND1 se determina mediante pirosecuenciación. Brevemente, dicha técnica está basada en el principio de la secuenciación por síntesis y en la detección del pirofosfato liberado (PPi) durante la síntesis del ADN. Dicha técnica emplea una serie de cuatro enzimas para
20 detectar secuencias de ácidos nucleicos durante el proceso de síntesis; ADN polimerasa, ATP sulfurilasa, luciferasa y apirasa y emplea como sustratos adenosina 5' fosofosulfato (APS) y luciferina.

20

Para determinar el patrón de metilación en el ADN mitocondrial, es necesario tratar
25 químicamente dicha muestra de tal manera que todas las bases de citosina no metiladas se modifican a bases de uracilo, u otra base que es diferente a la citosina en términos de comportamiento de emparejamiento de bases, mientras las bases de 5-metilcitosina permanecen sin cambios. El término "modificar", como se usa aquí, significa la conversión de una citosina no metilada a otro nucleótido que distinguirá la citosina no metilada de la
30 citosina metilada. La conversión de las bases de citosina no metiladas, pero no las metiladas, en la muestra que comprende ADN mitocondrial se lleva a cabo con un agente de conversión. El término "agente de conversión" o "reactivo de conversión", como se usa aquí, se refiere a un reactivo capaz de convertir una citosina no metilada en uracilo o en otra base que es detectable diferencialmente a la citosina en términos de propiedades de hibridación.

30

35 El agente de conversión es preferiblemente un bisulfito tal como bisulfito o sulfito de hidrógeno. Sin embargo, otros agentes que modifican de manera similar la citosina no

metilada, pero no la citosina metilada también pueden ser utilizados en el método de la invención, tal como hidrógeno sulfito. La reacción se realiza de acuerdo con procedimientos estándar (Frommer et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89:1827-31; Olek, 1996, Nucleic Acids Res. 24:5064-6; EP 1394172). También es posible llevar a cabo la conversión enzimáticamente, p. ej. mediante el uso de citidina deaminasas de metilación específicas.

En una realización preferida del primer método de la invención, la muestra que comprende ADN mitocondrial ha sido tratada con un reactivo capaz de convertir una citosina no metilada en uracilo o en otra base que es detectablemente diferente a la citosina en términos de propiedades de hibridación. En una realización más preferida, la muestra que comprende ADN mitocondrial se trata con bisulfito usando un kit comercial apropiado para ello, por ejemplo "EZ Methylation Kit" (Zymo Research, Ecogen; Barcelona, España).

Una vez que la muestra que comprende ADN mitocondrial ha sido tratada con un bisulfito, la región D-loop y/o el gen ND1 que contiene uno o más sitio(s) CpG, CHG y/o CHH mostrados en las Tablas 1 a 5 se puede amplificar usando cebadores que permiten distinguir la secuencia no metilada (en el que la citosina del sitio CpG se convierte en uracilo) de la secuencia metilada (en la que la citosina del sitio CpG sigue siendo citosina). Muchos métodos de amplificación se basan en una reacción en cadena enzimática tal como, por ejemplo, una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), reacción en cadena de la ligasa (LCR), reacción en cadena de la ligasa polimerasa, Gap-LCR, reacción en cadena de reparación, 3SR y NASBA. Además, hay amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), amplificación mediada por transcripción (TMA), y Q β -amplificación, etc, siendo esta lista meramente ilustrativa. Métodos de amplificación de ácidos nucleicos se describen en Sambrook et al., 2001 (citado at supra). Otros métodos de amplificación incluyen el método de PCR específica de metilación (MSP), descrito en el documento US 5.786.146 que combina el tratamiento con bisulfito y PCR específica de alelo- (ver p. ej., los documentos US 5.137.806, US 5.595.890, US 5.639.611). El uracilo es reconocido como una timina por la Taq polimerasa y por consiguiente, tras la PCR, el producto resultante contiene citosina sólo en la posición donde existe 5-metilcitosina en el ADN molde de partida.

En una realización preferida de la invención, una vez que la muestra que comprende ADN mitocondrial, preferiblemente una muestra de ADN total, ha sido tratada con un bisulfito, la región que contiene uno o más sitio(s) CpG, CHG y/o CHH se puede amplificar usando cebadores que no son específicos de la secuencia metilada. Por ejemplo, la secuencia

preferida de los cebadores no corresponde a una secuencia nucleotídica que comprende un dinucleótido CpG.

Los productos de amplificación se detectan de acuerdo con procedimientos estándar en el estado de la técnica. El ácido nucleico amplificado se puede determinar mediante métodos analíticos estándar conocidos por la persona experta en la materia y se describen p. ej., en Sambrook et al., 2001 (citado et supra). Puede haber también etapas de purificación adicionales antes de que el ácido nucleico diana se detecte, por ejemplo una etapa de precipitación. Los métodos de detección pueden incluir pero no se limitan a la unión o intercalado de colorantes específicos como el bromuro de etidio que se intercala en el ADN de doble cadena y cambia su fluorescencia después de eso. Los ácidos nucleicos purificados pueden también separarse mediante métodos electroforéticos opcionalmente después de una digestión de restricción y ser visualizados después. Hay también ensayos basados en sonda que aprovechan la hibridación de oligonucleótidos a secuencias específicas y la posterior detección del híbrido. También es posible secuenciar el ácido nucleico diana después de más pasos conocidos por el experto en la materia. Otros métodos utilizan diversas secuencias de ácido nucleico a un chip de silicio al que están unidas sondas específicas y producen una señal cuando se unen a secuencias complementarias.

En una realización preferida de la invención, tras la amplificación de la región de interés en donde se desea determinar el patrón de metilación (por ejemplo, en la región D-loop o en el gen ND1) se emplea la pirosecuenciación para determinar en dicha secuencia los sitios CpG, CHG y/o CHH modificados tras el tratamiento con bisulfito. La razón de citosinas/timinas en cada uno de los sitios puede ser determinada cuantitativamente en base a la cantidad de citosinas y timinas incorporadas durante la etapa de extensión de la secuencia.

Alternativamente, el patrón de metilación del en al menos un sitio CpG, CHG y/o CHH de la región D-loop o en al menos un sitio CpG y/o CHG del gen ND1 se puede confirmar mediante digestión con enzimas de restricción y análisis de transferencia Southern. Ejemplos de endonucleasas de restricción sensibles a la metilación que pueden ser utilizadas incluyen *SmaI*, *SacII*, *EagI*, *MspI*, *HpaII*, *BstUI* y *BssHII*, por ejemplo.

El término “hipermetilación” tal y como se usa en el presente documento, se refiere a un patrón de metilación alterado en donde uno o más nucleótidos, preferiblemente citosinas de

los sitios CpG, CHG y/o CHH, están metilados comparados con una muestra de referencia. Dicha muestra de referencia preferiblemente es una muestra que comprende ADN mitocondrial obtenida de un sujeto que no padece una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de EA o EP. En particular, dicho término se refiere a un número elevado de 5-metilcitosinas en uno o más sitios CpG de la región D-loop mostrados en la Tabla 1, en uno o más sitios CpG del gen ND1 mostrados en la Tabla 2, en uno o más sitios CHG de la región D-loop mostrados en la Tabla 3, en uno o más sitios CHG del gen ND1 mostrados en la Tabla 4 y/o en uno o más sitios CHH de la región D-loop mostrados en la Tabla 5, en una secuencia de ADN mitocondrial cuando se compara con la cantidad relativa de 5-metilcitosinas presentes en dichos uno o más sitios en una muestra de referencia.

El término “hipometilación” tal y como se usa en el presente documento, se refiere a un patrón de metilación alterado en donde uno o más nucleótidos, preferiblemente citosinas de los sitios CpG, CHG y/o CHH, no están metilados comparados con una muestra de referencia. El término “muestra de referencia” se refiere a una muestra que comprende ADN mitocondrial obtenida de un sujeto que no padece una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de EA o EP. En particular, dicho término se refiere a un número reducido de 5-metilcitosinas en uno o más sitios CpG de la región D-loop mostrados en la Tabla 1, en uno o más sitios CpG del gen ND1 mostrados en la Tabla 2, en uno o más sitios CHG de la región D-loop mostrados en la Tabla 3, en uno o más sitios CHG del gen ND1 mostrados en la Tabla 4 y/o en uno o más sitios CHH de la región D-loop mostrados en la Tabla 5 en una secuencia de ADN mitocondrial cuando se compara con la cantidad relativa de 5-metilcitosinas presentes en dichos uno o más sitios CpG, uno o más sitios CHG y/o uno o más sitios CHH en una muestra de referencia.

En una realización preferida de la invención, dicha muestra de referencia que comprende ADN mitocondrial se selecciona de muestras de tejido, o biofluidos, preferiblemente muestras de sangre o de líquido cefalorraquídeo de sujetos. En una realización preferida, dicha muestra de referencia es ADN total. Métodos para obtener dichas muestras así como métodos para aislar el ADN total o el ADN mitocondrial de una muestra han sido detallados anteriormente. En una realización todavía más preferida, la muestra de referencia es una muestra que comprende ADN mitocondrial de sujetos emparejados por edad.

En este primer método, la invención proporciona algunos sitio(s) específicos CpG, CHG y CHH que están relacionados con el diagnóstico o con el riesgo de desarrollar una

enfermedad neurodegenerativa seleccionada de la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson. Por lo tanto:

- una hipermetilación en al menos uno de los sitios CpG de la región D-loop mostrados en la Tabla 1,
- 5 - una hipermetilación en al menos uno de los sitios CHG de la región D-loop mostrados en la Tabla 3,
- una hipermetilación en al menos uno de los sitios CHH de la región D-loop mostrados en la Tabla 5,
- una hipometilación en al menos uno de los sitios CpG en el gen ND1 mostrados en la
- 10 Tabla 2, y/o
- una hipometilación en al menos uno de los sitios CHG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 4,

es indicativo de que el sujeto sufre de Alzheimer o de que el sujeto tiene un riesgo elevado de desarrollar la enfermedad de Alzheimer; o

- 15 - una hipometilación en al menos, uno de los sitios CpG de la región D-loop mostrados en la Tabla 1,
- una hipometilación en al menos, uno de los sitios CHG de la región D-loop mostrados en la Tabla 3, y/o
- una hipometilación en al menos uno de los sitios CHH de la región D-loop mostrados en
- 20 la Tabla 5

es indicativo de que el sujeto sufre de Parkinson o de que el sujeto tiene un riesgo elevado de desarrollar la enfermedad de Parkinson.

En una realización particular, el primer método de la invención comprende determinar el

25 patrón de metilación de todos los sitios CpG, de todos los sitios CHG y de todos los sitios CHH de la región D-loop mostrados en las Tablas 1, 3 y 5, y el patrón de metilación de todos los sitios CpG y de todos los sitios CHG del gen ND1 mostrados en las Tablas 2 y 4.

Los autores de la presente invención, han descubierto que el grado de metilación de los

30 sitios CpG, CHG y CHH en la región D-loop es mayor en sujetos que padecen Alzheimer en estadios I-II que en sujetos que padecen dicha enfermedad en estadios tempranos de la enfermedad (estadios III-IV).

En una realización particular, si el patrón de metilación se observa con respecto al patrón

35 de referencia en una muestra que comprende ADN mitocondrial de un sujeto diagnosticado con la enfermedad de Alzheimer en estadio I-II, entonces una hipometilación en al menos

uno de los sitios CpG de la región D-loop mostrados en la Tabla 1 o una hipometilación en uno de dichos sitios CHG de la región D-loop mostrados en la Tabla 3, es indicativo de que el sujeto sufre de la enfermedad de Alzheimer en estadio III-IV.

5 Segundo método de la invención

En un segundo aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para seleccionar un sujeto para someterlo a un tratamiento preventivo de una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson en un sujeto (de aquí en adelante, segundo método de la invención) que comprende determinar en una muestra de dicho sujeto que comprende ADN mitocondrial el patrón de metilación en la región D-loop y/o en el gen ND1, en donde el patrón de metilación se determina en al menos un sitio seleccionado del grupo formado por:

- (i) los sitios CpG de la región D-loop mostrados en la Tabla 1,
- (ii) los sitios CpG del gen ND1 mostrados en la Tabla 2;
- (iii) los sitios CHG de la región D-loop mostrados en la Tabla 3,
- (iv) los sitios CHG del gen ND1 mostrados en la Tabla 4, y/o
- (v) los sitios CHH de la región D-loop mostrados en la Tabla 5

en donde una hipermetilación en al menos uno de dichos sitios CpG de la región D-loop, una hipermetilación en al menos uno de dichos sitios CHG de la región D-loop, una hipermetilación en al menos uno de dichos sitios CHH de la región D-loop, una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CpG del gen ND1 y/o una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CHG en el gen ND1 es indicativo de que el sujeto es candidato a recibir un tratamiento dirigido a prevenir la enfermedad de Alzheimer o

en donde una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CpG de la región D-loop, una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CHG de la región D-loop y/o una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CHH de la región D-loop es indicativo de que el sujeto es candidato a recibir un tratamiento dirigido a prevenir la enfermedad de Parkinson.

El término “tratamiento preventivo”, tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a la prevención o conjunto de medidas profilácticas para evitar una enfermedad para prevenir o retrasar la aparición de la sintomatología de la misma así como para reducir o aliviar la sintomatología clínica de la misma. Particularmente, dicho término se refiere a la prevención o el conjunto de medidas para evitar la aparición, para retrasar o para aliviar la sintomatología clínica asociada con una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de la

enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson. Resultados clínicos deseados asociados con la administración de dicho tratamiento a un sujeto incluyen pero no se limitan a, la estabilización del estado patológico de la enfermedad, retraso en la progresión de la enfermedad o mejoría en el estado fisiológico del sujeto.

5

Tratamientos preventivos adecuados dirigidos a la prevención o al retraso de la aparición de los síntomas de la enfermedad de Alzheimer incluyen pero no se limitan, a inhibidores de colina-esterasa como por ejemplo, clorohidrato de donezepil (Arecept), rivastigmina (Exelon) y galantemina (Reminyl) o antagonistas del receptor N-metil D-aspartato (NMDA).

10 Tratamientos dirigidos a la prevención o al retraso de la aparición de los síntomas de la enfermedad de Parkinson incluyen pero no se limitan, a L-dopa, inhibidores de catecol-o-metil transferasa (COMT) como por ejemplo, tolcapone (Tasmar) y entacapone (Comtan), inhibidores de monoamina oxidasa B (MAOB) como por ejemplo, selegilina (Eldepryl) y rasagalina (Azilect) y agonistas de dopamina como por ejemplo, pramipexol, rotigotina y
15 ropinirola.

El término “seleccionar” tal y como se usa aquí, se refiere a la acción de escoger a un sujeto para someterlo a un tratamiento preventivo de una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson.

20

Los términos “sujeto”, “enfermedad neurodegenerativa”, “enfermedad de Alzheimer”, “enfermedad de Parkinson”, “muestra”, “ADN mitocondrial”, “región D-loop”, “gen ND1”, “sitio CpG”, “sitio CHG”, sitio CHH”, “patrón de metilación”, “hipermetilación” e “hipometilación” se han descrito en detalle en el contexto del primer método de la invención y se utilizan con el
25 mismo significado en el segundo método de la invención.

En una realización particular del segundo método de la invención, la muestra que comprende ADN mitocondrial se selecciona de una biopsia de un tejido sólido o de un biofluido. Las muestras pueden ser obtenidas por métodos convencionales conocidos por el
30 experto en la materia.

En una realización todavía más particular, el biofluido se selecciona de sangre periférica o líquido cefalorraquídeo.

35 En una realización todavía más particular, dicho tejido sólido es tejido cerebral. En una realización preferida de la invención, si se desea seleccionar un sujeto para someterlo a un

tratamiento preventivo de la enfermedad de Parkinson, dicha muestra de tejido cerebral es una muestra obtenida de la sustancia negra.

5 En una realización particular, el segundo método de la invención comprende determinar en una muestra de un sujeto que comprende ADN mitocondrial, el patrón de metilación en al menos un sitio seleccionado de los sitios CpG de la región D-loop, mostrados en la Tabla 1.

10 En una realización particular, el segundo método de la invención comprende determinar el patrón de metilación en al menos un sitio CpG de la región D-loop seleccionado de los sitios mostrados en la Tabla 1. En otra realización particular, el primer método de la invención comprende determinar el patrón de metilación en al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15 o al menos 16 sitios CpG seleccionados de la Tabla 1.

15 En una realización todavía más particular y preferida de la invención, el segundo método de la invención comprende determinar el patrón de metilación en todos los sitios CpG de la región D-loop mostrados en la Tabla 1.

20 En otra realización particular, el segundo método de la invención comprende determinar en una muestra de un sujeto que comprende ADN mitocondrial, el patrón de metilación en al menos un sitio seleccionado de los sitios CpG del gen ND1, mostrados en la Tabla 2.

25 En otra realización particular, el segundo método de la invención comprende determinar el patrón de metilación en un sitio CpG del gen ND1 seleccionado de los sitios mostrados en la Tabla 2. En otra realización particular, el segundo método de la invención comprende determinar el patrón de metilación en al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5 o al menos 6 sitios CpG seleccionados de la Tabla 2.

30 En una realización todavía más particular y preferida de la invención, el segundo método de la invención comprende determinar el patrón de metilación en todos los sitios CpG del gen ND1 mostrados en la Tabla 2.

35 En otra realización particular, el segundo método de la invención comprende determinar en una muestra de un sujeto que comprende ADN mitocondrial, el patrón de metilación en al menos un sitio seleccionado de los sitios CHG de la región D-loop, mostrados en la Tabla 3.

En una realización particular, el segundo método de la invención comprende determinar el patrón de metilación en al menos un sitio CHG de la región D-loop seleccionado de los sitios mostrados en la Tabla 3. En otra realización particular, el segundo método de la invención
5 comprende determinar el patrón de metilación en al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13 o al menos 14 o al menos 15 sitios CHG seleccionados de la Tabla 3.

10 En una realización todavía más particular y preferida de la invención, el segundo método de la invención comprende determinar el patrón de metilación en todos los sitios CHG de la región D-loop mostrados en la Tabla 3.

En otra realización particular, el segundo método de la invención comprende determinar en
15 una muestra de un sujeto que comprende ADN mitocondrial, el patrón de metilación en al menos un sitio seleccionado de los sitios CHG del gen ND1, mostrados en la Tabla 4.

En otra realización particular, el segundo método de la invención comprende determinar el patrón de metilación en al menos un sitio CHG del gen ND1 seleccionado de los sitios mostrados en la Tabla 4. En otra realización particular, el segundo método de la invención
20 comprende determinar el patrón de metilación en al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5 o al menos 6 sitios CpG seleccionados de la Tabla 4.

En una realización todavía más particular y preferida de la invención, el segundo método de
25 la invención comprende determinar el patrón de metilación en todos los sitios CHG del gen ND1 mostrados en la Tabla 4.

En otra realización particular, el segundo método de la invención comprende determinar en una muestra de un sujeto que comprende ADN mitocondrial, el patrón de metilación en al
30 menos un sitio seleccionado de los sitios CHH de la región D-loop, mostrados en la Tabla 5.

En otra realización particular, el segundo método de la invención comprende determinar el patrón de metilación en al menos un sitio CHH de la región D-loop seleccionado de los mostrados en la Tabla 5. En otra realización particular, el segundo método de la invención
35 comprende determinar el patrón de metilación en al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al

menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos al menos 22, al menos 23, al menos 24, al menos 25, al menos 26, al menos 27, al menos 28, al menos 29, al menos 30, al menos 31, al menos 32, al menos 33, al menos 34, al menos 35, al menos 36, al menos 37, al menos 38, al menos 39, al menos 40, al menos 41, al menos 42 o al menos 43 sitios CHH seleccionados de la Tabla 5.

En una realización todavía más particular y preferida de la invención, el segundo método de la invención comprende determinar el patrón de metilación en todos los sitios CHH de la región D-loop mostrados en la Tabla 5.

En formas preferidas de realización, el segundo método de la invención comprende:

- (i) determinar el patrón de metilación en todos los sitios CpG de la región D-loop mostrados en la Tabla 1 y en todos los sitios CpG del gen ND1 mostrados en la Tabla 2
- (ii) determinar el patrón de metilación en todos los sitios CpG de la región D-loop mostrados en la Tabla 1 y en todos los sitios CHG de la región D-loop mostrados en la Tabla 3
- (iii) determinar el patrón de metilación en todos los sitios CpG de la región D-loop mostrados en la Tabla 1 y en todos los sitios CHG del gen ND1 mostrados en la Tabla 4
- (iv) determinar el patrón de metilación en todos los sitios CpG de la región D-loop mostrados en la Tabla 1 y en todos los sitios CHH de la región D-loop mostrados en la Tabla 5
- (v) determinar el patrón de metilación en todos los sitios CpG del gen ND1 mostrados en la Tabla 2 1 y en todos los sitios CHG de la región D-loop mostrados en la Tabla 3
- (vi) determinar el patrón de metilación en todos los sitios CpG del gen ND1 mostrados en la Tabla 2 y en todos los sitios CHG del gen ND1 mostrados en la Tabla 4
- (vii) determinar el patrón de metilación en todos los sitios CpG del gen ND1 mostrados en la Tabla 2 y en todos los sitios CHH de la región D-loop mostrados en la Tabla 5.
- (viii) determinar el patrón de metilación en todos los sitios CHG de la región D-loop mostrados en la Tabla 3 y en todos los sitios CHG del gen ND1 mostrados en la Tabla 4

- (ix) determinar el patrón de metilación en todos los sitios CHG de la región D-loop mostrados en la Tabla 3 y/o
- (x) determinar el patrón de metilación en todos los sitios CHG del gen ND1 mostrados en la Tabla 4 y en todos los sitios CHH de la región D-loop mostrados en la Tabla 5

Métodos adecuados para determinar el patrón de metilación en una muestra de un sujeto que comprende ADN mitocondrial se han descrito en detalle en el contexto del primer método de la invención.

En una realización particular, el segundo método de la invención comprende determinar el patrón de metilación en dichos sitios CpG, CHG y/o CHH mediante una técnica seleccionada del grupo que consiste en PCR específica de metilación (MSP), un método basado en enriquecimiento (p. ej. MeDIP, MBD-seq y MethylCap), secuenciación por bisulfito y por un método basado en bisulfito (p. ej. RRBS, Infinium, GoldenGate, Cobra, MSP, MethyLight) y un método por digestión de restricción (p. ej., MRE-seq, o ensayo HELP), pirosecuenciación, ensayo de ChIP-on-chip, o conversión diferencial, restricción diferencial, peso diferencial de los sitio(s) CpG, CHG y/o CHH metilados del ADN.

En una realización particular y preferida de la invención, el patrón de metilación de uno o más sitios CpG, CHG y/o CHH en la región D-loop y/o uno o más sitios CpG y/o CHH en el gen ND1, de acuerdo al segundo método de la invención, se determina mediante pirosecuenciación.

De acuerdo al segundo método de la invención:

- una hipermetilación en al menos uno de los sitios CpG de la región D-loop mostrados en la Tabla 1,
- una hipermetilación en al menos uno de los sitios CHG de la región D-loop mostrados en la Tabla 3,
- una hipermetilación en al menos uno de los sitios CHH de la región D-loop mostrados en la Tabla 5,
- una hipometilación en al menos uno de los sitios CpG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 2, y/o
- una hipometilación en al menos uno de los sitios CHG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 4,

es indicativo de que el sujeto es candidato a recibir un tratamiento dirigido a prevenir la enfermedad de Alzheimer; o

- una hipometilación en al menos, uno de los sitios CpG de la región D-loop mostrados en la Tabla 1,
- 5 - una hipometilación en al menos, uno de los sitios CHG de la región D-loop mostrados en la Tabla 3, y/o
- una hipometilación en al menos uno de los sitios CHH de la región D-loop mostrados en la Tabla 5

es indicativo de que el sujeto es candidato a recibir un tratamiento dirigido a prevenir la enfermedad de Parkinson.

En una realización particular, el segundo método de la invención comprende determinar el patrón de metilación de todos los sitios CpG, de todos los sitios CHG y de todos los sitios CHH de la región D-loop mostrados en las Tablas 1, 3 y 5, y el patrón de metilación de todos los sitios CpG y de todos los sitios CHG del gen ND1 mostrados en las Tablas 2 y 4.

Tercer método de la invención

En un tercer aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para monitorizar la progresión de una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson en un sujeto (de aquí en adelante, tercer método de la invención) que comprende:

- a) determinar en una muestra de dicho sujeto que comprende ADN mitocondrial el patrón de metilación en la región D-loop, y/o en el gen ND1, en donde el patrón de metilación se determina en al menos un sitio seleccionado del grupo formado por:
 - (i) los sitios CpG de la región D-loop mostrados en la Tabla 1,
 - (ii) los sitios CpG del gen ND1 mostrados en la Tabla 2;
 - (iii) los sitios CHG de la región D-loop mostrados en la Tabla 3,
 - (iv) los sitios CHG del gen ND1 mostrados en la Tabla 4, y/o
 - 30 (v) los sitios CHH de la región D-loop mostrados en la Tabla 5 y
- b) comparar el patrón de metilación determinado en la etapa a) con dicho patrón de metilación obtenido en un estadio anterior de la enfermedad,

en donde una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CpG de la región D-loop, una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CHG de la región D-loop, una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CHH de la región D-loop, una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CpG del gen ND1 y/o una hipometilación en

al menos uno de dichos sitios CHG en el gen ND1 con respecto dicho patrón de metilación determinado en un estadio anterior de la enfermedad, es indicativo del avance de la enfermedad de Alzheimer; y

en donde una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CpG de la región D-loop, una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CHG de la región D-loop y/o una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CHH de la región D-loop con respecto a dicho patrón de metilación determinado en un estadio anterior de la enfermedad es indicativo del avance de la enfermedad de Parkinson.

El término “monitorizar la progresión”, que es equivalente a “determinar la prognosis”, se refiere a la determinación de la evolución de una enfermedad en un sujeto diagnosticado con dicha enfermedad. Particularmente, dicho término se refiere a la determinación de la progresión de una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de la enfermedad de Alzheimer y de la enfermedad de Parkinson en un sujeto diagnosticado con dicha enfermedad. Como el experto en la materia sabe, existen varios parámetros adecuados para determinar la evolución de una enfermedad en un sujeto, por ejemplo, la evolución de una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de EA y EP, puede determinarse por ejemplo, mediante, la determinación de la supervivencia global.

El término “supervivencia global”, tal y como se utiliza en el presente documento, hace referencia al porcentaje de sujetos que sobreviven, desde el momento de diagnóstico o tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson, al cabo de un periodo de tiempo definido.

Los términos “sujeto”, “enfermedad neurodegenerativa”, “enfermedad de Alzheimer”, “enfermedad de Parkinson”, “muestra”, “ADN mitocondrial”, “región D-loop”, “gen ND1”, “sitio CpG”, “sitio CHG”, sitio CHH”, “patrón de metilación”, “hipermetilación” e “hipometilación” se han descrito en detalle en el contexto del primer método de la invención y se utilizan con el mismo significado en el tercer método de la invención”.

De acuerdo con el tercer método de la invención, la primera etapa de determinación del pronóstico de una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de EA y EP comprende determinar en una muestra que comprende ADN mitocondrial de un sujeto diagnosticado con dicha enfermedad neurodegenerativa, el patrón de metilación en la región D-loop y/o en el gen ND1 en al menos un sitio seleccionado de los sitios mostrados en las Tablas 1 a 5.

En una segunda etapa, el tercer método de la invención comprende comparar el patrón de metilación obtenido en dicha primera etapa con dicho patrón de metilación obtenido en un estadio anterior de la enfermedad. Por lo tanto, el tercer método de la invención comprende determinar el patrón de metilación en una muestra que comprende ADN mitocondrial (primera muestra) de un sujeto diagnosticado con dicha enfermedad neurodegenerativa, el patrón de metilación en la región D-loop y/o en el gen ND1 en al menos un sitio seleccionado de los sitios CpG, CHG y/o CHH mostrados en las Tablas 1 a 5 y, transcurrido un periodo de tiempo adecuado, determinar en una muestra que comprende ADN mitocondrial (segunda muestra) de dicho sujeto diagnosticado con dicha enfermedad neurodegenerativa, el patrón de metilación en dichos sitios. Dicha segunda muestra puede ser obtenida transcurrido un periodo de un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, un año, dos años, tres años, cuatro años, cinco años, diez años o más tras la obtención de la primera muestra.

En una realización particular, dicha primera muestra es obtenida de un sujeto que no está recibiendo ningún tratamiento adecuado para dicha enfermedad neurodegenerativa seleccionada de AE y EP y dicha segunda muestra es obtenida transcurrido un periodo de tiempo tras el tratamiento de dicha enfermedad. En otra realización particular, dicha primera muestra es obtenida al comienzo de un tratamiento adecuado para dicha enfermedad neurodegenerativa y la segunda muestra es obtenida durante uno o varios puntos durante el transcurso de dicho tratamiento.

De acuerdo al tercer método de la invención:

- una hipometilación en al menos uno de los sitios CpG de la región D-loop mostrados en la Tabla 1,
- una hipometilación en al menos uno de los sitios CHG de la región D-loop mostrados en la Tabla 3,
- una hipometilación en al menos uno de los sitios CHH de la región D-loop mostrados en la Tabla 5,
- una hipometilación en al menos uno de los sitios CpG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 2, y/o
- una hipometilación en al menos uno de los sitios CHG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 4,

con respecto a dicho patrón de metilación determinado en un estadio anterior de la enfermedad es indicativo del avance de la enfermedad de Alzheimer; o

- una hipometilación en al menos, uno de los sitios CpG de la región D-loop mostrados en la Tabla 1,
- una hipometilación en al menos, uno de los sitios CHG de la región D-loop mostrados en la Tabla 3, y/o
- 5 - una hipometilación en al menos uno de los sitios CHH de la región D-loop mostrados en la Tabla 5

con respecto a dicho patrón de metilación determinado en un estadio anterior de la enfermedad es indicativo del avance de la enfermedad de Parkinson.

- 10 La expresión “avance de la enfermedad de Alzheimer” tal y como se usa en el presente documento, hace referencia que el sujeto se encuentra en un estadio más evolucionado de la enfermedad con respecto al estadio en el que fue diagnosticado. Es decir, si el sujeto fue clasificado en un estadio I-II de la EA (de acuerdo con la afectación cerebral y/o la sintomatología o manifestaciones clínicas de la enfermedad presentes en dicho sujeto) se
- 15 considera que el sujeto se encuentra en un estadio más avanzado de la enfermedad si dicho sujeto pasa a estar clasificado en un estadio III-IV o en un estadio V-VI o si el sujeto pasa de estar clasificado en un estadio III-IV a estar clasificado en un estadio V-VI de la EA.

- La expresión “avance de la enfermedad de Parkinson” tal y como se usa en el presente
- 20 documento, hace referencia que el sujeto se encuentra en un estadio más evolucionado de la enfermedad con respecto al estadio en el que fue diagnosticado. Es decir, si el sujeto fue clasificado en un estadio I-II de la EP (de acuerdo con la afectación cerebral y/o la sintomatología o manifestaciones clínicas de la enfermedad presentes en dicho sujeto) se considera que el sujeto se encuentra en un estadio más avanzado de la enfermedad si
- 25 dicho sujeto pasa a estar clasificado en un estadio III-IV o en un estadio V-VI o si el sujeto pasa de estar clasificado en un estadio III-IV a estar clasificado en un estadio V-VI de la EP.

- En una realización particular del tercer método de la invención, la muestra que comprende ADN mitocondrial se selecciona de una biopsia de un tejido sólido o de un biofluido. Las
- 30 muestras pueden ser obtenidas por métodos convencionales conocidos por el experto en la materia.

En una realización todavía más particular, el biofluido se selecciona de sangre periférica o líquido cefalorraquídeo.

En una realización todavía más particular, dicho tejido sólido es tejido cerebral. En una realización preferida de la invención, si se monitorizar la progresión de la enfermedad de Parkinson, dicha muestra de tejido cerebral es una muestra obtenida de la sustancia negra.

- 5 En una realización particular, el tercer método de la invención comprende determinar en una muestra de un sujeto que comprende ADN mitocondrial, el patrón de metilación en al menos un sitio seleccionado de los sitios CpG de la región D-loop, mostrados en la Tabla 1.

- 10 En una realización particular, el tercer método de la invención comprende determinar el patrón de metilación en al menos un sitio CpG de la región D-loop seleccionado de los sitios mostrados en la Tabla 1. En otra realización particular, el primer método de la invención comprende determinar el patrón de metilación en al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15 o al menos 16 sitios CpG seleccionados
15 de la Tabla 1.

- En una realización todavía más particular y preferida de la invención, el tercer método de la invención comprende determinar el patrón de metilación en todos los sitios CpG de la región D-loop mostrados en la Tabla 1.

- 20 En otra realización particular, el tercer método de la invención comprende determinar en una muestra de un sujeto que comprende ADN mitocondrial, el patrón de metilación en al menos un sitio seleccionado de los sitios CpG del gen ND1 mostrados en la Tabla 2.

- 25 En otra realización particular, el tercer método de la invención comprende determinar el patrón de metilación en un sitio CpG del gen ND1 seleccionado de los sitios mostrados en la Tabla 2. En otra realización particular, el tercer método de la invención comprende determinar el patrón de metilación en al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5 o al menos 6 sitios CpG seleccionados de la Tabla 2.

- 30 En una realización todavía más particular y preferida de la invención, el tercer método de la invención comprende determinar el patrón de metilación en todos los sitios CpG del gen ND1 mostrados en la Tabla 2.

En otra realización particular, el tercer método de la invención comprende determinar en una muestra de un sujeto que comprende ADN mitocondrial, el patrón de metilación en al menos un sitio seleccionado de los sitios CHG de la región D-loop, mostrados en la Tabla 3.

- 5 En una realización particular, el tercer método de la invención comprende determinar el patrón de metilación en al menos un sitio CHG de la región D-loop seleccionado de los sitios mostrados en la Tabla 3. En otra realización particular, el tercer método de la invención comprende determinar el patrón de metilación en al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al
10 menos 12, al menos 13 o al menos 14 o 15 sitios CHG seleccionados de la Tabla 3.

En una realización todavía más particular y preferida de la invención, el tercer método de la invención comprende determinar el patrón de metilación en todos los sitios CHG de la región D-loop mostrados en la Tabla 3.

15

En otra realización particular, el tercer método de la invención comprende determinar en una muestra de un sujeto que comprende ADN mitocondrial, el patrón de metilación en al menos un sitio seleccionado de los sitios CHG del gen ND1 mostrados en la Tabla 4.

- 20 En otra realización particular, el tercer método de la invención comprende determinar el patrón de metilación en al menos un sitio CHG del gen ND1 seleccionado de los sitios mostrados en la Tabla 4. En otra realización particular, el tercer método de la invención comprende determinar el patrón de metilación en al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, o al menos 6 sitios CpG seleccionados de la Tabla 4.

25

En una realización todavía más particular y preferida de la invención, el tercer método de la invención comprende determinar el patrón de metilación en todos los sitios CHG del gen ND1 mostrados en la Tabla 4.

- 30 En otra realización particular, el tercer método de la invención comprende determinar en una muestra de un sujeto que comprende ADN mitocondrial, el patrón de metilación en al menos un sitio seleccionado de los sitios CHH de la región D-loop, mostrados en la Tabla 5.

- En otra realización particular, el tercer método de la invención comprende determinar el
35 patrón de metilación en al menos un sitio CHH de la región D-loop seleccionado de los sitios mostrados en la Tabla 5. En otra realización particular, el tercer método de la invención

comprende determinar el patrón de metilación en al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos al menos 22, al menos 23, al menos 24, al menos 25, al menos 26, al menos 27, al menos 28, al menos 29, al menos 30, al menos 31, al menos 32, al menos 33, al menos 34, al menos 35, al menos 36, al menos 37, al menos 38, al menos 39, al menos 40, al menos 41, al menos 42 o al menos 43 sitios CHH seleccionados de la Tabla 5.

10 En una realización todavía más particular y preferida de la invención, el tercer método de la invención comprende determinar el patrón de metilación en todos los sitios CHH de la región D-loop mostrados en la Tabla 5.

En formas preferidas de realización, el tercer método de la invención comprende:

- 15 (i) determinar el patrón de metilación en todos los sitios CpG de la región D-loop mostrados en la Tabla 1 y en todos los sitios CpG del gen ND1 mostrados en la Tabla 2,
- (ii) determinar el patrón de metilación en todos los sitios CpG de la región D-loop mostrados en la Tabla 1 y en todos los sitios CHG de la región D-loop mostrados en la Tabla 3,
- 20 (iii) determinar el patrón de metilación en todos los sitios CpG de la región D-loop mostrados en la Tabla 1 y en todos los sitios CHG del gen ND1 mostrados en la Tabla 4,
- (iv) determinar el patrón de metilación en todos los sitios CpG de la región D-loop mostrados en la Tabla 1 y en todos los sitios CHH de la región D-loop mostrados en la Tabla 5,
- 25 (v) determinar el patrón de metilación en todos los sitios CpG del gen ND1 mostrados en la Tabla 2 1 y en todos los sitios CHG de la región D-loop mostrados en la Tabla 3,
- 30 (vi) determinar el patrón de metilación en todos los sitios CpG del gen ND1 mostrados en la Tabla 2 y en todos los sitios CHG del gen ND1 mostrados en la Tabla 4,
- (vii) determinar el patrón de metilación en todos los sitios CpG del gen ND1 mostrados en la Tabla 2 y en todos los sitios CHH de la región D-loop mostrados en la Tabla 5.
- 35

- (viii) determinar el patrón de metilación en todos los sitios CHG de la región D-loop mostrados en la Tabla 3 y en todos los sitios CHG del gen ND1 mostrados en la Tabla 4 y/o
- (ix) determinar el patrón de metilación en todos los sitios CHG de la región D-loop mostrados en la Tabla 3
- (x) determinar el patrón de metilación en todos los sitios CHG del gen ND1 mostrados en la Tabla 4 y en todos los sitios CHH de la región D-loop mostrados en la Tabla 5

10 Métodos adecuados para determinar el patrón de metilación en una muestra de un sujeto que comprende ADN mitocondrial se han descrito en detalle en el contexto del primer método de la invención.

En una realización particular, el tercer método de la invención comprende determinar el patrón de metilación en dichos sitios CpG, CHG y/o CHH mediante una técnica seleccionada del grupo que consiste en PCR específica de metilación (MSP), un método basado en enriquecimiento (p. ej. MeDIP, MBD-seq y MethylCap), secuenciación por bisulfito y por un método basado en bisulfito (p. ej. RRBS, Infinium, GoldenGate, Cobra, MSP, MethylLight) y un método por digestión de restricción (p. ej., MRE-seq, o ensayo HELP), pirosecuenciación, ensayo de ChIP-on-chip, o conversión diferencial, restricción diferencial, peso diferencial de los sitio(s) CpG, CHG y/o CHH metilados del ADN.

En una realización particular y preferida de la invención, el patrón de metilación de uno o más sitios CpG, CHG y/o CHH en la región D-loop y/o uno o más sitios CpG y/o CHH en el gen ND1, de acuerdo al tercer método de la invención, se determina mediante pirosecuenciación.

En una realización particular, el tercer método de la invención comprende determinar el patrón de metilación de todos los sitios CpG, de todos los sitios CHG y de todos los sitios CHH de la región D-loop mostrados en las Tablas 1, 3 y 5, y el patrón de metilación de todos los sitios CpG y de todos los sitios CHG del gen ND1 mostrados en las Tablas 2 y 4.

Cuarto método de la invención

Los autores de la presente invención han descubierto un polimorfismo de nucleótido simple (SNP) en la región D-loop del ADN mitocondrial que está estadísticamente asociado al

desarrollo de la enfermedad de Alzheimer si dicho SNP se encuentra en al menos el 60% de las moléculas de ADNmt de un sujeto.

Por lo tanto, en un cuarto aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para diagnosticar o para determinar el riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer en un sujeto (de aquí en adelante, el cuarto método de la invención) que comprende determinar en una muestra que comprende ADN mitocondrial de dicho sujeto el nucleótido en la posición polimórfica 16519 según la secuencia definida con el número de acceso NC_012920 (SEQ ID NO: 1) en la base de datos NCBI, en donde la detección del nucleótido C en dicha posición polimórfica o la presencia del nucleótido C en dicha posición polimórfica en al menos un 60% de las moléculas de ADN mitocondrial de dicho sujeto es indicativo de que el sujeto sufre dicha enfermedad o de que el sujeto tiene un riesgo elevado de desarrollar dicha enfermedad.

Los términos “diagnóstico”, “determinar el riesgo”, “muestra” y “ADN mitocondrial” han sido definidos en el contexto del primer, segundo y tercer método de la invención y se utilizan con el mismo significado en el cuarto método de la invención.

La presencia de un nucleótido concreto en una posición polimórfica puede definirse como el porcentaje de moléculas de ADN que presentan dicho nucleótido en dicha posición polimórfica con respecto al total de moléculas de ADN presentes en la muestra. De acuerdo con el cuarto método de la invención se considera que el sujeto padece la enfermedad de Alzheimer o que el sujeto tiene un riesgo elevado de desarrollar dicha enfermedad si el ADNmt de dicho sujeto presenta el nucleótido C en la posición polimórfica 16519 según la secuencia definida con el número de acceso NC_012920 cuando al menos el porcentaje de moléculas que presentan dicho nucleótido en dicha posición es de al menos un 60%, al menos un 65%, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o más. En una realización particular, se considera que el sujeto padece la enfermedad de Alzheimer o que el sujeto tiene un riesgo elevado de desarrollar dicha enfermedad si el ADNmt de dicho sujeto presenta el nucleótido C en la posición polimórfica 16519 según la secuencia definida con el número de acceso NC_012920 en el 60% de las moléculas de ADNmt. En una realización preferida de la invención se considera que el sujeto padece la enfermedad de Alzheimer o que el sujeto tiene un riesgo elevado de desarrollar dicha enfermedad si el ADNmt de dicho sujeto presenta el nucleótido C en la posición polimórfica 16519 según la secuencia definida con el número de acceso NC_012920 en el 71% de las moléculas de ADNmt. En otra realización preferida de la

invención, se considera que el sujeto padece la enfermedad de Alzheimer o que el sujeto tiene un riesgo elevado de desarrollar dicha enfermedad si el ADNmt de dicho sujeto presenta el nucleótido C en la posición polimórfica 16519 según la secuencia definida con el número de acceso NC_012920 en el 74% de las moléculas de ADNmt. En otra realización preferida de la invención, se considera que el sujeto padece la enfermedad de Alzheimer o que el sujeto tiene un riesgo elevado de desarrollar dicha enfermedad si el ADNmt de dicho sujeto presenta el nucleótido C en la posición polimórfica 16519 según la secuencia definida con el número de acceso NC_012920 en el 78% de las moléculas de ADNmt.

Como el experto en la materia sabe, una muestra que comprende ADN mitocondrial puede ser homoplásmica o heteroplásmica. El término “heteroplasma” o “ADN mitocondrial heteroplásmico” tal y como se utiliza en el presente documento, hace referencia a que el ADN mitocondrial de un sujeto está formado por una mezcla de ADN de al menos dos poblaciones diferentes de mitocondrias. El término “homoplasma” o “ADN mitocondrial homoplásmico” tal y como se utiliza en el presente documento, hace referencia a que el ADN mitocondrial de un sujeto está formado por una única población de ADN de una única población mitocondrial.

En una realización particular, en el contexto de la presente invención la muestra de ADN mitocondrial es homoplásmica, en cuyo caso todas las mitocondrias presentes en el sujeto contienen material genético idéntico por lo que todas las mitocondrias de un sujeto presentan en su genoma el nucleótido C en la posición polimórfica 16519 según la secuencia definida con el número de acceso NC_012920. En aquellas realizaciones en donde la muestra de ADN mitocondrial es homoplásmica, el cuarto método de la invención permite diagnosticar o determinar el riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer en un sujeto mediante la detección del nucleótido C en la posición polimórfica 16519 según la secuencia definida con el número de acceso NC_012920 en dicha muestra de ADN mitocondrial; es decir, la detección del nucleótido C en la posición polimórfica 16519 según la secuencia definida con el número de acceso NC_012920 en una muestra de ADN mitocondrial homoplásmica de un sujeto es indicativo de que el sujeto padece la enfermedad de Alzheimer o de que el sujeto tiene un riesgo elevado de desarrollar dicha enfermedad. Por el contrario, la detección del nucleótido T en la posición polimórfica 16519 según la secuencia definida con el número de acceso NC_012920 en una muestra de ADN mitocondrial homoplásmica de un sujeto es indicativo de que el sujeto no padece la enfermedad de Alzheimer o de que el sujeto tiene un riesgo bajo de desarrollar dicha enfermedad.

En otra realización particular y preferida de la invención, la muestra de ADN mitocondrial es heteroplásmica, es decir el ADNmt del sujeto es de dos poblaciones mitocondriales cuyo material genético no es idéntico entre sí. De acuerdo a la presente invención, la heteroplasma se refiere a que un porcentaje de las mitocondrias de dicho sujeto presentan en su genoma el oligonucleótido C en la posición polimórfica 16519 según la secuencia definida con el número de acceso NC_012920 y el porcentaje restante de mitocondrias de dicho sujeto presentan en su genoma el oligonucleótido T en la posición polimórfica 16519 según la secuencia definida con el número de acceso NC_012920.

El experto en la materia entenderá que la identificación de la presencia del polimorfismo en al menos un 60% de las moléculas de ADNmt es igualmente útil para seleccionar un sujeto para someterlo a un tratamiento preventivo de la enfermedad de Alzheimer en casos en los que el ADNmt del sujeto presente heteroplasma como en los casos en los presente homoplasma. Así, en el caso de sujetos cuyo ADNmt es homoplásmico, la totalidad de las moléculas presentará el nucleótido T o el nucleótido C en la posición 16519, en cuyo caso el porcentaje de moléculas de ADNmt con el polimorfismo indicativo de que el paciente es candidato a recibir un tratamiento preventivo de la enfermedad de Alzheimer es del 100% o del 0%. Así, en el caso de sujetos cuyo ADNmt es heteroplásmico, existirá una población de moléculas de ADNmt que presentará el nucleótido T en la posición 16519 y una segunda población de moléculas que presentará el nucleótido C en la posición 16519. En ese caso, se considera que el paciente es candidato a recibir un tratamiento preventivo de la enfermedad de Alzheimer cuando el porcentaje de moléculas de ADNmt que presentan el nucleótido C en la posición 16519 es igual o superior al 60%.

La determinación de la homoplasma y heteroplasma así como el porcentaje de heteroplasma o el “grado de heteroplasma” puede determinarse mediante cualquier técnica conocida por el experto en la materia. Ejemplos ilustrativos no limitativos de técnicas que permiten determinar si una muestra de ADN mitocondrial es heteroplásmica incluyen pero no se limitan a southern-blot, PCR-RFLP o secuenciación del ADNmt. Brevemente, la técnica PCR-RFLP está basada en el hecho de que, normalmente, la presencia de un SNP en una muestra está asociada a la creación o destrucción de secuencias concretas o dianas de una o varias enzimas de restricción. La detección de heteroplasma mediante la técnica PCR-RFLP consiste en una primera etapa, en la amplificación de la región del material genético que contiene el polimorfismo que se desea detectar, mediante el empleo oligonucleótidos específicos, seguida de una segunda etapa en donde los fragmentos

amplificados se someten a una reacción de digestión enzimática en presencia de una enzima de restricción apropiada. Puesto que la presencia o ausencia del polimorfismo en la muestra está asociada con la presencia o ausencia de la diana de restricción específica, el patrón de tamaños de los fragmentos obtenidos determinará si la muestra está formada por un único patrón de bandas, en cuyo caso la muestra es homoplásmica. Si por el contrario, el análisis determina la presencia de dos patrones de bandas, correspondientes al ADN de dos poblaciones mitocondriales distintas, entonces la muestra de ADN mitocondrial es heteroplásmica.

El término “polimorfismo de nucleótido simple” o “polimorfismo de un solo nucleótido” o “SNP”, tal y como se usa aquí, se refiere a una variación en la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico que se produce en un solo nucleótido (A, C, T o G), donde cada posible secuencia está presente en una proporción igual o mayor al 1% de la población. Estos polimorfismos aparecen cuando un solo nucleótido en el genoma se altera (por ejemplo, por medio de sustitución, adición o delección). Cada versión de la secuencia con respecto al sitio polimórfico se refiere como un alelo del sitio polimórfico. Los SNPs tienden a ser estables evolutivamente de generación en generación y, como tal, pueden ser usados para estudiar anomalías genéticas específicas en una población.

La variante polimórfica de la invención es la posición 16519 en base a la numeración definida por el numero NC_012920 en la base de datos NCBI. La variante polimórfica contiene una C en dicha posición.

Los términos “determinación de la secuencia de un SNP” o “detectar un SNP” se utilizan indistintamente en la presente invención, y se refieren a la determinación de la secuencia de un SNP particular en la materia objeto de estudio. La determinación de la secuencia de los SNP se puede realizar por medio de varios procesos conocidos por la persona experta en la materia.

En algunas realizaciones particulares de la invención, la muestra que comprende ADN mitocondrial se selecciona de una biopsia de un tejido sólido o de un biofluido. Las muestras pueden ser obtenidas por métodos convencionales conocidos por el experto en la materia.

En una realización todavía más particular, el biofluido se selecciona de sangre periférica o líquido cefalorraquídeo.

En una realización todavía más particular, dicho tejido sólido es tejido cerebral.

Si el material en donde se desea determinar dicho SNP según el presente método es un tejido sólido o un biofluido, preferiblemente se procede a una extracción previa del ácido nucleico de la muestra empleando cualquier técnica apropiada para ello. En una realización preferida de la invención, la fracción de ADN adecuada para la puesta en práctica de la invención es el ADN total. La extracción del ADN puede ser llevado a cabo usando cualquier método conocido por los expertos en la materia tal y como se ha detallado para el primer método de la invención.

Si se desea, la detección de dicho SNP de acuerdo al presente método puede llevarse a cabo en muestras en donde previamente se ha aislado la fracción mitocondrial y posteriormente se ha aislado el ADN de las mismas. El aislamiento de la fracción mitocondrial puede ser llevada a cabo usando cualquier método conocido de fraccionamiento celular y que han sido detallados en primer método de la presente invención.

Después de aislar y amplificar (si es necesario) el ácido nucleico, se detecta la secuencia del SNP de la invención por cualquier método o técnica capaz de determinar nucleótidos presentes en un SNP o polimorfismo. Por ejemplo, se puede detectar un SNP mediante la realización de secuenciación, mini-secuenciación, hibridación, análisis de fragmentos de restricción, ensayo de ligación de oligonucleótidos, PCR específica de alelo, o una combinación de los mismos. Como tal, los sistemas y métodos para la detección de SNPs, en general incluyen, pero no se limitan a, secuenciación de ácidos nucleicos, métodos de hibridación y la tecnología de matriz (por ejemplo, la tecnología disponible de Aclara BioSciences, Affymetrix, Agilent Technologies, Illumina Inc., etc); también se pueden utilizar técnicas basadas en el cambio de movilidad de los fragmentos de ácido nucleico amplificados, como por ejemplo *Single Stranded Conformational Polymorphism* (SSCP), *denaturing gradient gel electrophoresis* (DGGE), *Chemical Mismatch Cleavage* (CMC), *Restriction Fragment Polymorphisms* (RFLPs), PCR-RFLP, *WAVE analysis* y similares (Methods Mol. Med. 2004; 108: 173-88). Por supuesto, esta lista es meramente ilustrativa y en modo alguno limitativa. Los expertos en la materia pueden usar cualquier método apropiado para lograr dicha detección.

En otra realización particular, la determinación de la secuencia de dicho SNP se lleva a cabo mediante PCR-RFLP.

En una realización particular, el cuarto método de la invención se refiere a un método *in vitro* para diagnosticar estadios tempranos de la EA. El término “estadios tempranos de la enfermedad de Alzheimer” según se utiliza en la presente invención, se refiere a la enfermedad de Alzheimer en estadios I-II según la escala Braak definida en el contexto del primer método de la invención.

Quinto método de la invención

En un quinto aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para seleccionar un sujeto para someterlo a un tratamiento preventivo de la enfermedad de Alzheimer que comprende determinar en una muestra que comprende ADN mitocondrial de dicho sujeto el nucleótido en la posición polimórfica 16519 según la secuencia definida con el número de acceso NC_012920 en la base de datos NCBI, en donde la detección del nucleótido C en dicha posición polimórfica o la presencia del nucleótido C en dicha posición polimórfica en al menos un 60% de las moléculas de ADN mitocondrial de dicho sujeto es indicativo de que el sujeto es candidato a recibir un tratamiento dirigido a prevenir la enfermedad de Alzheimer.

Los términos “Alzheimer”, “tratamiento”, “muestra”, “ADN mitocondrial”, y “polimorfismo” así como métodos para obtener dicha muestra y detectar un polimorfismo han sido detallados en el contexto del primer, segundo, tercer y cuarto método de la invención y se utilizan aquí con el mismo significado.

De acuerdo con el quinto método de la invención se considera que el sujeto es candidato a ser sometido a un tratamiento dirigido a prevenir la enfermedad de Alzheimer si el ADNmt de dicho sujeto presenta el nucleótido C en la posición polimórfica 16519 según la secuencia definida con el número de acceso NC_012920 cuando al menos el porcentaje de moléculas de ADNmt que presentan dicho nucleótido en dicha posición es de al menos un 60%, al menos un 65%, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o más. En una realización particular, se considera que el sujeto es candidato a recibir un tratamiento preventivo de la enfermedad de Alzheimer si el ADNmt de dicho sujeto presenta el nucleótido C en la posición polimórfica 16519 según la secuencia definida con el número de acceso NC_012920 en el 60% de las moléculas de ADNmt.

El experto en la materia entenderá que la identificación de la presencia del polimorfismo en al menos un 60% de las moléculas de ADNmt es igualmente útil para seleccionar un sujeto para someterlo a un tratamiento preventivo de la enfermedad de Alzheimer en casos en los

que el ADNmt del sujeto presente heteroplasma como en los casos en los presente homoplasma. Así, en el caso de sujetos cuyo ADNmt es homoplásmico, la totalidad de las moléculas presentará el nucleótido T o el nucleótido C en la posición 16519, en cuyo caso el porcentaje de moléculas de ADNmt con el polimorfismo indicativo de que el paciente es candidato a recibir un tratamiento preventivo de la enfermedad de Alzheimer es del 100% o del 0%. Así, en el caso de sujetos cuyo ADNmt es heteroplásmico, existirá una población de moléculas de ADNmt que presentará el nucleótido T en la posición 16519 y una segunda población de moléculas que presentará el nucleótido C en la posición 16519. En ese caso, se considera que el paciente es candidato a recibir un tratamiento preventivo de la enfermedad de Alzheimer cuando el porcentaje de moléculas de ADNmt que presentan el nucleótido C en la posición 16519 es igual o superior al 60%.

En algunas realizaciones particulares de la invención, la muestra que comprende ADN mitocondrial se selecciona de una biopsia de un tejido sólido o de un biofluido. Las muestras pueden ser obtenidas por métodos convencionales conocidos por el experto en la materia.

En una realización particular, en el contexto de la presente invención la muestra de ADN mitocondrial es homoplásmica, en cuyo caso todas las mitocondrias presentes en el sujeto contienen material genético idéntico por lo que todas las mitocondrias de un sujeto presentan en su genoma el nucleótido C en la posición polimórfica 16519 según la secuencia definida con el número de acceso NC_012920. En aquellas realizaciones en donde la muestra de ADN mitocondrial es homoplásmica, el quinto método de la invención permite seleccionar un paciente para someterlo a un tratamiento preventivo de la enfermedad de Alzheimer mediante la detección del nucleótido C en la posición polimórfica 16519 según la secuencia definida con el número de acceso NC_012920 en dicha muestra de ADN mitocondrial; es decir, la detección del nucleótido C en la posición polimórfica 16519 según la secuencia definida con el número de acceso NC_012920 en una muestra de ADN mitocondrial homoplásmica de un paciente es indicativo de que el sujeto es candidato a recibir un tratamiento preventivo de la enfermedad de Alzheimer. Por el contrario, la detección del nucleótido T en la posición polimórfica 16519 según la secuencia definida con el número de acceso NC_012920 en una muestra de ADN mitocondrial homoplásmica de un paciente es indicativo de que dicho paciente no es candidato a recibir un tratamiento preventivo de la enfermedad de Alzheimer.

En otra realización particular y preferida de la invención, la muestra de ADN mitocondrial es heteroplásmica, es decir el ADNmt del sujeto es de dos poblaciones mitocondriales cuyo

material genético no es idéntico entre sí. De acuerdo a la presente invención la heteroplasma se refiere a que un porcentaje de las mitocondrias de dicho sujeto presentan en su genoma el oligonucleótido C en la posición polimórfica 16519 según la secuencia definida con el número de acceso NC_012920 y el porcentaje restante de mitocondrias de dicho sujeto presentan en su genoma el oligonucleótido T en la posición polimórfica 16519 según la secuencia definida con el número de acceso NC_012920.

Métodos para determinar si una muestra es homoplásmica o heteroplásmica así como para determinar el grado de heteroplasma de una muestra han sido detallados en el contexto del cuarto método de la invención y se incorporan aquí por referencia.

En una realización todavía más particular, el biofluido se selecciona de sangre periférica o líquido cefalorraquídeo.

En una realización todavía más particular, dicho tejido sólido es tejido cerebral.

Si el material en donde se desea determinar dicho SNP según el presente método es un tejido sólido o un biofluido, preferiblemente se procede a una extracción previa del ácido nucleico de la muestra empleando cualquier técnica apropiada para ello. En una realización preferida de la invención, la fracción de ADN adecuada para la puesta en práctica de la invención es el ADN total. La extracción del ADN puede ser llevado a cabo usando cualquier método conocido por los expertos en la materia tal y como se ha detallado para el primer método de la invención.

En otra realización particular, la determinación de la secuencia de dicho SNP se lleva a cabo mediante PCR-RFLP.

Polinucleótidos de la invención

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un ácido nucleico (de aquí en adelante "primer polinucleótido de la invención") que comprende al menos 9 polinucleótido contiguos de una región del ADN mitocondrial en donde dicha región comprende al menos un sitio de metilación seleccionado de los sitios CpG de la región D-loop mostrados en la Tabla 1.

El término "polinucleótido", como se usa aquí, se refiere a moléculas de ADN o ARN de cadena simple, de más de 13 bases de longitud. Los polinucleótidos de la invención son preferiblemente moléculas de ADN de al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 18,

al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90, al menos 100 o más bases de longitud.

En una realización particular, el primer polinucleótido de la invención comprende al menos 9,
5 al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30 o más nucleótidos contiguos a dicho al menos un sitio CpG seleccionado de la Tabla 1.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un ácido nucleico (de aquí en adelante
10 “segundo polinucleótido de la invención”) que comprende al menos 9 polinucleótido contiguos de una región del ADN mitocondrial en donde dicha región comprende al menos un sitio de metilación seleccionado de los sitios CpG del gen ND1 mostrados en la Tabla 2.

En una realización particular, el segundo polinucleótido de la invención comprende al menos
15 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30 o más nucleótidos contiguos a dicho al menos un sitio CpG seleccionado de la Tabla 2.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un ácido nucleico (de aquí en adelante
20 “tercer polinucleótido de la invención”) que comprende al menos 9 polinucleótido contiguos de una región del ADN mitocondrial en donde dicha región comprende al menos un sitio de metilación seleccionado de los sitios CHG de la región D-loop mostrados en la Tabla 3.

En una realización particular, el tercer polinucleótido de la invención comprende al menos 9,
25 al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30 o más nucleótidos contiguos a dicho al menos un sitio CHG seleccionado de la Tabla 3.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un ácido nucleico (de aquí en adelante
30 “cuarto polinucleótido de la invención”) que comprende al menos 9 polinucleótido contiguos de una región del ADN mitocondrial en donde dicha región comprende al menos un sitio de metilación seleccionado de los sitios CHG del gen ND1 mostrados en la Tabla 4.

En una realización particular, el cuarto polinucleótido de la invención comprende al menos 9,
35 al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos

20, al menos 25, al menos 30 o más nucleótidos contiguos a dicho al menos un sitio CHG seleccionado de la Tabla 4.

5 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un ácido nucleico (de aquí en adelante “quinto polinucleótido de la invención”) que comprende al menos 9 polinucleótido contiguos de una región del ADN mitocondrial en donde dicha región comprende al menos un sitio de metilación seleccionado de los sitios CHH de la región D-loop mostrados en la Tabla 5.

10 En una realización particular, el quinto polinucleótido de la invención comprende al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30 o más nucleótidos contiguos a dicho al menos un sitio CHH seleccionado de la Tabla 5.

15 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un ácido nucleico (de aquí en adelante “sexto polinucleótido de la invención”) que comprende al menos 9 polinucleótido contiguos de una región del ADN mitocondrial en donde dicha región comprende al menos un sitio de metilación seleccionado de los sitios CpG de la región D-loop mostrados en la Tabla 1, en donde la posición correspondiente a la citosina en dicho sitio CpG es uracilo.

20 En una realización particular, el sexto polinucleótido de la invención comprende al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30 o más nucleótidos contiguos a dicho al menos un sitio CpG seleccionado de la Tabla 1 en donde la posición correspondiente a la citosina en dicho sitio CpG es uracilo.

25 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un ácido nucleico (de aquí en adelante “séptimo polinucleótido de la invención”) que comprende al menos 9 polinucleótido contiguos de una región del ADN mitocondrial en donde dicha región comprende al menos un sitio de metilación seleccionado de los sitios CpG del gen ND1 mostrados en la Tabla 2, en donde la
30 posición correspondiente a la citosina en dicho sitio CpG es uracilo.

35 En una realización particular, el séptimo polinucleótido de la invención comprende al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30 o más nucleótidos contiguos a dicho al menos un sitio CpG seleccionado de la Tabla 2, en donde la posición correspondiente a la citosina en dicho sitio CpG es uracilo.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un ácido nucleico (de aquí en adelante “octavo polinucleótido de la invención”) que comprende al menos 9 polinucleótido contiguos de una región del ADN mitocondrial en donde dicha región comprende al menos un sitio de metilación seleccionado de los sitios CHG de la región D-loop mostrados en la Tabla 3, en donde la posición correspondiente a la citosina en dicho sitio CHG es uracilo.

En una realización particular, el octavo polinucleótido de la invención comprende al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30 o más nucleótidos contiguos a dicho al menos un sitio CHG seleccionado de la Tabla 3, en donde la posición correspondiente a la citosina en dicho sitio CHG es uracilo.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un ácido nucleico (de aquí en adelante “noveno polinucleótido de la invención”) que comprende al menos 9 polinucleótido contiguos de una región del ADN mitocondrial en donde dicha región comprende al menos un sitio de metilación seleccionado de los sitios CHG del gen ND1 mostrados en la Tabla 4, en donde la posición correspondiente a la citosina en dicho sitio CHG es uracilo.

En una realización particular, el noveno polinucleótido de la invención comprende al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30 o más nucleótidos contiguos a dicho al menos un sitio CHG seleccionado de la Tabla 4, en donde la posición correspondiente a la citosina en dicho sitio CHG es uracilo.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un ácido nucleico (de aquí en adelante “décimo polinucleótido de la invención”) que comprende al menos 9 polinucleótido contiguos de una región del ADN mitocondrial en donde dicha región comprende al menos un sitio de metilación seleccionado de los sitios CHH de la región D-loop mostrados en la Tabla 5, en donde la posición correspondiente a la citosina en dicho sitio CHH es uracilo.

En una realización particular, el décimo polinucleótido de la invención comprende al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30 o más nucleótidos contiguos a dicho al menos un sitio CHH seleccionado de la Tabla 5, en donde la posición correspondiente a la citosina en dicho sitio CHH es uracilo.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un polinucleótido que hibrida de forma específica con dichos primero, segundo, tercero, cuarto, quinto, sexto, séptimo, octavo, noveno y décimo polinucleótidos de la invención.

5

La expresión "que hibrida de forma específica" o "capaz de hibridar de forma específica", tal y como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de un oligonucleótido o de un polinucleótido de reconocer específicamente la secuencia de un sitio CpG, CHG y CHH. Tal y como se usa aquí el término "hibridación" es el proceso de combinar dos moléculas de ácido nucleico de cadena simple o moléculas con un alto grado de similitud que da lugar a una molécula simple de cadena doble mediante el apareamiento específico entre bases complementarias. Normalmente la hibridación ocurre bajo condiciones muy rigurosas o condiciones moderadamente rigurosas.

10

15 Como se conoce en la técnica, la "similitud" entre dos moléculas de ácido nucleico se determina comparando la secuencia de nucleótidos de una molécula a la secuencia de nucleótidos de una segunda molécula. Las variantes de acuerdo con la presente invención incluyen secuencias de nucleótidos que son al menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95% similares o idénticas a la secuencia de dichos al menos un sitio CpG, CGH y CHH seleccionado de los sitios mostrados en las Tablas 1 a 5. El grado de identidad entre dos moléculas de ácido nucleico se determina utilizando algoritmos informáticos y métodos que son ampliamente conocidos por las personas expertas en la materia. La identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina preferiblemente mediante el algoritmo BLASTN (BLAST Manual, Altschul et al, 1990, NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, 20 Altschul, S., et al, J. Mol Biol. 215: 403-10).

25

La "rigurosidad" de las reacciones de hibridación se determina fácilmente por un experto ordinario en la materia, y generalmente es un cálculo empírico dependiente de la longitud de la sonda, temperatura de lavado y concentración de sal. En general, las sondas más largas requieren temperaturas más altas para una correcta hibridación, mientras que sondas más cortas necesitan temperaturas más bajas. La hibridación generalmente depende de la capacidad del ADN desnaturalizado para rehibridarse cuando las cadenas complementarias están presentes en un entorno por debajo de su temperatura de fusión. Cuanto mayor sea el grado de homología deseada entre la sonda y la secuencia hibridable, mayor es la temperatura relativa que puede utilizarse. Como resultado, se deduce que temperaturas relativas superiores tenderían a hacer las condiciones de reacción más rigurosas, mientras

30

35

que temperaturas más bajas no tanto. Para detalles adicionales y una explicación de la astringencia de las reacciones de hibridación, ver Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995).

- 5 El término "condiciones rigurosas" o "condiciones de alta rigurosidad", como se usa en la presente memoria, típicamente: (1) utilizan una fuerza iónica baja y una temperatura elevada para el lavado, por ejemplo 0,015 M de cloruro de sodio/0,0015M de citrato sódico /0.1% dodecil sulfato de sodio a 50 ° C; (2) emplean durante la hibridación un agente desnaturalizante, tal como formamida, por ejemplo, 50% (v / v) formamida con 0,1% de
- 10 albúmina de suero bovino/0.1% Ficoll/0.1% polivinilpirrolidona/50 mM de tampón de fosfato de sodio a pH 6,5 con 750 mM de cloruro sódico, 75 mM citrato sódico a 42 ° C; o (3) emplean 50% de formamida, 5xSSC (0,75 M NaCl, 0,075 M citrato sódico), 50 mM fosfato sódico (pH 6,8), 0,1% de pirofosfato de sodio, solución de Denhardt 5x, ADN de esperma de salmón sonificado (50 mg / ml), 0,1% de SDS, y 10% de sulfato de dextrano a 42 ° C, con
- 15 lavados a 42 ° C en 0,2 x SSC (cloruro sódico / citrato sódico) y formamida al 50%, seguido por un lavado de alta rigurosidad que consiste en 0,1 xSSC que contiene EDTA a 55 ° C.

"Condiciones moderadamente rigurosas" pueden identificarse como se describe por Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor

20 Press, 1989, e incluyen el uso de solución de lavado y condiciones de hibridación (p. ej., temperatura, fuerza iónica y % de SDS) menos rigurosas que las descritas anteriormente. Un ejemplo de condiciones moderadamente astringentes es la incubación durante la noche a 37 ° C en una solución que comprende: 20% de formamida, 5xSSC (150 mM NaCl, 15 mM citrato trisódico), 50 mM fosfato sódico (pH 7,6), solución de Denhardt 5x, 10% de sulfato de

25 dextrano y 20 mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado fragmentado, seguido por lavado de los filtros en 1xSSC a aproximadamente 37-50° C. El experto en la materia reconocerá cómo ajustar la temperatura, fuerza iónica, etc. en caso necesario para adaptar factores tales como longitud de la sonda y similares.

30 Kits de la invención

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit (de aquí en adelante "primer kit de la invención"), que comprende al menos un oligonucleótido capaz de hibridar específicamente y de forma dependiente de metilación con una secuencia en el ADN

35 mitocondrial que comprende un sitio de metilación seleccionado del grupo formado por:

- (i) los sitios CpG de la región D-loop mostrados en la Tabla 1,

- (ii) los sitios CpG del gen ND1 mostrados en la Tabla 2,
- (iii) los sitios CHG de la región D-loop mostrados en la Tabla 3,
- (iv) los sitios CHG del gen ND1 mostrados en la Tabla 4, y/o
- (v) los sitios CHH de la región D-loop mostrados en la Tabla 5

5

Los términos “sitio CpG”, sitio CHG”, “sitio CHH”, “región D-loop” y “gen ND1” se han descrito en detalle en el contexto del primer método de la invención y el término “capaz de hibridar de forma específica” se ha definido en el contexto de los polinucleótidos de la invención. Dichos términos se utilizan con el mismo significado en el contexto de los kits de

10

En una forma de realización preferida, los oligonucleótidos que forman parte del kit de la invención y que son capaces de hibridar específicamente y de forma dependiente de metilación con una secuencia en el ADN mitocondrial que comprende un sitio de metilación

15

seleccionado del grupo formado por

- (i) los sitios CpG de la región D-loop mostrados en la Tabla 1,
- (ii) los sitios CpG del gen ND1 mostrados en la Tabla 2,
- (iii) los sitios CHG de la región D-loop mostrados en la Tabla 3,
- (iv) los sitios CHG del gen ND1 mostrados en la Tabla 4, y/o
- (v) los sitios CHH de la región D-loop mostrados en la Tabla 5

20

constituyen al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% o al menos el 100% de la cantidad total de los oligonucleótidos que forman el kit. En formas de realización adicionales, dichos oligonucleótidos constituyen al menos el 55% al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99% de la cantidad total de oligonucleótidos que forman el kit.

25

Kits adecuados incluyen diversos reactivos para uso de acuerdo con la presente invención, en contenedores adecuados y materiales de embalaje, incluidos tubos, viales, y paquetes retractilados y moldeados por soplado. Además, los kits de la invención pueden contener instrucciones para el uso simultáneo, secuencial o separado de los distintos componentes que se encuentran en el kit. Dichas instrucciones pueden estar en la forma de material impreso o en la forma de un soporte electrónico capaz de almacenar instrucciones de

35

manera que puedan ser leídos por un sujeto, tales como medios de almacenamiento electrónico (discos magnéticos, cintas y similares), medios ópticos (CD-ROM, DVD) y

similares. Adicionalmente o alternativamente, los medios pueden contener las direcciones de Internet que proporcionan dichas instrucciones.

5 Materiales adecuados para su inclusión en un ejemplar de kit de acuerdo con la presente invención comprenden uno o más de los siguientes: reactivos capaces de amplificar una secuencia específica de un dominio ya sea ADN total o ADNmt sin la necesidad de realizar la PCR; reactivos requeridos para discriminar entre los diversos alelos posibles en los dominios de secuencia amplificados por PCR o amplificación no-PCR (p. ej., endonucleasas de restricción, oligonucleótidos que hibridan preferentemente sitios CpG, CHG y/o CHH
10 metilados o no metilados, incluyendo aquellos modificados para contener enzimas o grupos químicos fluorescentes que amplifican la señal del oligonucleótido y hacen que la discriminación entre sitios CpG, CHG y/o CHH metilados o no metilados sea más robusto); o reactivos requeridos para separar físicamente productos derivados de las diversas regiones amplificadas (por ejemplo, agarosa o poliacrilamida y un tampón para ser utilizado en
15 electroforesis, columnas de HPLC, geles SSCP, geles de formamida o un soporte de matriz para MALDI-TOF).

El término "oligonucleótido", como se usa aquí, se refiere a una molécula de ADN o ARN corta de cadena simple, con hasta 50 bases de longitud. Los oligonucleótidos de la
20 invención son preferiblemente moléculas de ADN de al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 45 o 50 bases de longitud.

Tal como se usa en el kit de la invención, al menos un oligonucleótido capaz de hibridar con
25 al menos una secuencia de un sitio CpG de la región D-loop seleccionado de los sitios CpG mostrados en la Tabla 1, al menos un oligonucleótido capaz de hibridar con al menos una secuencia de un sitio CpG del gen ND1 mostrados en la Tabla 2, al menos un oligonucleótido capaz de hibridar con al menos una secuencia de un sitio CHG de la región D-loop mostrados en la Tabla 3, al menos un oligonucleótido capaz de hibridar con al menos
30 una secuencia de un sitio CHG del gen ND1 mostrados en la Tabla 4 y/o al menos un oligonucleótido capaz de hibridar con al menos una secuencia de un sitio CHH de la región D-loop mostrados en la Tabla 5, de manera específica de metilación, se usa como un cebador para amplificar la región que contiene dichos sitio(s) CpG, CHG y/o CHH. Alternativamente, dicho al menos un oligonucleótido también se puede utilizar como una
35 sonda para detectar dichos sitio(s) CpG, CHG y/o CHH metilados o no metilados.

En una realización preferida el primer kit de la invención comprende oligonucleótidos capaces de hibridar específicamente con todos los sitios CpG de la región D-loop mostrados en la Tabla 1, con todos los sitios CpG del gen ND1 mostrados en la Tabla 2, con todos los sitios CHG de la región D-loop mostrados en la Tabla 3, con todos los sitios CHG del gen ND1 mostrados en la Tabla 4 y/o con todos los sitios CHH de la región D-loop mostrados en la Tabla 5.

Si se desea, el primer kit de la invención puede comprender un primer oligonucleótido capaz de hibridar específicamente con un oligonucleótido tratado con bisulfito que comprende al menos una secuencia de un sitio CpG de la región D-loop mostrado en la Tabla 1 cuando dicho sitio CpG está metilado, y al menos un oligonucleótido o polinucleótido capaz de hibridar específicamente con el mismo oligonucleótido tratado con bisulfito que comprende al menos una secuencia de un sitio CpG de la región D-loop cuando dicho sitio CpG no está metilado; y/o el kit puede comprender un primer oligonucleótido capaz de hibridar específicamente con un oligonucleótido tratado con bisulfito que comprende al menos una secuencia de un sitio CpG del gen ND1 mostrado en la Tabla 2 cuando dicho sitio CpG está metilado, y al menos un oligonucleótido o polinucleótido capaz de hibridar específicamente con el mismo oligonucleótido tratado con bisulfito que comprende al menos una secuencia de un sitio CpG de la región D-loop cuando dicho sitio CpG no está metilado; y/o el kit puede comprender un primer oligonucleótido capaz de hibridar específicamente con un oligonucleótido tratado con bisulfito que comprende al menos una secuencia de un sitio CHG de la región D-loop mostrado en la Tabla 3 cuando dicho sitio CHG está metilado, y al menos un oligonucleótido o polinucleótido capaz de hibridar específicamente con el mismo oligonucleótido tratado con bisulfito que comprende al menos una secuencia de un sitio CHG de la región D-loop cuando dicho sitio CHG no está metilado; y/o el kit puede comprender un primer oligonucleótido capaz de hibridar específicamente con un oligonucleótido tratado con bisulfito que comprende al menos una secuencia de un sitio CHG del gen ND1 mostrado en la Tabla 4 cuando dicho sitio CHG está metilado, y al menos un oligonucleótido o polinucleótido capaz de hibridar específicamente con el mismo oligonucleótido tratado con bisulfito que comprende al menos una secuencia de un sitio CHG de la región D-loop cuando dicho sitio CHG no está metilado; y/o el kit puede comprender un primer oligonucleótido capaz de hibridar específicamente con un oligonucleótido tratado con bisulfito que comprende al menos una secuencia de un sitio CHH de la región D-loop mostrado en la Tabla 5 cuando dicho sitio CHH está metilado y al menos un oligonucleótido o polinucleótido capaz de hibridar específicamente con el mismo

oligonucleótido tratado con bisulfito que comprende al menos una secuencia de un sitio CHH de la región D-loop cuando dicho sitio CHH no está metilado.

Para la hibridación a un sitio CpG no metilado, los cebadores específicos que hibridan con el ADN no metilado tienen, preferiblemente, una T en el par CG en 3' para distinguirla de la C retenida en el ADN metilado. Es preferible que los cebadores contengan relativamente pocas Cs o Gs en la secuencia ya que las Cs estarán ausentes en el cebador sentido y las Gs ausentes en el cebador antisentido (citosina se convierte en uracilo, que se amplifica como timidina en el producto de amplificación). En consecuencia, para la hibridación a un sitio CpG metilado, los cebadores que hibridan específicamente con el ADN metilado tienen preferiblemente una C en el extremo 3' del par CG.

En otro aspecto, la invención se refiere a un kit (de aquí en adelante "segundo kit de la invención"), que comprende al menos un oligonucleótido capaz de hibridar específicamente con una zona en posición 5' o en posición 3' con respecto a un sitio de metilación en el ADN mitocondrial seleccionado del grupo formado por:

- (i) los sitios CpG de la región D-loop mostrados en la Tabla 1,
- (ii) los sitios CpG del gen ND1 mostrados en la Tabla 2,
- (iii) los sitios CHG de la región D-loop mostrados en la Tabla 3,
- (iv) los sitios CHG del gen ND1 mostrados en la Tabla 4, y/o
- (v) los sitios CHH de la región D-loop mostrados en la Tabla 5

en donde la citosina metilada en dicha posición se ha convertido a uracilo o a otra base que es distinguible de citosina en sus propiedades de hibridación.

En una forma de realización preferida, los oligonucleótidos que forman parte del kit de la invención y que son capaces de hibridar específicamente con una zona en posición 5' o en posición 3' con respecto a un sitio de metilación en el ADN mitocondrial seleccionado del grupo formado por

- (i) los sitios CpG de la región D-loop mostrados en la Tabla 1,
- (ii) los sitios CpG del gen ND1 mostrados en la Tabla 2,
- (iii) los sitios CHG de la región D-loop mostrados en la Tabla 3,
- (iv) los sitios CHG del gen ND1 mostrados en la Tabla 4, y/o
- (v) los sitios CHH de la región D-loop mostrados en la Tabla 5

constituyen al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% o al menos el 100% de la cantidad total de los oligonucleótidos que forman el kit. En formas de realización

adicionales, dichos oligonucleótidos constituyen al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99% de la cantidad total de oligonucleótidos que forman el kit.

5

En una realización particular, el segundo kit de la invención comprende además, uno o más reactivos para convertir una citosina no metilada en uracilo o en otra base que es detectable diferencialmente a la citosina en términos de propiedades de hibridación. En una realización preferida, el uno o más reactivos para convertir una citosina no metilada en uracilo o en otra base que es detectablemente diferente a la citosina en términos de propiedades de hibridación es un bisulfito, preferiblemente bisulfito sódico. En otra realización, el reactivo capaz de convertir una citosina no metilada en uracilo o en otra base que es detectable diferencialmente a la citosina en términos de propiedades de hibridación es metabisulfito, preferiblemente metabisulfito sódico.

10

15

El término "conversión de reactivo" y sus detalles se han descrito en detalle en el contexto del método de diagnóstico de la invención y se utilizan con el mismo significado en el contexto del kit de acuerdo con la invención.

20

En una realización particular, el segundo kit de la invención comprende al menos un oligonucleótido que comprende una secuencia seleccionada de las secuencias mostradas en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y/o SEQ ID NO: 5.

25

En otro aspecto, la invención se refiere al uso del primer y/o segundo kit de la invención para determinar el patrón de ADN mitocondrial en un sujeto o para determinar el diagnóstico de una enfermedad neurodegenerativa en un sujeto seleccionada de la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson.

30

La invención se describe por medio de los siguientes ejemplos que se han de interpretarse como meramente ilustrativas y no limitativas del alcance de la invención

EJEMPLOS

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del estudio y sujetos incluidos

El estudio se llevó a cabo en 44 muestras, incluyendo patología relacionada con enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedad de Parkinson (EP) y casos control. Las muestras fueron procesadas en una placa dividida en dos carriles. En el carril 1 se analizaron los amplicones D-Loop y ND1 en muestras de corteza entorrinal de casos de patología relacionada con EA y sus controles correspondientes (Tabla 7). En el carril 2 se analizaron los amplicones D-Loop en muestras de sustancia negra de EP y sus controles correspondientes (Tabla 7). Cada paciente fue identificado en los cebadores utilizados con un MID (*Multiplex Identifier*) (Tablas 7 y 8). La metilación en sitios CpG y no CpG (CHG y CHH, donde H = A, T, o C) se analizó utilizando un pirosecuenciador 454 GS FLX Titanium de Roche que generó 569,684 secuencias en el carril 1, cuyas longitudes variaban desde 40 hasta 1098 pares de bases (pb) con una longitud media de unos 417 pb. En el carril 2 el número de secuencias obtenidas fue de 513,579, cuya longitud variaba desde 40 hasta 933 pb (longitud media de 466 pb). Los alineamientos de las secuencias obtenidas para cada MID, amplicón y carril frente a sus respectivas secuencias de referencia fueron anotados y los porcentajes de identidad entre éstas estaban cerca del 100 %. La media y mediana de las tasas de conversión de bisulfito para cada locus y MID fueron analizadas.

El número de secuencias no metiladas fue superior al número de secuencias metiladas en cada sitio identificado y unos pocos sitios de metilación no estaban presentes. Aquellas secuencias que después del alineamiento se observó que tenían, como mínimo, un sitio del patrón de metilación no presente, fueron eliminadas del análisis para evitar cualquier sesgo en el momento de la cuantificación. Esta aproximación elude el análisis de los pseudogenes mitocondriales putativos cuyos amplicones presentan casi un 100% de identidad con el ADN mitocondrial cuando se analizan en NCBI BLAST. La mayoría de sitios CpG, CHG, y CHH analizados estaban no metilados. Sin embargo, se pudieron identificar distintos sitios con metilación diferencial (Tabla 6).

Carril	Amplicón	Sitio	Criterio	Nº de sitios	C vs EAI-II	C vs EAIII-IV	EA I-II vs EA III-IV	C vs EP
L1	Dloop	CG	FDR<0.01	18	17	14	12	-
L1	Dloop	CG	FDR<0.05	18	17	15	16	-
L1	ND1	CG	FDR<0.01	13	7	7	0	-
L1	ND1	CG	FDR<0.05	13	7	7	0	-
L1	Dloop	CHG	FDR<0.01	16	13	10	1	-
L1	Dloop	CHG	FDR<0.05	16	14	12	7	-
L1	ND1	CHG	FDR<0.01	9	6	5	0	-
L1	ND1	CHG	FDR<0.05	9	7	5	0	-
L1	Dloop	CHH	FDR<0.01	52	0	0	34	-
L1	Dloop	CHH	FDR<0.05	52	23	0	43	-
L1	ND1	CHH	FDR<0.01	72	0	0	0	-

L1	ND1	CHH	FDR<0.05	72	0	0	0	-
L2	Dloop	CG	FDR<0.01	18	-	-	-	17
L2	Dloop	CG	FDR<0.05	18	-	-	-	17
L2	Dloop	CHG	FDR<0.01	16	-	-	-	14
L2	Dloop	CHG	FDR<0.05	16	-	-	-	14
L2	Dloop	CHH	FDR<0.01	52	-	-	-	44
L2	Dloop	CHH	FDR<0.05	52	-	-	-	44

Tabla 6: Número de sitios diferencialmente metilados. FRD: p-valor ajustado con el método de Benjamini y Hocheberg (1995), C: control, EA: enfermedad de Alzheimer, EP: enfermedad de Parkinson.

MID	Carril	Región cerebral	Diagnóstico	Estado de Braak para EA	Estado de Braak para EP	Género	Edad	Tiempo postmortem (h)
1	L1	entorrinal	CONTROL	0/0	0	H	56	5
2	L1	entorrinal	CONTROL	0/0	0	H	56	3.45
3	L1	entorrinal	CONTROL	0/0	0	M	55	8.3
4	L1	entorrinal	CONTROL	0/0	0	M	66	4.15
5	L1	entorrinal	CONTROL	0/0	0	M	64	5
6	L1	entorrinal	CONTROL	0/0	0	M	52	5.45
7	L1	entorrinal	CONTROL	0/0	0	H	57	5.20
8	L1	entorrinal	CONTROL	0/0	0	H	64	3.3
9	L1	entorrinal	EA asociada	I / A	0	M	57	5
10	L1	entorrinal	EA asociada	I / A	0	M	64	2.15
11	L1	entorrinal	EA asociada	I	0	H	59	16.3
12	L1	entorrinal	EA asociada	II / A	0	M	86	4.15
13	L1	entorrinal	EA asociada	I / A	0	H	67	14.4
14	L1	entorrinal	EA asociada	II / A	0	H	66	4.55
15	L1	entorrinal	EA asociada	I / A	0	M	63	8.05
16	L1	entorrinal	EA asociada	II / A	0	M	76	5.45
17	L1	entorrinal	EA asociada	III / A	0	M	71	6.45
18	L1	entorrinal	EA asociada	III/A	0	M	77	11.5
19	L1	entorrinal	EA asociada	III/B	0	H	86	3.1
20	L1	entorrinal	EA asociada	IV/C	0	M	69	8.1
9	L1	entorrinal	EA asociada	I / A	0	M	57	5
10	L1	entorrinal	EA asociada	I / A	0	M	64	2.15
11	L1	entorrinal	EA asociada	I	0	H	59	16.3
12	L1	entorrinal	EA asociada	II / A	0	M	86	4.15
21	L1	entorrinal	EA asociada	III	0	M	79	3.4
22	L1	entorrinal	EA asociada	IV / C	0	H	75	6.1
23	L1	entorrinal	EA asociada	III / A	0	M	74	4
24	L1	entorrinal	EA asociada	III / 0	0	H	87	3.3
1	L2	SN	CONTROL	0/0	0	M	78	3.4
2	L2	SN	CONTROL	0/0	0	H	66	3
3	L2	SN	CONTROL	0/0	0	M	71	8.3

MID	Carril	Región cerebral	Diagnóstico	Estadio de Braak para EA	Estadio de Braak para EP	Género	Edad	Tiempo postmortem (h)
4	L2	SN	CONTROL	0/0	0	H	30	4.1
5	L2	SN	CONTROL	0/0	0	H	47	5
6	L2	SN	CONTROL	0/0	0	H	67	5
7	L2	SN	CONTROL	0/0	0	H	39	9.15
8	L2	SN	CONTROL	0/0	0	H	85	5.45
9	L2	SN	CONTROL	0/0	0	M	46	9.35
10	L2	SN	CONTROL	0/0	0	M	77	3.15
11	L2	SN	EP	0/0	3.4	H	68	9.2
12	L2	SN	EP	0/0	3.4	M	81	6.3
13	L2	SN	EP	0/0	3.4	H	76	12.3
14	L2	SN	EP	0/0	3.4	M	77	3.3
15	L2	SN	EP	0/0	3.4	M	78	27.3
16	L2	SN	EP	0/0	3.4	M	69	4.3
5	L2	SN	CONTROL	0/0	0	H	47	5
6	L2	SN	CONTROL	0/0	0	H	67	5
7	L2	SN	CONTROL	0/0	0	H	39	9.15
8	L2	SN	CONTROL	0/0	0	H	85	5.45
9	L2	SN	CONTROL	0/0	0	M	46	9.35
10	L2	SN	CONTROL	0/0	0	M	77	3.15
11	L2	SN	EP	0/0	3.4	H	68	9.2
12	L2	SN	EP	0/0	3.4	M	81	6.3
13	L2	SN	EP	0/0	3.4	H	76	12.3
14	L2	SN	EP	0/0	3.4	M	77	3.3
15	L2	SN	EP	0/0	3.4	M	78	27.3
16	L2	SN	EP	0/0	3.4	M	69	4.3
17	L2	SN	EP	1/0	4	H	69	6
18	L2	SN	EP	0/0	4	M	84	4.3
19	L2	SN	EP	0/0	5	H	76	12
20	L2	SN	EP	0/0	5	H	80	7.3

Tabla 7: Resumen de las principales características clínicas y neuropatológicas de los casos humanos analizados. Los estadios de Braak para la enfermedad de Alzheimer (EA) indican el grado de presencia de neuronas con neurodegeneración fibrilar (números romanos) y placas seniles (letras) siguiendo la clasificación de Braak. Los estadios de Braak para la enfermedad de Parkinson (EP) hacen referencia al grado de presencia de la proteína α -sinucleína (Lewy bodies).

Número MID	Secuencia MID	SEQ ID NO
1	ACGAGTGCGT	6
2	ACGCTCGACA	7
3	AGACGCACTC	8
4	AGCACTGTAG	9
5	ATCAGACACG	10
6	ATATCGCGAG	11
7	CGTGTCTCTA	12
8	CTCGCGTGTC	13
9	TAGTATCAGC	14
10	TCTCTATGCG	15
11	TGATACGTCT	16
12	TACTGAGCTA	17
13	CATAGTAGTG	18
14	CGAGAGATAC	19
15	ATACGACGTA	20
16	TCACGTACTA	21
17	CGTCTAGTAC	22
18	TCTACGTAGC	23
19	TGTACTACTC	24
20	ACGACTACAG	25
21	CGTAGACTAG	26
22	TACGAGTATG	27
23	TACTCTCGTG	28
24	TAGAGACGAG	29

Tabla 8: secuencia MID asociados a cada caso analizado

Muestras de cerebro humano

Las muestras de tejido fueron cedidas por el Banco de Tejido Neurológico, Universidad de Barcelona – Hospital Clínico de Barcelona y el Banco del Instituto de Neuropatología, HUB-ICO-IDIBELL. La donación y obtención de las muestras fue regulada por el comité ético de ambas instituciones. La mitad de cada cerebro fue mantenida en solución tamponada en 4% formalina para el estudio morfológico e histológico, mientras que la otra mitad fue procesada en secciones coronales para congelar a -80C para estar disponible para estudios bioquímicos. El examen neuropatológico en todos los casos controles y patológicos se llevó a cabo en treinta secciones estandarizadas del cerebro, cerebelo y tronco encefálico, los

cuales fueron teñidos con hematoxilina y eosina, y Klüver Barrera, o procesadas para inmunohistoquímica para la proteína ácida glial fibrilar, marcadores microgliales, β -amiloide, tau fosforilada (anticuerpo AT8), α -sinucleína, α B-cristalina, ubiquitina y TDP- 43. Los casos con patología relacionada con EA y EP fueron clasificados de acuerdo con los criterios neuropatológicos actuales (Braak y Braak 1991, 1999; Braak et al, 2003, 2006). Los casos con patología mixta (incluyendo lesiones vasculares) fueron excluidos de este estudio. Los cerebros usados como control pertenecieron a individuos sin manifestaciones neurológicas y sin lesiones en el estudio neuropatológico. Las historias clínicas fueron reexaminadas para cada caso, y los casos con patología relacionada con la EA (estadios I-IV) fueron reevaluados mediante llamadas telefónicas o entrevistas con familiares, preguntando si tenían constancia de algún impedimento neurológico o cognitivo. Sólo los casos que cumplían estos criterios fueron considerados en el presente trabajo. Todos los casos analizados se resumen en la Tabla 7.

El intervalo promedio post-mortem de las muestras de corteza entorrinal fue de $4,98 \pm 1,57$ horas en los controles, $7,51 \pm 5,13$ horas en estadios I-II, y $5,70 \pm 2,85$ horas en estadios III-IV; para las muestras de la sustancia negra los intervalos fueron $5,59 \pm 2,46$ horas en los controles y $9,23 \pm 7,07$ horas en los casos de EP.

Extracción de ADN total

El ADN total fue aislado de la corteza entorrinal y la sustancia negra (Tabla 7) utilizando el *kit DNeasy Blood and Tissue Kit* (Qiagen, Madrid, España) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tratamiento con bisulfito

Trescientos nanogramos de ADN fueron tratados con bisulfito usando el *kit EZ DNA Methylation Kit* (Zymo Research, Ecogen, Barcelona, España) siguiendo las instrucciones del proveedor. El ADN tratado con bisulfito se resuspendió en 30 μ l para llegar a una concentración final de 10ng/ μ l. Todas las muestras fueron tratadas con bisulfito en paralelo, utilizando el mismo lote de reactivo para evitar diferencias en la tasa de conversión de bisulfito entre diferentes lotes comerciales.

Diseño de los cebadores para FLX de los amplicones D-Loop, y ND1

Los cebadores para el experimento FLX fueron diseñados siguiendo las instrucciones técnicas para el secuenciador FLX de Roche “*Amplicon Fusion Primer Design Guidelines for GS FLX Titanium Series Lib-A Chemistry*”. Los cebadores de fusión para los amplicones

5 contenían un cebador direccional GS FLX Titanium cebador A o cebador B (incluyendo una
 secuencia clave (*Key*) de cuatro bases) en la porción 5'-prima del oligonucleótido, además
 una secuencia específica para el molde en el 3'-final primera. Por otra parte, se añadió una
 secuencia MID (*Multiplex Identifier*) entre el cebador A (o cebador B) y la secuencia
 10 específica para la posterior identificación automatizada de las muestras con el software
 después de los pasos de agrupación/multiplexado y secuenciación. Los cebadores
 utilizados contenían los siguientes componentes: Cebador *forward* (Primer A -Key -MID -
 secuencia específica del molde), 5'- CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA (SEQ ID NO: 33) -
 TCAG -MID – secuencia específica del molde -3'; Cebador *reverse* (Cebador B- Key-MID -
 15 secuencia específica del molde): 5'- CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC (SEQ ID NO: 34)-
 TCAG -MID – secuencia específica molde -3'. Las secuencias específicas de molde para
 cada uno de los amplicones: D- Loop- directo, 5' - TAGGGGTTTTTTGATTATTATTTTT -3'
 (SEQ ID NO: 2) y D- Loop -reverso, 5'- ACAAACATTCAATTATTATTATTATATCCT -3'
 (SEQ ID NO: 3); ND1 - directo, 5' - ATGGTTAATTTTTTATTTTTTATTGTATTT -3' (SEQ ID
 20 NO: 4) y ND1 -reverso, 5'- TAATTTAAATTTAATACTCACCTAATCAA -3' (SEQ ID NO: 5).
 Los cebadores utilizados en este estudio fueron diseñados evitando sitios CpG. La
 secuencia específica de los MID para cada paciente se indica en la Tabla 8. Regiones
 amplificadas (D-Loop: 16386-256; ND1: 3313-3686) se basan en la posición de nucleótidos
 del mapa del ADN mitocondrial humano (www.mitomap.org).

20 Preparación de la librería de Amplicones

Las PCR para los amplicones D-Loop y ND1 se realizaron siguiendo el manual *Amplicon
 Library Preparation Method Manual (GS FLX Titanium Series)* de Roche. Para las PCRs se
 utilizaron veinte nanogramos de ADN total tratado con bisulfito. La amplificación del ADN
 tratado bisulfito se llevó a cabo en un volumen de reacción de 25µl. Cada reacción de PCR
 25 consistió en: 1x de FastStart 10x Buffer #2, 0,05U/µl de polimerasa *FastStart HiFi
 Polymerase* (Roche), 200 nM de cada dNTP, y 200 nM de cada cebador concreto *forward* y
reverse. Los cebadores se sintetizaron con una calidad de purificación HPLC (Sigma -
 Aldrich, Madrid, España). Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador
Applied Biosystems Verity® (*Applied Biosystems*, Madrid, España) usando las siguientes
 30 condiciones: 94°C durante 3 min y luego 36 ciclos de 94 ° C durante 15s, temperatura
 anillamiento (61°C ND1, y 62°C D-Loop) durante 45s y 72°C durante 1 min, seguido por un
 paso de extensión final a 72°C durante 8 min y una temperatura final de mantenimiento a
 4°C. Dos microlitros de cada producto de PCR se comprobaron en un gel de agarosa del
 1,5 % teñido con SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Madrid, España).

Purificación de las PCR

La purificación de los productos de PCR se llevó a cabo utilizando el *kit* Agencourt®AMPure®XP PCR Purification (Beckman Coulter, Madrid, España) siguiendo las indicaciones del manual de Roche *Amplicon Library Preparation Method Manual (GS FLX Titanium Series)*.

Cuantificación de las Librerías de amplicones y secuenciación FLX

La cuantificación y los controles de calidad de las bibliotecas de amplicones y el resto del protocolo de secuenciación FLX fue realizado por el equipo de la Plataforma de Genómica del Instituto de Recerca de Vall d'Hebron (VHIR, Barcelona, España).

Selección de los sitios diferencialmente metilados

El alineamiento y la identificación de los sitios CpG, CHG, y CHH y las tasas de conversión de bisulfito se realizaron con el software BIQ Analyzer HT (Lutsik et al, 2011). El control de calidad de los datos crudos y todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el lenguaje estadístico R y el software bioconductor, <http://www.bioconductor.org>.

La selección de los sitios diferencialmente metilados se basó en el cálculo del test estadístico Fisher's Exact Test, considerando diferencialmente metilados esos sitios con un p-valor ajustado con el método de Benjamini y Hochberg (1995) por debajo de 0,05. El β -value representado en los gráficos *Heatmaps* es la relación las secuencias metiladas respecto a la suma global de secuencias metiladas y no metiladas por sitio (Du et al., 2010, BMC Bioinformatics, 30;11:587), es decir $\beta_{i,j} = M / (M+U)$ donde M es el número de secuencias metiladas en el sitio (i) y MID (j), y U es el número de secuencias no-metiladas en el sitio (i) y MID (j).

Ejemplo 1: La metilación del ADN está incrementada en la región D-Loop y reducida en el gen ND1 en casos con estadios tempranos de patología relacionada con EA

Se observó un incremento de metilación en sitios CpG y no CpG (CHG y CHH) en la región D-Loop en los casos con patología relacionada con EA de estadios I/II y III/IV de Braak (Fig. 1). El grado de metilación fue superior en los casos de patología relacionada con EA con respecto a las muestras control, y superior en estadios I/II frente a estadios III/IV, tal y como se representa en los gráficos log2(OR) (Fig. 2). Sin embargo, no se encontraron diferencias en la metilación de sitios CHH entre los controles y los casos con patología relacionada con EA en las etapas III/IV.

El análisis de ND1 reveló la presencia de algunos sitios CpG y CHG menos metilados en los casos con patología relacionada con EA en estadios I/II y III/IV respecto a las muestras control ($\log_2 [O] > 0$, Fig. 3). No se encontraron diferencias para los sitios CHH.

Ejemplo 2: La metilación del ADN está reducida en la región D-Loop en la sustancia negra de casos con EP.

En contraste con lo observado en la corteza entorrinal en EA, la región D-Loop mostró una pérdida de metilación en casi todos los sitios CpG y no CpG en la sustancia negra de los casos con EP con respecto a las muestras control (Fig. 3). Sin embargo, como en la EA, el porcentaje de metilación del ADN representa una pequeña parte del total del ADN mitocondrial.

Ejemplo 3: La presencia de la posición polimórfica 16519 en el ADN mitocondrial está asociada con el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer.

Los resultados mostrados en la Tabla 9 ponen de manifiesto que la presencia del polimorfismo T16519C está asociada a la enfermedad de Alzheimer. Dichos resultados se obtuvieron mediante secuenciación convencional y aplicando un test de Chi cuadrado.

Tipo de muestra (número de muestras analizadas)	Presencia del polimorfismo T16519C (%)	p-value
Controles (n=46)	56,5	-
EA I/II (n=47)	76,6	0,02
EA III/IV (n=47)	74,4	0,03
EA V/VI (n=46)	76,1	0,02

Tabla 9: Presencia del polimorfismo en muestras obtenidas de individuos controles y de individuos que padecen la enfermedad de Alzheimer (EA) en distintos estadios (números romanos).

Se observó la presencia de heteroplasmia en algunos casos y se realizó de nuevo el genotipado de las muestras mediante el empleo de la técnica PCR-RFLP. La presencia del alelo C genera una diana de restricción para el enzima de restricción HaeIII. Se llevó a cabo la amplificación de la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 30 empleando oligonucleótidos con secuencias SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO: 32.

Se obtuvieron los siguientes patrones de bandas en función del genotipo:

Genotipo T: 183 pb, 318 pb

Genotipo C: 61 pb, 183 pb, 257 pb

Heteroplasma: 61 pb, 183 pb, 257 pb, 319 pb.

TRADUCCIÓN DE TÉRMINOS AL INGLÉS

5 El termino "DNA" significa "ADN".

El termino "Artificial Sequence" significa "Secuencia Artificial".

El termino "misc_feature" significa "característica miscelánea".

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para diagnosticar o para determinar el riesgo de desarrollar una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson en un sujeto que comprende determinar en una muestra de dicho sujeto que comprende ADN mitocondrial el patrón de metilación en la región D-loop y/o en el gen ND1, en donde el patrón de metilación se determina en al menos un sitio seleccionado del grupo formado por:

- (i) los sitios CpG de la región D-loop mostrados en la Tabla 1,
- (ii) los sitios CpG del gen ND1 mostrados en la Tabla 2;
- (iii) los sitios CHG de la región D-loop mostrados en la Tabla 3,
- (iv) los sitios CHG del gen ND1 mostrados en la Tabla 4, y/o
- (v) los sitios CHH de la región D-loop mostrados en la Tabla 5

en donde una hipermetilación en al menos uno de dichos sitios CpG de la región D-loop, una hipermetilación en al menos uno de dichos sitios CHG de la región D-loop, una hipermetilación en al menos uno de dichos sitios CHH de la región D-loop, una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CpG del gen ND1 y/o una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CHG en el gen ND1 es indicativo de que el sujeto sufre de la enfermedad de Alzheimer o de que el sujeto tiene un riesgo elevado de desarrollar la enfermedad de Alzheimer o

en donde una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CpG de la región D-loop, una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CHG de la región D-loop y/o una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CHH de la región D-loop es indicativo de que el sujeto sufre de la enfermedad de Parkinson o de que el sujeto tiene un riesgo elevado de desarrollar la enfermedad de Parkinson.

2. El método según la reivindicación 1, en donde una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CpG de la región D-loop o una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CHG de la región D-loop con respecto al patrón de metilación en un sujeto en estadio I-II de la enfermedad de Alzheimer es indicativo de que el sujeto sufre de la enfermedad de Alzheimer en estadio III-IV.

3. Método *in vitro* para seleccionar un sujeto para someterlo a un tratamiento preventivo de una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de la enfermedad de Alzheimer y la

enfermedad de Parkinson en un sujeto que comprende determinar en una muestra de dicho sujeto que comprende ADN mitocondrial el patrón de metilación en la región D-loop y/o en el gen ND1, en donde el patrón de metilación se determina en al menos un sitio seleccionado del grupo formado por:

- 5 (i) los sitios CpG de la región D-loop mostrados en la Tabla 1,
- (ii) los sitios CpG del gen ND1 mostrados en la Tabla 2;
- (iii) los sitios CHG de la región D-loop mostrados en la Tabla 3,
- (iv) los sitios CHG del gen ND1 mostrados en la Tabla 4, y/o
- (v) los sitios CHH de la región D-loop mostrados en la Tabla 5

10 en donde una hipermetilación en al menos uno de dichos sitios CpG de la región D-loop, una hipermetilación en al menos uno de dichos sitios CHG de la región D-loop, una hipermetilación en al menos uno de dichos sitios CHH de la región D-loop, una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CpG del gen ND1 y/o una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CHG en el gen ND1 es indicativo de que el sujeto es

15 candidato a recibir un tratamiento dirigido a prevenir la enfermedad de Alzheimer o en donde una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CpG de la región D-loop, una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CHG de la región D-loop y/o una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CHH de la región D-loop es indicativo de que el sujeto es candidato a recibir un tratamiento dirigido a prevenir la enfermedad de

20 Parkinson.

4. Método para monitorizar la progresión de una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson en un sujeto que comprende:

- 25 a) determinar en una muestra de dicho sujeto que comprende ADN mitocondrial el patrón de metilación en la región D-loop, y/o en el gen ND1, en donde el patrón de metilación se determina en al menos un sitio seleccionado del grupo formado por:
 - (i) los sitios CpG de la región D-loop mostrados en la Tabla 1,
 - (ii) los sitios CpG del gen ND1 mostrados en la Tabla 2;
 - 30 (iii) los sitios CHG de la región D-loop mostrados en la Tabla 3,
 - (iv) los sitios CHG del gen ND1 mostrados en la Tabla 4, y/o
 - (v) los sitios CHH de la región D-loop mostrados en la Tabla 5
- b) comparar el patrón de metilación determinado en la etapa a) con dicho patrón de metilación obtenido en un estadio anterior de la enfermedad,

en donde una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CpG de la región D-loop, una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CHG de la región D-loop, una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CHH de la región D-loop, una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CpG del gen ND1 y/o una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CHG en el gen ND1 con respecto dicho patrón de metilación determinado en un estadio anterior de la enfermedad, es indicativo del avance de la enfermedad de Alzheimer; y

en donde una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CpG de la región D-loop, una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CHG de la región D-loop y/o una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CHH de la región D-loop con respecto a dicho patrón de metilación determinado en un estadio anterior de la enfermedad es indicativo del avance de la enfermedad de Parkinson.

5. El método según las reivindicaciones 1 a 4 en donde la determinación del patrón de metilación comprende la determinación de la metilación de todos los sitios CpG de la región D-loop mostrados en la Tabla 1.

6. El método según las reivindicaciones 1 a 5, en donde la determinación del patrón de metilación comprende la determinación de la metilación todos los sitios CpG del gen ND1 mostrados en la Tabla 2.

7. El método según las reivindicaciones 1 a 6 en donde la determinación del patrón de metilación comprende la determinación de la metilación de todos los sitios CHG de la región D-loop mostrados en la Tabla 3.

8. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en donde la determinación del patrón de metilación comprende la determinación del patrón de metilación de todos los sitios CHG del gen ND1 mostrados en la Tabla 4.

9. El método según las reivindicaciones 1 a 8 en donde en donde la determinación del patrón de metilación comprende la determinación de la metilación de todos los sitios CHH de la región D-loop mostrados en la Tabla 5.

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el patrón de metilación se determina por una técnica seleccionada del grupo que consiste en PCR específica de

metilación, secuenciación por bisulfito, técnicas basadas en restricción-digestión, pirosecuenciación, ensayo de ChIP-on chip, conversión diferencial, restricción diferencial y peso diferencial de los sitio(s) metilados.

- 5 11. Método según la reivindicación 10, en donde el patrón de metilación se determina mediante pirosecuenciación.
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en donde la muestra que comprende ADN mitocondrial se selecciona de un biofluido o una biopsia de un tejido sólido.
- 10 13. Método según la reivindicación 12, en donde dicho biofluido se selecciona de sangre periférica o líquido cefalorraquídeo.
14. Método según la reivindicación 13, en donde dicho tejido sólido es tejido cerebral.
- 15 15. Un ácido nucleico seleccionado del grupo formado por:
 - (i) un ácido nucleico que comprende al menos 9 nucleótidos contiguos de una región del ADN mitocondrial en donde dicha región comprende al menos un sitio de metilación seleccionado del grupo formado por:
 - 20 a) los sitios CpG de la región D-loop mostrados en la Tabla 1,
 - b) los sitios CpG del gen ND1 mostrados en la Tabla 2;
 - c) los sitios CHG de la región D-loop mostrados en la Tabla 3,
 - d) los sitios CHG del gen ND1 mostrados en la Tabla 4, y
 - 25 e) los sitios CHH de la región D-loop mostrados en la Tabla 5,
 - (ii) un ácido nucleico que comprende al menos 9 nucleótidos contiguos de una región de ADN mitocondrial en donde dicha región comprende al menos un sitio de metilación seleccionado del grupo formado por:
 - 30 a) los sitios CpG de la región D-loop mostrados en la Tabla 1,
 - b) los sitios CpG del gen ND1 mostrados en la Tabla 2;
 - c) los sitios CHG de la región D-loop mostrados en la Tabla 3,
 - d) los sitios CHG del gen ND1 mostrados en la Tabla 4, y
 - e) los sitios CHH de la región D-loop mostrados en la Tabla 5.

en donde la posición correspondiente a la citosina en el sitio CpG, CHG o CHH es uracilo; y

- (iii) un polinucleótido que hibrida de forma específica con los ácidos nucleicos de (i) o (ii).

5

16. Un kit que comprende al menos un oligonucleótido capaz de hibridar específicamente y de forma dependiente de metilación con una secuencia en el ADN mitocondrial que comprende un sitio de metilación seleccionado del grupo formado por:

10

- (i) los sitios CpG de la región D-loop mostrados en la Tabla 1,
- (ii) los sitios CpG del gen ND1 mostrados en la Tabla 2;
- (iii) los sitios CHG de la región D-loop mostrados en la Tabla 3,
- (iv) los sitios CHG del gen ND1 mostrados en la Tabla 4, y/o
- (v) los sitios CHH de la región D-loop mostrados en la Tabla 5.

15

17. Un kit que comprende al menos un oligonucleótido capaz de hibridar específicamente con una zona en posición 5' o en posición 3' con respecto a un sitio de metilación en el ADN mitocondrial seleccionado del grupo formado por:

20

- (i) los sitios CpG de la región D-loop mostrados en la Tabla 1,
- (ii) los sitios CpG del gen ND1 mostrados en la Tabla 2;
- (iii) los sitios CHG de la región D-loop mostrados en la Tabla 3,
- (iv) los sitios CHG del gen ND1 mostrados en la Tabla 4, y/o
- (v) los sitios CHH de la región D-loop mostrados en la Tabla 5

en donde la citosina metilada en dicha posición se ha convertido a uracilo o a otra base que es distinguible de citosina en sus propiedades de hibridación.

25

18. Un kit según la reivindicación 17, en donde dicho al menos un oligonucleótido comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y/o SEQ ID NO: 5.

30

19. Uso de un kit de acuerdo a las reivindicaciones 16 a 18 para determinar el patrón de metilación del ADN mitocondrial o para determinar el diagnóstico de una enfermedad neurodegenerativa en un sujeto seleccionada de la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson.

A)

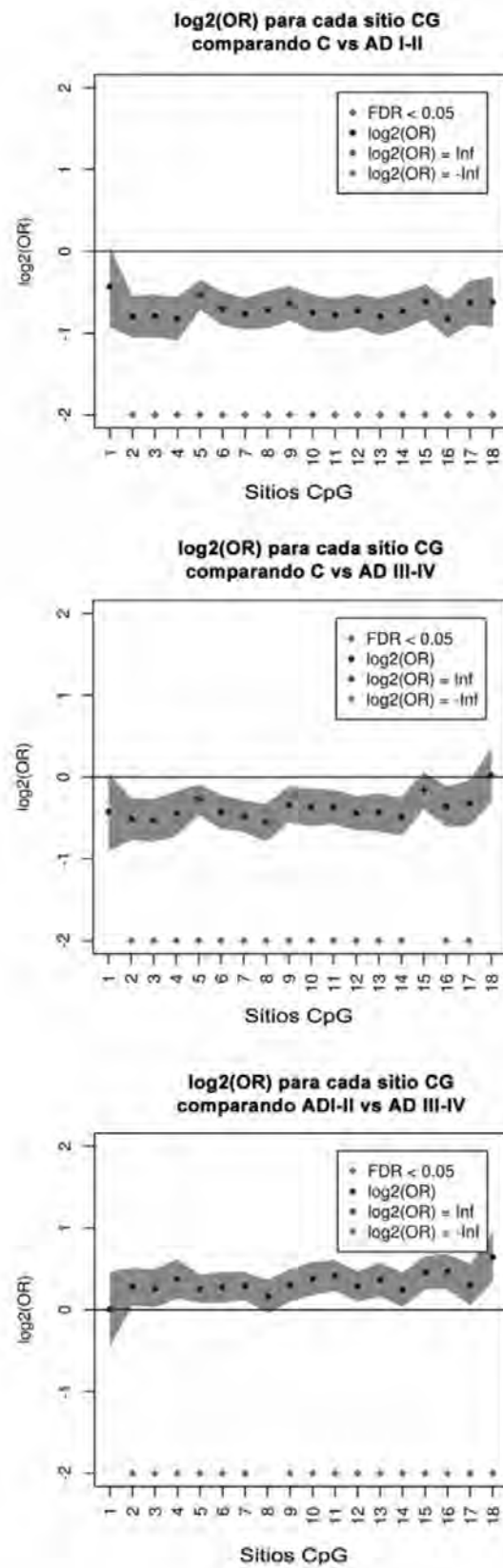


Figura 1

B)

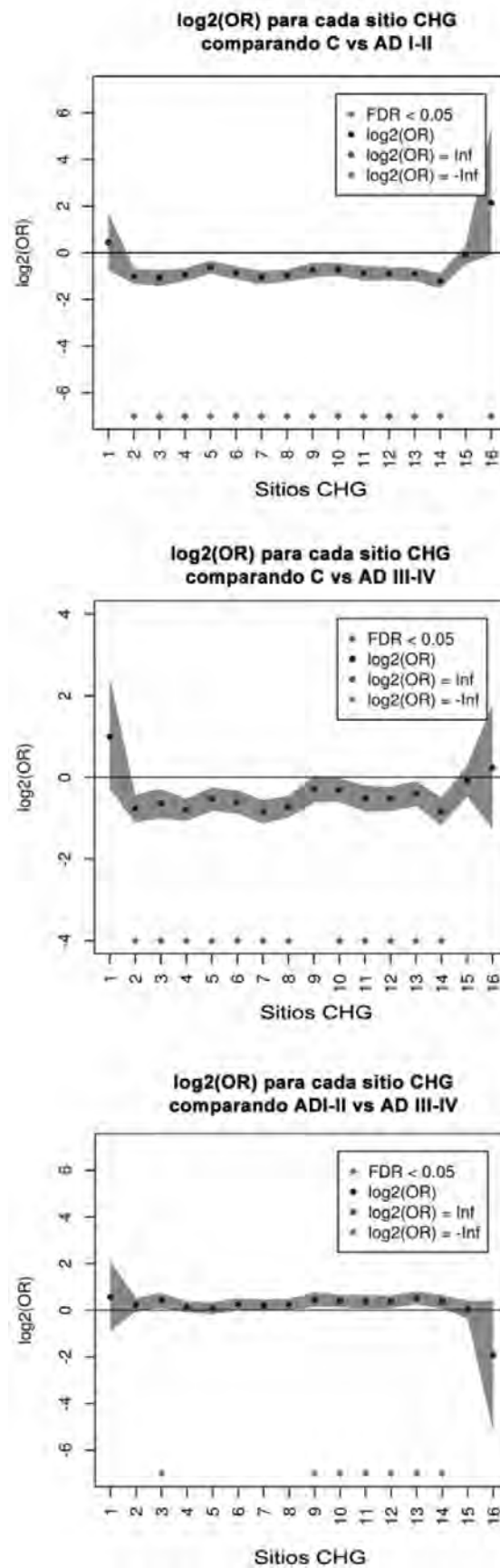


Figura 1 (cont.)

c)

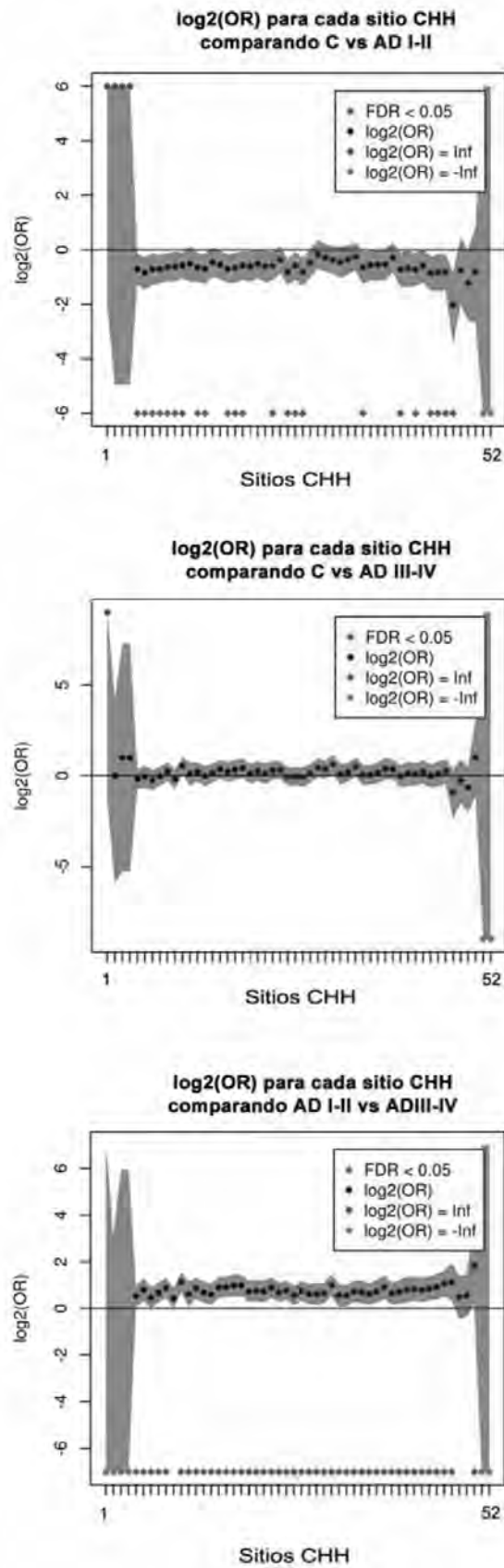


Figura 1 (cont.)

A)

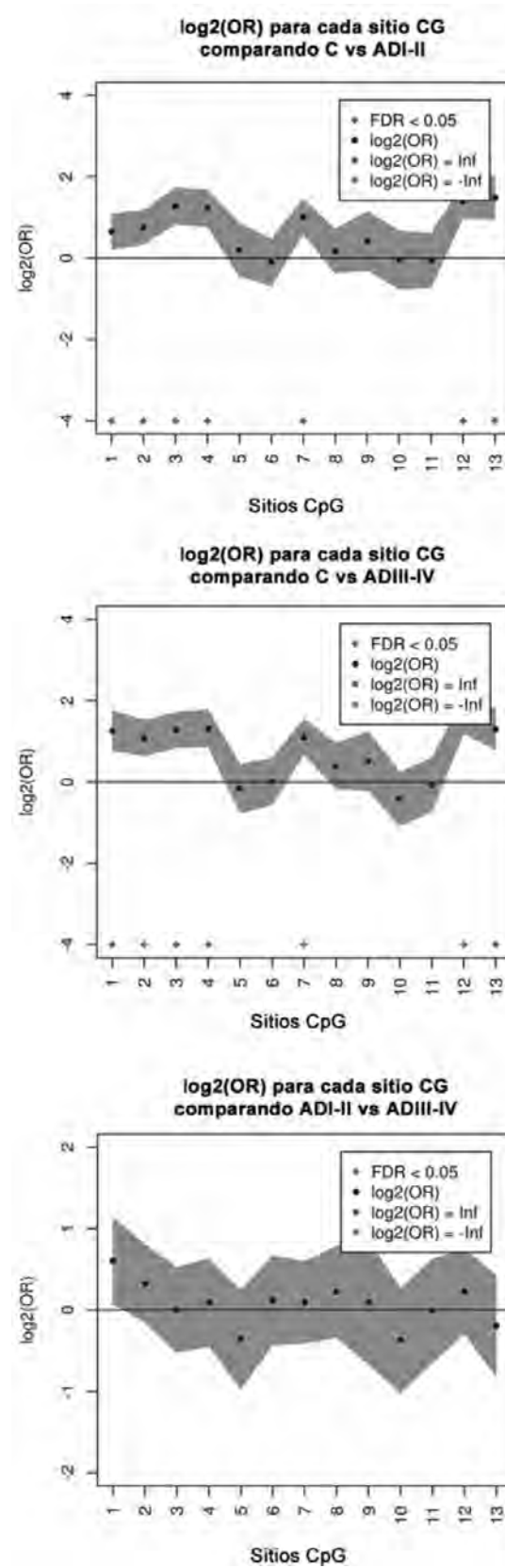


Figura 2

B)

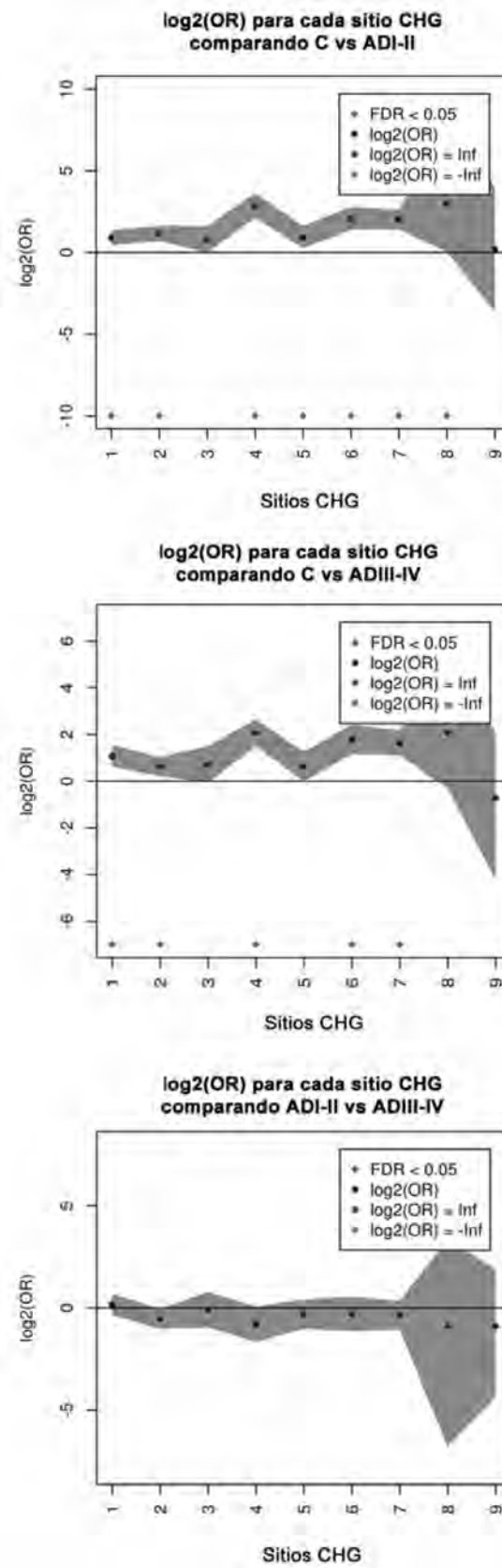


Figura 2 (cont.)

c)

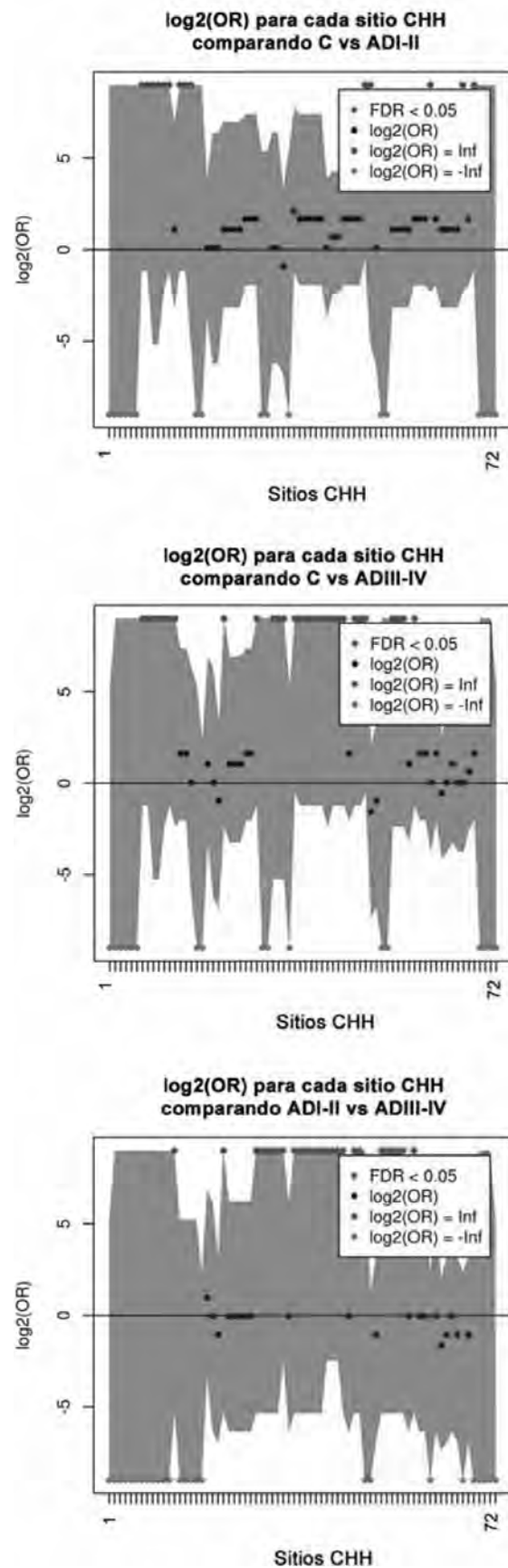


Figura 2 (cont.)

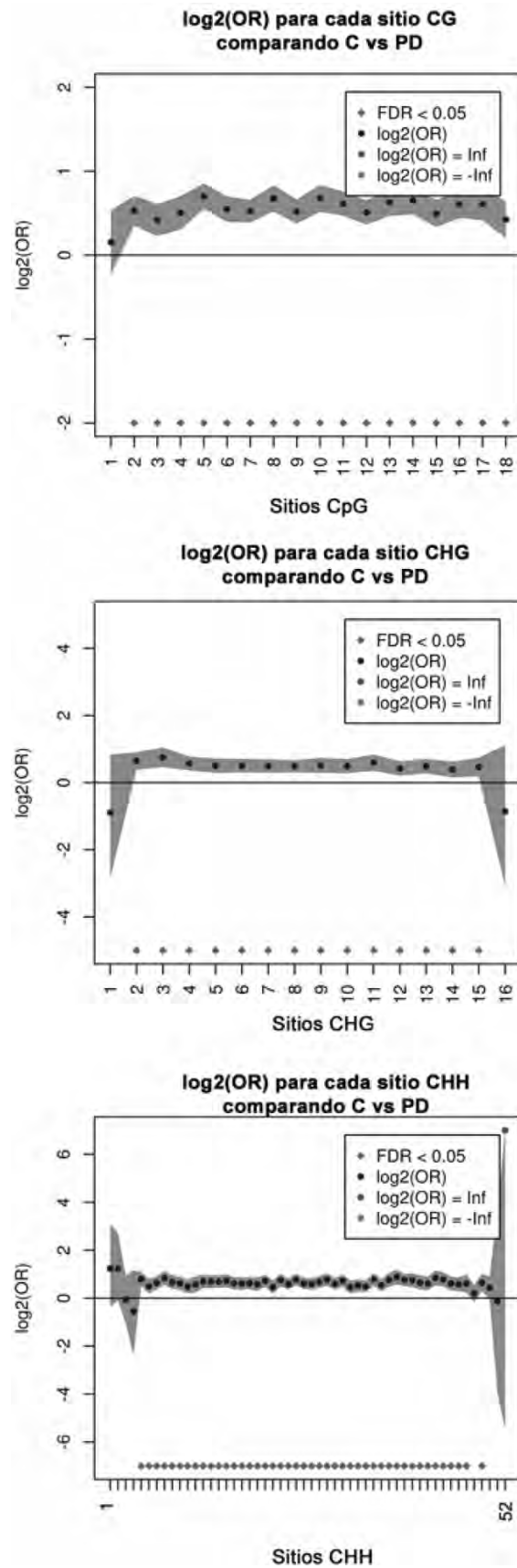


Figura 3

ES 2 546 743 B1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> INSTITUT D'INVESTIGACIÓ BIOMÈDICA DE BELLVITGE (IDIBELL)

<120> MARCADORES MITOCONDRIALES DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

<130> P10635ES00

<160> 34

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 16569

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (3107)..(3107)

<223> n e s a , c , g , o r t

<400> 1

gatcacaggt ctatcacctt attaacctt caccggagct ctccatgcat ttggtatttt	60
cgtctggggg gtatgcacgc gatagcattg cgagacgctg gagccggagc accctatgtc	120
gcagtatctg tctttgatcc ctgcctcatc ctattattta tcgcacctac gttcaatatt	180
acaggcgaac atacttacta aagtgtgtta attaatattt gcttgtagga cataataata	240
acaattgaat gtctgcacag ccactttcca cacagacatc ataacaaaaa atttccacca	300
aacccccctt cccccgcttc tggccacagc acttaaacac atctctgcca aacccccaaa	360
acaaagaacc ctaacaccag cctaaccaga tttcaaattt tatcttttgg cggtatgcac	420
ttttaacagt cccccccaa ctaacacatt attttcccct cccactccca tactactaat	480
ctcatcaata caacccccgc ccatcctacc cagcacacac acaccgctgc taaccccata	540
ccccgaacca accaaacccc aaagacaccc cccacagttt atgtagctta cctcctcaaa	600
gcaatacact gaaaatgttt agacgggctc acatcacccc ataaacaaat aggtttgggc	660
ctagcctttc tattagctct tagtaagatt acacatgcaa gcatccccgt tccagtgagt	720
tcaccctcta aatcaccacg atcaaaagga acaagcatca agcacgcagc aatgcagctc	780
aaaacgctta gcctagccac acccccacgg gaaacagcag tgattaacct ttagcaataa	840
acgaaagttt aactaagcta tactaacccc aggggttggtc aatttcgtgc cagccaccgc	900
ggtcacacga ttaacccaag tcaatagaag ccggcgtaaa gagtgtttta gatcaccccc	960
tccccataaa agctaaaact cacctgagtt gtaaaaaact ccagttgaca caaaatagac	1020
tacgaaagtg gctttaacat atctgaacac acaatagcta agacccaaac tgggattaga	1080
taccacctta tgcttagccc taaacctcaa cagttaaatc aacaaaactg ctgcgcagaa	1140

ES 2 546 743 B1

cactacgagc cacagcttaa aactcaaagg acctggcgggt gcttcatatc cctctagagg	1200
agcctgttct gtaatcgata aaccccgatc aacctcacca cctcttgctc agcctatata	1260
ccgccatctt cagcaaacc c gatgaaggc tacaagtaa gcgcaagtac ccacgtaaag	1320
acgttaggtc aaggtgtagc ccatgaggtg gcaagaaatg ggctacattt tctaccccag	1380
aaaactacga tagcccttat gaaacttaag ggtcgaagggt ggatttagca gtaaactaag	1440
agtagagtgc ttagttgaac agggccctga agcgcgtaca caccgcccgt caccctcctc	1500
aagtatactt caaaggacat ttaactaaaa ccctacgca tttatataga ggagacaagt	1560
cgtaacatgg taagtgtact ggaaagtgca cttggacgaa ccagagtgta gcttaacaca	1620
aagcacccaa cttacactta ggagatttca acttaacttg accgctctga gctaaaccta	1680
gccccaaacc cactccacct tactaccaga caaccttagc caaaccattt acccaaataa	1740
agtataggcg atagaaattg aaacctggcg caatagatat agtaccgcaa gggaaagatg	1800
aaaaattata accaagcata atatagcaag gactaaccoc tataccttct gcataatgaa	1860
ttaactagaa ataactttgc aaggagagcc aaagctaaga ccccgaaac cagacgagct	1920
acctaagaac agctaaaaga gcacaccggt ctatgtagca aaatagtggg aagatttata	1980
ggtagaggcg acaaacctac cgagcctgggt gatagctgggt tgtccaagat agaatcttag	2040
ttcaacttta aatttgccca cagaaccctc taaatccoct tgtaaattta actgttagtc	2100
caaagaggaa cagctctttg gacactagga aaaaaccttg tagagagagt aaaaaattta	2160
acacccatag taggcctaaa agcagccacc aattaagaaa gcgttcaagc tcaacaccca	2220
ctacctaaaa aatcccaaac atataactga actcctcaca cccaattgga ccaatctatc	2280
accctataga agaactaatg ttagtataag taacatgaaa acattctcct ccgcataagc	2340
ctgcgtcaga ttaaaacact gaactgacaa ttaacagccc aatatctaca atcaaccaac	2400
aagtcattat taccctcact gtcaacccaa cacaggcatg ctcataagga aagggttaaaa	2460
aaagtaaaag gaactcggca aatcttacc cgcctgttta ccaaaaacat cacctctagc	2520
atcaccagta ttagaggcac cgctgcca gtgacacatg ttaacggcc gcggtaccct	2580
aaccgtgcaa aggtagcata atcacttggt ccttaaataag ggacctgtat gaatggctcc	2640
acgaggggtc agctgtctct tacttttaac cagtgaaatt gacctgccg tgaagaggcg	2700
ggcataacac agcaagacga gaagacccta tggagcttta atttattaat gcaaacagta	2760
cctaacaaac ccacaggtcc taaactacca aacctgcatt aaaaatttcg gttggggcga	2820
cctcggagca gaacccaacc tccgagcagt acatgctaag acttcaccag tcaaagcgaa	2880
ctactatact caattgatcc aataacttga ccaacggaac aagttaccct agggataaca	2940

ES 2 546 743 B1

gcgcaatcct attctagagt ccatatcaac aatagggttt acgacctoga tgttgatca	3000
ggacatcccg atggtgcagc cgctattaaa ggttcgtttg ttcaacgatt aaagtcctac	3060
gtgatctgag ttcagaccgg agtaatccag gtcggtttct atctacnttc aaattcctcc	3120
ctgtacgaaa ggacaagaga aataaggcct acttcacaaa gcgccttccc ccgtaaatga	3180
tatcatctca acttagtatt ataccacac ccaccaaga acagggtttg ttaagatggc	3240
agagcccggt aatcgcataa aacttaaaac ttacagtcga gaggttcaat tcctcttctt	3300
aacaacatac ccatggccaa cctcctactc ctcatgttac ccattctaata cgcaatggca	3360
ttcctaatagc ttaccgaacg aaaaattcta ggctatatac aactacgcaa aggccccaac	3420
gttgtagggc cctacgggct actacaacc ttcgctgacg ccataaaaact cttcaccaaa	3480
gagcccctaa aaccggccac atctaccatc accctctaca tcaccgcccc gaccttagct	3540
ctcaccatcg ctcttctact atgaaccccc ctcccatac ccaaccccct ggtcaacctc	3600
aacctaggcc tcctatttat tctagccacc tctagcctag ccgtttactc aatcctctga	3660
tcagggtgag catcaaactc aaactacgcc ctgatcggcg cactgcgagc agtagcccaa	3720
acaatctcat atgaagtcac cctagccatc attctactat caacattact aataagtggc	3780
tcctttaacc tctccaccct tatcacaaca caagaacacc tctgattact cctgccatca	3840
tgacccttgg ccataatatg atttatctcc aactagcag agaccaaccg aacccccctc	3900
gaccttgccg aaggggagtc cgaactagtc tcaggcttca acatogaata cgccgcaggc	3960
cccttcgccc tattcttcat agccgaatac acaaacatta ttataataaa caccctcacc	4020
actacaatct tcctaggaac aacatatgac gcactctccc ctgaactcta cacaacatat	4080
tttgtcacca agaccctact tctaacctcc ctgttcttat gaattcgaac agcatacccc	4140
cgattccgct acgaccaact catacacctc ctatgaaaaa acttcctacc actcaccccta	4200
gcattactta tatgatatgt ctccataccc attacaatct ccagcattcc ccctcaaacc	4260
taagaaatat gtctgataaa agagttactt tgatagagta aataatagga gcttaaacc	4320
ccttatttct aggactatga gaatcgaacc catccctgag aatccaaaat tctccgtgcc	4380
acctatcaca ccccatccta aagtaaggtc agctaaataa gctatcgggc ccataccccg	4440
aaaatgttgg ttataccctt cccgtactaa ttaatccctt ggcccaaccc gtcactctact	4500
ctaccatctt tgcaggcaca ctcatcacag cgctaagctc gcactgattt ttacactgag	4560
taggcctaga aataaacatg ctagctttta ttccagttct aaccaaaaaa ataaaccctc	4620
gttccacaga agctgccatc aagtatttcc tcacgcaagc aaccgcatcc ataatccttc	4680
taatagctat cctcttcaac aatatactct ccggacaatg aaccataacc aatactacca	4740
atcaatactc atcattaata atcataatag ctatagcaat aaaactagga atagccccct	4800

ES 2 546 743 B1

ttcactttctg agtcccagag gttacccaag gcacccctct gacatccggc ctgctttcttc	4860
tcacatgaca aaaactagcc cccatctcaa tcatatacca aatctctccc tcaactaaacg	4920
taagccttct cctcactctc tcaatcttat ccatcatagc aggcagttga ggtggattaa	4980
accaaacca gctacgcaaa atcttagcat actcctcaat taccacata ggatgaataa	5040
tagcagttct accgtacaac cctaacataa ccattcttaa ttttaactatt tatattatcc	5100
taactactac cgcatttcta ctactcaact taaactccag caccacgacc ctactactat	5160
ctcgcacctg aaacaagcta acatgactaa cacccttaat tccatccacc ctccctctccc	5220
taggaggcct gccccgcta accggctttt tgcccaaagt ggccattatc gaagaattca	5280
caaaaaacaa tagcctcctc atccccacca tcatagccac catcacctc cttaacctct	5340
acttctacct acgcctaata tactccacct caatcacact actccccata tctaacaacg	5400
taaaaataaa atgacagttt gaacatacaa aaccaccccc attcctcccc acactcatcg	5460
cccttaccac gctactccta cctatctccc cttttataact aataatctta tagaaattta	5520
ggttaaatac agaccaagag ctttcaaagc cctcagtaag ttgcaatact taatttctgt	5580
aacagctaag gactgcaaaa cccactctg catcaactga acgcaaatca gccactttaa	5640
ttaagctaag cccttactag accaatggga cttaaacca caaacactta gttaacagct	5700
aagcaccta atcaactggc ttcaatctac ttctcccgcc gccgggaaaa aaggcgggag	5760
aagccccggc aggtttgaag ctgctttctc gaatttgcaa ttcaatatga aaatcacctc	5820
ggagctggta aaaagaggcc taaccctgt ctttagattt acagtccaat gcttactca	5880
gccattttac ctacccccca ctgatgttcg ccgaccgttg actattctct acaaaccaca	5940
aagacattgg aacactatac ctattattcg gcgcatgagc tggagtccta ggcacagctc	6000
taagcctcct tattcgagcc gagctgggcc agccaggcaa cttcttaggt aacgaccaca	6060
tctacaacgt tatcgtcaca gcccatgcat ttgtaataat cttcttcata gtaataacca	6120
tcataatcgg aggctttggc aactgactag ttcccctaata atcgggtgcc cccgatatgg	6180
cgtttccccg cataaacaac ataagcttct gactcttacc tccctctctc ctactcctgc	6240
tcgcatctgc tatagtggag gccggagcag gaacagggtg aacagtctac cctcccttag	6300
cagggaaacta ctcccacct ggagcctcgg tagacctaac catcttctcc ttacacctag	6360
caggtgtctc ctctatctta ggggccatca atttcatcac aacaattatc aatataaaac	6420
ccctgccat aaccaatac caaacgcccc tcttcgtctg atccgtccta atcacagcag	6480
tcctacttct cctatctctc ccagtcctag ctgctggcat cactatacta ctaacagacc	6540
gcaacctcaa caccacctc ttcgaccccg ccggaggagg agacccatt ctataccaac	6600

ES 2 546 743 B1

acctattctg	atcccccggt	caccctgaag	tttatattct	tatcctacca	ggcttcggaa	6660
taatctccca	tattgtaact	tactactccg	gaaaaaaaga	accatttgga	tacataggta	6720
tggtctgagc	tatgatatac	attggcttcc	tagggtttat	cgtgtgagca	caccatatat	6780
ttacagtagg	aatagacgta	gacacacgag	catatttcac	ctccgctacc	ataatcatcg	6840
ctatccccac	cggcgtcaaa	gtatttagct	gactcgccac	actccacgga	agcaatatga	6900
aatgatctgc	tgcagtgtc	tgagccctag	gattcatctt	tcttttcacc	gtaggtggcc	6960
tgactggcat	tgtattagca	aactcatcac	tagacatcgt	actacacgac	acgtactacg	7020
ttgtagccca	cttccactat	gtcctatcaa	taggagctgt	atttgccatc	ataggaggct	7080
tcattcactg	atttccccta	ttctcaggct	acaccctaga	ccaaacctac	gccaaaatcc	7140
atttcactat	catattcatc	ggcgtaaatc	taactttctt	cccacaacac	tttctcggcc	7200
tatccggaat	gccccgacgt	tactcggact	accccgatgc	atacaccaca	tgaaacatcc	7260
tatcatctgt	aggctcatto	atttctctaa	cagcagtaat	attaataatt	ttcatgattt	7320
gagaagcctt	cgcttcgaag	cgaaaagtcc	taatagtaga	agaaccttcc	ataaacctgg	7380
agtgactata	tggtatgccc	ccacctacc	acacattcga	agaacctgta	tacataaaat	7440
ctagacaaaa	aaggaaggaa	tcgaaccccc	caaagctggg	ttcaagccaa	ccccatggcc	7500
tccatgactt	tttcaaaaag	gtattagaaa	aaccatttca	taactttgtc	aaagttaa	7560
tataggctaa	atcctatata	tcttaatggc	acatgcagcg	caagtaggtc	tacaagacgc	7620
tacttcccc	atcatagaag	agcttatcac	ctttcatgat	cacgccctca	taatcatttt	7680
ccttatctgc	ttcctagtcc	tgtatgcctt	tttctaaca	ctcacaacaa	aactaactaa	7740
tactaacatc	tcagacgctc	aggaaataga	aaccgtctga	actatcctgc	ccgccatcat	7800
cctagtccct	atcgccctcc	catccctacg	catcctttac	ataacagacg	aggtcaacga	7860
tccctccctt	accatcaaat	caattggcca	ccaatgggtac	tgaacctacg	agtacaccga	7920
ctacggcgga	ctaattcttc	actcctacat	acttccccca	ttattcctag	aaccaggcga	7980
cctgcgactc	cttgacgttg	acaatcgagt	agtactcccg	attgaagccc	ccattcgtat	8040
aataattaca	tcacaagacg	tcttgactc	atgagctgtc	cccacattag	gcttaaaaac	8100
agatgcaatt	cccgacgctc	taaaccaa	cactttcacc	gtacacgac	cggggggtata	8160
ctacgggtcaa	tgctctgaaa	tctgtggagc	aaaccacagt	ttcatgcca	tcgtcctaga	8220
attaattccc	ctaaaaatct	ttgaaatagg	gcccgatatt	accctatagc	acccctctta	8280
ccccctctag	agccactgt	aaagctaact	tagcattaac	cttttaagtt	aaagattaag	8340
agaaccaaca	cctctttaca	gtgaaatgcc	ccaactaaat	actaccgtat	ggcccaccat	8400
aattaccccc	atactcctta	cactattcct	catcacccaa	ctaaaaatat	taaacacaaa	8460

ES 2 546 743 B1

ctaccaccta cctccctcac caaagcccat aaaaataaaa aattataaca aaccctgaga	8520
acaaaaatga acgaaaatct gttcgcttca ttcattgccc ccacaatcct aggcctaccc	8580
gccgcagtac tgatcattct atttccccct ctattgatcc ccacctccaa atatctcatc	8640
aacaaccgac taatcaccac ccaacaatga ctaatcaaac taacctcaaa acaaatgata	8700
accatacaca aactaaagg acgaacctga tctcttatac tagtatcctt aatcattttt	8760
attgccacaa ctaacctcct cggactcctg cctcactcat ttacaccaac cacccaacta	8820
tctataaacc tagccatggc catcccctta tgagcgggca cagtgattat aggccttcgc	8880
tctaagatta aaaatgcctt agcccacttc ttaccacaag gcacacctac accccttatt	8940
cccatactag ttattatcga aaccatcagc ctactcattc aaccaatagc cctggccgta	9000
cgctaaccg ctaacattac tgcaggccac ctactcatgc acctaatgg aagcgccacc	9060
ctagcaatat caaccattaa ccttccctct acacttatca tcttcacaat tctaattcta	9120
ctgactatcc tagaaatcgc tgtcgcctta atccaagcct acgttttcac acttctagta	9180
agcctctacc tgcacgacaa cacataatga cccaccaatc acatgcctat catatagtaa	9240
aaccagccc atgacccta acaggggccc tctcagcctt cctaatgacc tccggcctag	9300
ccatgtgatt tcaattccac tccataacgc tctcatact aggcctacta accaacacac	9360
taaccatata ccaatgatgg cgcgatgtaa cagagaaag cacataccaa ggccaccaca	9420
caccacctgt ccaaaaaggc cttcgatacg ggataatcct atttattacc tcagaagttt	9480
ttttcttcgc aggatttttc tgagcctttt accactccag cctagcccct accccccaat	9540
taggagggca ctggcccccac acaggcatca ccccgctaaa tcccctagaa gtcccactcc	9600
taaacacatc cgtattactc gcatcaggag tatcaatcac ctgagctcac catagtctaa	9660
tagaaaacaa ccgaaaccaa ataattcaag cactgcttat tacaatttta ctgggtctct	9720
attttaccct cctacaagcc tcagagtact tcgagtctcc cttcaccatt tccgacggca	9780
tctacggctc aacatttttt gtagccacag gcttccacgg acttcacgtc attattggct	9840
caactttcct cactatctgc ttcatccgcc aactaatatt tcactttaca tccaaacatc	9900
actttggctt cgaagccgcc gcctgatact ggcattttgt agatgtgggt tgactatttc	9960
tgtatgtctc catctattga tgagggtctt actcttttag tataaatagt accgttaact	10020
tccaattaac tagttttgac aacattcaaa aaagagtaat aaacttcgcc ttaattttta	10080
taatcaacac ctcctagcc ttactactaa taattattac attttgacta ccacaactca	10140
acggctacat agaaaaatcc accccttacg agtgcggtt cgaccctata tccccgccc	10200
gcgtcccttt ctccataaaa ttcttcttag tagctattac cttcttatta tttgatctag	10260

ES 2 546 743 B1

aaattgcctt	cctttttaccc	ctaccatgag	cctacaaaac	aactaacctg	ccactaatag	10320
ttatgtcatc	cctcttatta	atcatcatcc	tagccctaag	tctggcctat	gagtgtactac	10380
aaaaaggatt	agactgaacc	gaattgggtat	atagttttaa	caaaacgaat	gatttcgact	10440
cattaaatta	tgataatcat	atttaccaaa	tgccctcat	ttacataaat	attatactag	10500
catttaccat	ctcacttcta	ggaatactag	tatatcgctc	acacctcata	tcctccctac	10560
tatgcctaga	aggaataata	ctatcgctgt	tcattatagc	tactctcata	accctcaaca	10620
cccactccct	cttagccaat	attgtgccta	ttgccatact	agtctttgcc	gcctgcgaag	10680
cagcgggtggg	cctagcccta	ctagtctcaa	tctccaacac	atatggccta	gactacgtac	10740
ataacctaata	cctactccaa	tgctaaaact	aatcgctcca	acaattatat	tactaccact	10800
gacatgactt	tccaaaaaac	acataatttg	aatcaacaca	accacccaca	gcctaattat	10860
tagcatcatc	cctctactat	tttttaacca	aatcaacaac	aacctattta	gctgttcccc	10920
aaccttttcc	tccgaccccc	taacaacccc	cctcctaata	ctaactacct	gactcctacc	10980
cctcacaatc	atggcaagcc	aacgccactt	atccagtga	ccactatcac	gaaaaaaact	11040
ctacctctct	atactaattc	cctacaaaat	ctccttaatt	ataacattca	cagccacaga	11100
actaatcata	ttttatatct	tcttcgaaac	cacacttata	cccaccttgg	ctatcatcac	11160
ccgatgaggc	aaccagccag	aacgcctgaa	cgcaggcaca	tacttcctat	tctacaccct	11220
agtaggctcc	cttcccctac	tcacgcgact	aattttacact	cacaacaccc	taggctcact	11280
aaacattcta	ctactcactc	tcactgcccc	agaactatca	aactcctgag	ccaacaactt	11340
aatatgacta	gcttacacaa	tagcttttat	agtaaagata	cctcttttacg	gactccactt	11400
atgactccct	aaagcccatg	tcgaagcccc	catcgctggg	tcaatagtac	ttgcgcgagt	11460
actcttaaaa	ctaggcgggt	atggtataat	acgcctcaca	ctcattctca	accccctgac	11520
aaaacacata	gcctaccctt	tccttgtact	atccctatga	ggcataatta	taacaagctc	11580
catctgccta	cgacaaacag	acctaaaatc	gtcatttgca	tactcttcaa	tcagccacat	11640
agccctcgta	gtaacagcca	ttctcatcca	aaccccctga	agcttcaccg	gcgcagtcac	11700
tctcataatc	gccacggggc	ttacatcctc	attactattc	tgccctagcaa	actcaaacta	11760
cgaacgcact	cacagtgcga	tcataatcct	ctctcaagga	cttcaaactc	tactcccact	11820
aatagctttt	tgatgacttc	tagcaagcct	cgttaacctc	gccttaccct	ccactattaa	11880
cctactggga	gaactctctg	tgctagtaac	cacgttctcc	tgatcaaata	tcactctcct	11940
acttacagga	ctcaacatac	tagtcacagc	cctatactcc	ctctacatat	ttaccacaac	12000
acaatggggc	tcactcacc	accacattaa	caacataaaa	ccctcattca	cacgagaaaa	12060
caccctcatg	ttcatacacc	tatcccccat	tctcctccta	tcctcaacc	ccgacatcat	12120

ES 2 546 743 B1

taccggggttt	tctcttgta	aatatagttt	aacaaaaaca	tcagattgtg	aatctgacaa	12180
cagaggctta	cgaccctta	tttaccgaga	aagctcacia	gaactgctaa	ctcatgcccc	12240
catgtctaac	aacatggctt	tctcaacttt	taaaggataa	cagctatcca	ttgggtcttag	12300
gccccaaaaa	ttttggtgca	actccaaata	aaagtaataa	ccatgcacac	tactataacc	12360
accctaacc	tgacttcct	aattcccccc	atccttacca	ccctcgtaa	ccctaacaaa	12420
aaaaactcat	acccccatta	tgtaaaatcc	attgtcgc	ccacctttat	tatcagtctc	12480
ttccccacaa	caatattcat	gtgcctagac	caagaagtta	ttatctcgaa	ctgacactga	12540
gccacaacc	aaacaacc	gctctcccta	agcttcaaac	tagactactt	ctccataata	12600
ttcatccctg	tagcattggt	cgttacatgg	tccatcatag	aattctcact	gtgatataata	12660
aactcagacc	caaacattaa	tcagttcttc	aaatatctac	tcattcttct	aattaccata	12720
ctaattcttag	ttaccgctaa	caacctattc	caactgttca	tcggctgaga	gggcgtagga	12780
attatatcct	tcttgctcat	cagttgatga	tacgcccag	cagatgccaa	cacagcagcc	12840
attcaagcaa	tcctatacaa	ccgtatcggc	gatatcgggt	tcattcctgc	cttagcatga	12900
tttatcctac	actccaactc	atgagacca	caacaaatag	cccttctaaa	cgctaattcca	12960
agcctcacc	cactactagg	cctcctccta	gcagcagcag	gcaaatacag	ccaattaggt	13020
ctccaccct	gactcccctc	agccatagaa	ggccccacc	cagtctcagc	cctactccac	13080
tcaagcacta	tagttgtagc	aggaatcttc	ttactcatcc	gcttccacc	cctagcagaa	13140
aatagcccac	taatccaaac	tctaactacta	tgcttaggcg	ctatcaccac	tctgttcgca	13200
gcagtctgcg	cccttacaca	aatgacatc	aaaaaaatcg	tagccttctc	cacttcaagt	13260
caactaggac	tcataatagt	tacaatcggc	atcaaccaac	cacacctagc	attcctgcac	13320
atctgtaccc	acgccttctt	caaagccata	ctatttatgt	gctccgggtc	catcatccac	13380
aaccttaaca	atgaacaaga	tattcgaaaa	ataggaggac	tactcaaaac	catacctctc	13440
acttcaacct	ccctcaccat	tggcagccta	gcattagcag	gaataccttt	cctcacaggt	13500
ttctactcca	aagaccacat	catcgaaacc	gcaaacatat	catacacaaa	cgctgagcc	13560
ctatctatta	ctctcatcgc	tacctccctg	acaagcgct	atagcactcg	aataattctt	13620
ctcaccctaa	caggtcaacc	tcgcttcccc	acccttacta	acattaacga	aaataacccc	13680
accctactaa	acccatttaa	acgcctggca	gccggaagcc	tattcgcagg	atttctcatt	13740
actaacaaca	tttccccgc	atcccccttc	caaacaacaa	tccccctcta	cctaaaactc	13800
acagccctcg	ctgtcacttt	cctaggactt	ctaacagccc	tagacctcaa	ctacctaac	13860
aacaaactta	aaataaaaatc	cccactatgc	acattttatt	tctccaacat	actcggattc	13920

ES 2 546 743 B1

taccctagca	tcacacaccg	cacaatcccc	tatctaggcc	ttcttacgag	ccaaaacctg	13980
cccctactcc	tcctagacct	aacctgacta	gaaaagctat	tacctaaaac	aatttcacag	14040
caccaaattct	ccacctccat	catcacctca	acccaaaaag	gcataattaa	actttacttc	14100
ctctctttct	tcttcccact	catcctaacc	ctactoctaa	tcacataacc	tattcccccg	14160
agcaatctca	attacaatat	atacaccaac	aaacaatggt	caaccagtaa	ctactactaa	14220
tcaacgcca	taatcatata	aagcccccg	accaatagga	tcctcccgaa	tcaaccctga	14280
cccctctcct	tcataaatta	ttcagcttcc	tacactatta	aagtttacca	caaccaccac	14340
cccatcatat	tctttcaccc	acagcaccaa	tcctacctcc	atcgctaacc	ccactaaaac	14400
actcaccaag	acctcaaccc	ctgaccccc	tgccctcagga	tactcctcaa	tagccatcgc	14460
tgtagtatat	caaagacaa	ccatcattcc	ccctaaataa	attaaaaaaa	ctattaaacc	14520
catataacct	ccccaaaat	tcagaataat	aacacaccgc	accacaccgc	taacaatcaa	14580
tactaaaccc	ccataaatag	gagaaggctt	agaagaaaac	cccacaaacc	ccattactaa	14640
accacactc	aacagaaaca	aagcatatct	cattattctc	gcacgggacta	caaccacgac	14700
caatgatatg	aaaaaccatc	gttggtatttc	aactacaaga	acaccaatga	ccccaatagc	14760
caaaactaac	cccctaataa	aattaattaa	ccactcattc	atcgacctcc	ccaccccatc	14820
caacatctcc	gcatgatgaa	acttcggctc	actccttggc	gcctgcctga	tcctccaaat	14880
caccacagga	ctattcctag	ccatgcacta	ctcaccagac	gcctcaaccg	ccttttcatc	14940
aatcgccac	atcactcgag	acgtaaatta	tggtgaatc	atccgctacc	ttcacgccaa	15000
tggcgcctca	atattcttta	tctgcctctt	cctacacatc	gggcgaggcc	tatattacgg	15060
atcatttctc	tactcagaaa	cctgaaacat	cggcattatc	ctcctgcttg	caactatagc	15120
aacagccttc	ataggctatg	tcctcccggt	aggccaaata	tcattctgag	gggccacagt	15180
aattacaaac	ttactatccg	ccatcccata	cattgggaca	gacctagttc	aatgaatctg	15240
aggaggctac	tcagtagaca	gtcccacct	cacacgattc	tttacctttc	acttcatctt	15300
gcccttcatt	attgcagccc	tagcaacact	ccacctccta	ttcttgacgc	aaacgggatc	15360
aaacaacccc	ctaggaatca	cctcccattc	cgataaaatc	accttccacc	cttactacac	15420
aatcaaagac	gccctcgggt	tacttctctt	ccttctctcc	ttaatgacat	taacactatt	15480
ctcaccagac	ctcctaggcg	accagacaa	ttatacccta	gccaaccct	taaacacccc	15540
tccccacatc	aagcccgaat	gatatttctt	attcgcttac	acaattctcc	gatccgtccc	15600
taacaaacta	ggaggcgctc	ttgccctatt	actatccatc	ctcatcctag	caataatccc	15660
catcctccat	atatccaaac	aacaaagcat	aatatttgcg	ccactaagcc	aatcacttta	15720
ttgactccta	gccgcagacc	tcctcattct	aacctgaatc	ggaggacaac	cagtaagcta	15780

ES 2 546 743 B1

```

cccttttacc atcattggac aagtagcatc cgtactatac ttcacaacaa tcctaatacct 15840
aataccaact atctccctaa ttgaaaacaa aataactcaaa tgggcctgtc cttgtagtat 15900
aaactaatac accagtcttg taaaccggag atgaaaacct tttccaagg acaaatcaga 15960
gaaaaagtct ttaactccac cattagcacc caaagctaag attctaattt aaactattct 16020
ctgttctttc atggggaagc agatttgggt accaccaag tattgactca cccatcaaca 16080
accgctatgt atttcgtaca ttactgccag ccaccatgaa tattgtacgg taccataaat 16140
acttgaccac ctgtagtaca taaaaacca atccacatca aaacccctc cccatgctta 16200
caagcaagta cagcaatcaa ccctcaacta tcacacatca actgcaactc caaagccacc 16260
cctcaccac taggatacca aaaaacctac ccacccttaa cagtacatag tacataaagc 16320
catttaccgt acatagcaca ttacagtcaa atcccttctc gtcccatgg atgaccccc 16380
tcagataggg gtcccttgac caccatcctc cgtgaaatca atatcccgca caagagtgt 16440
actctcctcg ctccgggccc ataacacttg ggggtagcta aagtgaactg tatccgacat 16500
ctggttctta cttcagggtc ataaagccta aatagccac acgttcccct taaataagac 16560
atcacgatg 16569

```

<210> 2
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Secuencia específica de molde para el amplicón D-loop

<400> 2
 taggggtttt ttgattatta ttttt 25

<210> 3
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Secuencia específica de molde para el amplicón D-loop

<400> 3
 acaaacattc aattattatt attatatcct 30

<210> 4
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Secuencia específica de molde para el amplicón ND1

<400> 4
atggttaatt ttttattttt tattgtattt 30

<210> 5
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Secuencia específica de molde para el amplicón ND1

<400> 5
taattttaa ttaatactca ccctaataca 30

<210> 6
<211> 10
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Secuencia MID

<400> 6
acgagtgcgt 10

<210> 7
<211> 10
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Secuencia MID

<400> 7
acgctcgaca 10

<210> 8
<211> 10
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Secuencia MID

<400> 8
agacgcactc 10

<210> 9
<211> 10
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Secuencia MID

<400> 9 agcactgtag	10
<210> 10 <211> 10 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> Secuencia MID	
<400> 10 atcagacacg	10
<210> 11 <211> 10 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> Secuencia MID	
<400> 11 atatcgcgag	10
<210> 12 <211> 10 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> Secuencia MID	
<400> 12 cgtgtctcta	10
<210> 13 <211> 10 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> Secuencia MID	
<400> 13 ctcgcgtgtc	10
<210> 14 <211> 10 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> Secuencia MID	
<400> 14	

tagtatcagc	10
<210> 15	
<211> 10	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Secuencia MID	
<400> 15	
tctctatgcg	10
<210> 16	
<211> 10	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Secuencia MID	
<400> 16	
tgatacgtct	10
<210> 17	
<211> 10	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Secuencia MID	
<400> 17	
tactgagcta	10
<210> 18	
<211> 10	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Secuencia MID	
<400> 18	
catagtagtg	10
<210> 19	
<211> 10	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Secuencia MID	
<400> 19	
cgagagatac	10

<210> 20
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Secuencia MID

<400> 20
 atacgacgta 10

<210> 21
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Secuencia MID

<400> 21
 tcacgtacta 10

<210> 22
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Secuencia MID

<400> 22
 cgtctagtagc 10

<210> 23
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Secuencia MID

<400> 23
 tctacgtagc 10

<210> 24
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Secuencia MID

<400> 24
 tgtactactc 10

<210>	25	
<211>	10	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Secuencia MID	
<400>	25	
	acgactacag	10
<210>	26	
<211>	10	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	secuencia MID	
<400>	26	
	cgtagactag	10
<210>	27	
<211>	10	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Secuencia MID	
<400>	27	
	tacgagtatg	10
<210>	28	
<211>	10	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Secuencia MID	
<400>	28	
	tactctcgtg	10
<210>	29	
<211>	10	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Secuencia MID	
<400>	29	
	tagagacgag	10

ES 2 546 743 B1

<210> 30
 <211> 502
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 30
 ataccaacaa acctaccac ccttaacagt acatagtaca taaagccatt taccgtacat 60
 agcacattac agtcaaate cttctcgtcc ccatggatga cccccctcag ataggggtcc 120
 cttgaccacc atcctccgtg aaatcaatat cccgcacaag agtgctactc tcctcgtcc 180
 gggcccataa cacttggggg tagctaaagt gaactgtatc cgacatctgg ttctacttc 240
 agggtcataa agcctaaata gccacacgt tccccttaa taagacatca cgatggatca 300
 caggtctatc accctattaa cactcacgg gagctctcca tgcatttggt atttcgtct 360
 ggggggtatg cagcgatag cattgcgaga cgctggagcc ggagcacct atgtcgcagt 420
 atctgtcttt gattcctgcc tcctctatt atttatcgca cctacgttca atattacagg 480
 cgaacatact tactaaagtg tg 502

<210> 31
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> cebador directo para detectar el polimorfismo T16519C

<400> 31
 ataccaacaa acctaccac cc 22

<210> 32
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> cebador reverso para detectar el polimorfismo T16519C

<400> 32
 ggccaacata ctactaaag tgtg 24

<210> 33
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Cebador A

<400> 33
 cgtatcgcc cctcgcgcc a 21

<210> 34
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cebador B

<400> 34
ctatgcgct tgccagcccg c

21



- ②① N.º solicitud: 201430444
②② Fecha de presentación de la solicitud: 28.03.2014
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	COPPIETERS, N. et al., 'Global changes in DNA methylation and hydroxymethylation in Alzheimer's disease human brain', NEUROBIOLOGY OF AGING, 2014 Jun, Vol. 35, No. 6, Páginas 1334-1344, ISSN: 1558-1497 (Electronic), doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.11.031. Epub: 04.12.2013, todo el documento.	1-19
A	LAKATOS, A. et al., 'Association between mitochondrial DNA variations and Alzheimer's Disease in the ADNI cohort', NEUROBIOLOGY OF AGING, 2010, Vol. 31, No. 8, Páginas 1355-1363, ISSN: 0197-4580(print), ISSN: 1558-1497(electronic), doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2010.04.031, todo el documento.	1-19
A	US 2012232016 A1 (COLEMAN, PAUL D.) 13.09.2012, todo el documento.	1-19
A	MASLIAH, E. et al., 'Distinctive patterns of DNA methylation associated with Parkinson disease: identification of concordant epigenetic changes in brain and peripheral blood leukocytes', EPIGENETICS, 2013 Oct, Vol. 8, No. 10, Páginas 1030-1038, ISSN: 1559-2294(print), ISSN: 1559-2308(electronic), doi: 10.4161/epi.25865, todo el documento.	1-19
A	SHARMA, S. et al., 'Biomarkers in Parkinson's disease (recent update)', NEUROCHEMISTRY INTERNATIONAL, 2013 Sep, Vol. 63, No. 3, Páginas 201-229, ISSN: 0197-0186(print), ISSN: 1872-9754(electronic), doi: 10.1016/j.neuint.2013.06.005, todo el documento.	1-19
A	MANCUSO, M et al., 'Mitochondrial DNA sequence variation and neurodegeneration', HUMAN GENOMICS, 2008, Vol. 3, No. 1 Páginas 71-78, ISSN: 1473-9542, doi: 10.1186/1479-7364-3-1-71, todo el documento.	1-19
A	WONG, M. et al., 'Mitochondrial DNMT3A and DNA methylation in skeletal muscle and CNS of transgenic mouse models of ALS', FRONTIERS IN CELLULAR NEUROSCIENCE, 2013, Vol. 7, Página 279, ISSN: 1662-5102(print), ISSN: 1662-5102(electronic), doi: 10.3389/fncel.2013.00279, todo el documento.	1-19
A	PARK, CHAN BAE et al., 'Mitochondrial DNA mutations in disease and aging', JOURNAL OF CELL BIOLOGY, 2011, Vol. 193, Vol. 5, Páginas 809-818, ISSN: 0021-9525, doi: 10.1083/jcb.201010024, todo el documento.	1-19

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
25.11.2014

Examinador
J. L. Vizán Arroyo

Página
1/5



- ②① N.º solicitud: 201430444
②② Fecha de presentación de la solicitud: 28.03.2014
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	IACOBazzi, V. et al., 'Mitochondrial DNA methylation as a next-generation biomarker and diagnostic tool', MOLECULAR GENETICS AND METABOLISM, 2013 Sep-Oct, Vol. 110, Nos 1-2, Páginas 25-34, ISSN: 1096-7192(print), ISSN: 1096-7206(electronic), doi: 10.1016/j.ymgme.2013.07.012, todo el documento.	1-19

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
25.11.2014

Examinador
J. L. Vizán Arroyo

Página
2/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EMBL-EBI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 25.11.2014

Declaración**Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)**

Reivindicaciones 1-19
Reivindicaciones

SI
NO

Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)

Reivindicaciones 1-19
Reivindicaciones

SI
NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	COPPIETERS, N. et al., <i>Neurobiol. Aging</i> , (2014 Jun), 35(6): 1334-44.	04-12-2013
D02	LAKATOS, A. et al., <i>Neurobiol Aging</i> , 2010, 31(8): 1355-63.	2010
D03	US 2012232016 A1 (COLEMAN, PAUL D.)	13.09.2012
D04	MASLIAH, E. et al., <i>Epigenetics</i> , (2013 Oct), 8(10): 1030-8.	2013
D05	SHARMA, S. et al., <i>Neurochem. Int.</i> , (2013 Sep), 63(3): 201-29.	2013
D06	MANCUSO, M et al., <i>Hum. Genomics</i> , (2008), 3(1): 71-78.	2008
D07	WONG, M. et al., <i>Front. Cell. Neurosci.</i> , (2013), 7: 279.	2013
D08	PARK, C.B. et al., <i>J. Cell. Biol.</i> , (2011), 193(5): 809-18.	2011
D09	IACOBazzi, V. et al., <i>Mol. Genet. Metab.</i> , (2013 Sep-Oct), 110(1-2): 25-34.	2013

En D01-D03 se divulgan diferentes marcadores genéticos y epigenéticos asociados con la enfermedad de Alzheimer.

En D04-D05 se divulgan diferentes marcadores genéticos y epigenéticos asociados con la enfermedad de Parkinson.

En D06-D09 se describen marcadores en el ADN mitocondrial (ADNmt) asociados a enfermedades neurodegenerativas.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

1. NOVEDAD (Art. 4.1. y Art. 6.1. de la Ley de Patentes) y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 4.1. y Art. 8.1. de la Ley de Patentes).

1.1 Reivindicación independiente 1, 3 y 4.

1.1.1. El objeto de las reivindicación independiente 1 consiste en un procedimiento *in vitro* para diagnosticar o determinar el riesgo de desarrollar en un sujeto una enfermedad neurodegenerativa seleccionada entre la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson que comprende determinar en una muestra de dicho sujeto el patrón de metilación de uno o más sitios CpG, CHG y/o CHH de la región D-loop y/o del gen ND1 del ADNmt definidos en las tablas 1 a 5, en donde el aumento en el nivel de metilación de uno o más sitios de la región D-loop (tablas 1, 3 y 5), y/o la disminución en el nivel de metilación de uno o más sitios del gen ND1 (tablas 2 y 4) es indicativo de que el sujeto sufre la enfermedad de Alzheimer, y en donde la disminución en el nivel de metilación de uno o más sitios de la región D-loop (tablas 1, 3 y 5) es indicativo de que el sujeto sufre la enfermedad de Parkinson. Las reivindicaciones 3 y 4 tratan de un procedimiento *in vitro* para seleccionar un sujeto para someterlo a un tratamiento preventivo de una de las enfermedades neurodegenerativas consideradas y de un procedimiento *in vitro* para monitorizar la progresión de dichas enfermedades que comprenden determinar en una muestra de dicho sujeto el patrón de metilación de uno o más sitios CpG, CHG y/o CHH de la región D-loop y/o del gen ND1 del ADNmt definidos en las tablas 1 a 5. Además, la reivindicación 15 trata de un ácido nucleico que comprende al menos 9 nucleótidos contiguos de una región del ADNmt que comprende al menos uno de los sitios de metilación definidos en las tablas 1 a 5. El objeto de la reivindicación 16 y 17 es un kit que se caracteriza porque comprende oligonucleótidos capaces de hibridar con la secuencia de al menos uno de los sitios de metilación definidos en las tablas 1 a 5, o con secuencias situadas en posición 5' o 3' con respecto a dichos sitios de metilación.

En el estado de la técnica más próximo, constituido por los documentos D01-D07, se han divulgado procedimientos para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer y la de Parkinson basados en el análisis de cambios epigenéticos en tejido cerebral, en particular, de cambios en la metilación global del ADN (cf. D01, D04), o en cambios puntuales en el ADNmt (cf. D02-D03, D05). Sin embargo, ninguno comparte las características técnicas del procedimiento reivindicado en la solicitud, pues no relacionan de manera específica los cambios en el perfil de metilación de la región D-loop y/o del gen ND1 del ADNmt con la enfermedad de Alzheimer o con la enfermedad de Parkinson. Además, dicho procedimiento no se deduce de una manera obvia combinando la información descrita previamente en este campo de la técnica. Por consiguiente, el método reivindicado en la solicitud de patente se considera nuevo e inventivo sobre la base de los documentos D01-D09.

1.2. La presente solicitud satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes, pues el objeto de las reivindicaciones 1-19 es nuevo y tiene actividad inventiva de acuerdo con los Arts. 6.1. y 8.1. de la Ley de Patentes.