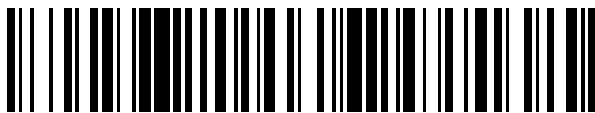


(19)



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 INVENCIÓN

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, 3^a 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.

MARCADORES MITOCONDRIALES DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS**DESCRIPCIÓN****5 CAMPO DE LA INVENCIÓN**

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

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Existe un número considerable de enfermedades neurodegenerativas que están causadas o 10 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 15 péptido β -amiloide en las placas seniles y la EP está asociada con la formación de agregados anormales de α -sinucleina que constituyen el componente principal de los 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 delecciones 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 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. 30 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,

5 así como para diagnosticar del estadio de dichas enfermedades y pronosticar la evolución de las mismas.

COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

En un primer aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para diagnosticar o 10 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:

- 15 (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 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 25 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 30 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 35 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 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

10 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.

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 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;
- 25 (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

30 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

5 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.

10 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 15 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.

20 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 25 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.

30 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:

- 35 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
e) los sitios CHH de la región D-loop mostrados en la Tabla 5.
- 10 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,
- 35 en donde la citosina metilada en dicha posición se ha convertido a uracilo o en otra base que es distingible 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 entorinal 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 entorinal 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 INVENCIÓN

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 5 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, 10 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 15 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 20 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 25 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 30 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 35 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.
- 15 El término “enfermedad de Alzheimer” o “demencia senil” o EA se refiere a un deterioro 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

30 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 (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 neocortical 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.,

5 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 -sinucleina en los denominados cuerpos de Lewy. La “sustancia negra” es un núcleo de los ganglios basales 10 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 coreuleus y al núcleo del rafe
- 15 - 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 alocórtex.
- Estadio V: el área afectada se extiende a la corteza insular, a la circunvolución cingulada y a la circunvolución temporal.
- 20 - 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., chimpancés y otros simios y especies de monos), 25 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.

30

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.

35 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 biofluído. Las muestras pueden ser obtenidas por métodos convencionales conocidos por el experto en la materia.

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

15 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 determinar el riesgo de desarrollar la EP, dicha muestra de tejido cerebral es una muestra obtenida de la sustancia negra.

20 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 biofluído 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 (Sambrook *et al.*, 2001. "Molecular cloning: a Laboratory Manual", 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., Vol. 1-3) que incluyen sin limitación, centrifugaciones en gradi

25 entes 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.

35 Si se desea, el 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 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 5 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 cultured 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 10 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 (-CH₃) a los nucleótidos de ADN citosina (C) o adenina (A). La 15 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 20 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.

25 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.

30 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 35 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 5 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.

10 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 15 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 20 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 25 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

5 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

10 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 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 5 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.

10 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.

15

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.

20 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 5 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 10 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 15 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 10 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.

15 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 20 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

5 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.

10 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.

15 20 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.

25 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
 - 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
 - 10 (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.
 - 15 (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
 - 20 (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
- 25 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
- 30 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.
- 35

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, 10 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.
- 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 sufurilasa, luciferasa y apirasa y emplea como sustratos adenosina 5' fosfatosulfato (APS) y luciferina.

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 30 de una citosina no metilada a otro nucleótido que distinguirá la citosina no metilada de la 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, 35 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. 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 5 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 10 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 15 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 20 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 25 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 30 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 35 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 5 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 10 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 15 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 20 unidas sondas específicas y producen una señal cuando se unen a secuencias complementarias.

20 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 25 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.

30 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 35 utilizadas incluyen *Smal*, *SacII*, *EagI*, *MspI*, *HpaII*, *BstUI* y *BssHII*, por ejemplo.

35 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 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 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.

25

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 30 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 35 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 la Tabla 5

20 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 10 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,
- 15 (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 20 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 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 es candidato a recibir un tratamiento dirigido a prevenir la enfermedad de Parkinson.

30

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 35 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 galantamina (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 ropinirola.

15

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 mismo significado en el segundo método de la invención.

25

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 biofluído. Las muestras pueden ser obtenidas por métodos convencionales conocidos por el experto en la materia.

30

En una realización todavía más particular, el biofluído 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.

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

- 5 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.

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

10 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.

En otra realización particular, el segundo método de la invención comprende determinar el

25

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.

En otra realización particular, el segundo método de la invención comprende determinar en

35

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.
- 15 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 del gen ND1, mostrados en la Tabla 4.
- 20 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 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 segundo 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 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 CHH de la región D-loop, mostrados en la Tabla 5.
- 35 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 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 5 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 10 10 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 15 15 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 20 20 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 25 25 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 30 30 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 35 35 mostrados en la Tabla 3 y en todos los sitios CHG del gen ND1 mostrados en la Tabla 4

- 5 (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.

- 10 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, 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.
- 15

- 20 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.

- 25 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,
- 30
- 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
- 35 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 10 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

15 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

20 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 25 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

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

5 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.

10 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 15 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.

20 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.

25 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”.

30

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 35 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
- 5 (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
- 10 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.
- 15 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
- 20 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

25 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,

30 - 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
- 35

- 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.

- 20 La expresión “avance de la enfermedad de Parkinson” 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 EP (de acuerdo con la afectación cerebral y/o la sintomatología o manifestaciones clínicas de la enfermedad presentes en dicho sujeto) se 25 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 EP.

- 30 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 biofluído. Las muestras pueden ser obtenidas por métodos convencionales conocidos por el experto en la materia.

En una realización todavía más particular, el biofluído 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 de la Tabla 1.

15 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.

- 35 En otra realización particular, el tercer método de la invención comprende determinar el 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
- 5 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 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,
- 30 (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

- 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 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.

15 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 20 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.

25 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.

30 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

35 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 5 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 10 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 15 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 20 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 25 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 30 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 35 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

5 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.

10 Como el experto en la materia sabe, una muestra que comprende ADN mitocondrial puede ser homoplásica o heteroplásica. El término “heteroplasmia” o “ADN mitocondrial heteroplásico” 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 “homoplasmia” o “ADN mitocondrial 15 homoplásico” 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.

20 En una realización particular, en el contexto de la presente invención la muestra de ADN mitocondrial es homoplásica, 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 homoplásica, el cuarto método de la invención 25 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 30 mitocondrial homoplásica 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 homoplásica de un sujeto es indicativo de que el sujeto no padece la 35 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 heteroplásica, 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 5 heteroplasmia 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.

10

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 heteroplasmia como en los casos en los presente 15 homoplasmia. Así, en el caso de sujetos cuyo ADNmt es homoplásico, 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 polimorfismos 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 heteroplásico, existirá una población de 20 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%.

25

La determinación de la homoplasmia y heteroplasmia así como el porcentaje de heteroplasmia o el “grado de heteroplasmia” 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 heteroplásica incluyen pero 30 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 heteroplasmia mediante la técnica PCR-RFLP consiste en una primera etapa, en la amplificación de la región del material 35 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
- 5 un único patrón de bandas, en cuyo caso la muestra es homoplásica. 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 heteroplásica.
- 10 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
- 15 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.
- 20 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
- 25 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.
- 30 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 biofluído. Las muestras pueden ser obtenidas por métodos convencionales conocidos por el experto en la materia.
- En una realización todavía más particular, el biofluído se selecciona de sangre periférica o
- 35 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.
- 10 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

5 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

10 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

15 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

20 en el contexto del primer, segundo, tercero 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

25 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

30 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

35 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 heteroplasmia como en los casos en los presente homoplasmia. Así, en el caso de sujetos cuyo ADNmt es homoplásico, 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 polimorfismos indicativo de que el paciente es 5 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 heteroplásico, 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 10 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 biofluído. Las muestras 15 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 homoplásica, en cuyo caso todas las mitocondrias presentes en el sujeto contienen material genético idéntico por lo que todas las mitocondrias de un sujeto 20 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 homoplásica, 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 25 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 homoplásica 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 30 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 homoplásica de un paciente es indicativo de que dicho paciente no es candidato a recibir un tratamiento preventivo de la enfermedad de Alzheimer.

35 En otra realización particular y preferida de la invención, la muestra de ADN mitocondrial es heteroplásica, 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 heteroplasmia 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 5 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 homoplásica o heteroplásica así como para 10 determinar el grado de heteroplasmia 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.

15 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 20 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 25 mediante PCR-RFLP.

Polinucleótidos de la invención

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un ácido nucleico (de aquí en adelante 30 "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 35 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.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un ácido nucleico (de aquí en adelante 5 “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.

En una realización particular, el quinto polinucleótido de la invención comprende al menos 9, 10 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 otro aspecto, la presente invención se refiere a un ácido nucleico (de aquí en adelante 15 “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.

En una realización particular, el séptimo polinucleótido de la invención comprende al menos 35 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 5 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 10 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 15 “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.

20 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.

25

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 30 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.

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 20 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, 25 Altschul, S., et al, J. Mol Biol. 215: 403-10).

30 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 35 temperatura relativa que puede utilizarse. Como resultado, se deduce que temperaturas relativas superiores tenderían a hacer las condiciones de reacción más rigurosas, mientras

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 15 salmón sonicado (50 mg / ml), 0,1% de SDS, y 10% de sulfato de dextrano a 42 ° C, con 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 20 Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor 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 la invención.

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 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.

30

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 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.

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 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 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 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 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 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 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 5 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 10 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 15 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 20 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 25 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 5 cuando dicho sitio CHH está metilado y al menos 30 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 mostrado en la Tabla 5 cuando dicho sitio CHH está metilado y al menos 35 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

5 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

10 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

15 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,

20 (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 distingible de citosina en sus propiedades de hibridación.

25 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

30 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 35 100% 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

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.

15

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.

20

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.

25

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 entorinal de casos de patología relacionada con EA

5 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*)

10 (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

15 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

20 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

25 metilación diferencial (Tabla 6).

Carril	Amplicón	Sitio	Criterio	Nº de sitios	C vs EA-I-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 Hochberg (1995), C: control, EA: enfermedad de Alzheimer, EP: enfermedad de Parkinson.

MID	Carri	Región cerebral	Diagnóstico	Estadio de Braak para EA	Estadio 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	1/A	0	M	57	5
10	L1	entorrinal	EA asociada	1/A	0	M	64	2.15
11	L1	entorrinal	EA asociada	1	0	H	59	16.3
12	L1	entorrinal	EA asociada	II/A	0	M	86	4.15
13	L1	entorrinal	EA asociada	1/A	0	H	67	14.4
14	L1	entorrinal	EA asociada	II/A	0	H	66	4.55
15	L1	entorrinal	EA asociada	1/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	1/A	0	M	57	5
10	L1	entorrinal	EA asociada	1/A	0	M	64	2.15
11	L1	entorrinal	EA asociada	1	0	H	59	16.3
12	L1	entorrinal	EA asociada	II/A	0	M	86	4.15
21	L1	entorrinal	EA asociada	II	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	Carri	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	ACGAGTGCCT	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 5 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 10 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 5 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 10 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 $4,98 \pm 1,57$ 15 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 20 *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 25 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

30 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

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 5 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'- CGTATGCCTCCCTCGGCCA (SEQ ID NO: 33) - TCAG -MID – secuencia específica del molde -3'; Cebador *reverse* (Cebador B- Key-MID - secuencia específica del molde): 5'- CTATGCGCCTTGCCAGCCCCGC (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' - TAGGGGTTTTTGATTATTATTTT -3' (SEQ ID NO: 2) y D- Loop -reverso , 5'- ACAAACATTCAATTATTATTATATCCT -3' (SEQ ID NO: 3); ND1 - directo, 5' - ATGGTTAATTTTTATTTTATTGTATT -3' (SEQ ID NO: 4) y ND1 -reverso , 5'- TAATTAAATTAATACTCACCTAATCAA -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 10 del mapa del ADN mitocondrial humano (www.mitomap.org).

15

15

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 25 μ l . Cada reacción de PCR 25 consistió en: 1x de FastStart 10x Buffer #2, 0,05U/ μ l 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 30 *Applied Biosystems Verity ® (Applied Biosystems, Madrid, España)* usando las siguientes 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 5 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).

10 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> .

15 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, 20 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

25 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 30 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

Heteroplasmia: 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 5en 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 candidato a recibir un tratamiento dirigido a prevenir la enfermedad de Alzheimer o

15 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;
 - (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
- 30 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.
10. 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.
15. 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.
20. 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.
25. 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.
30. 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.

15

14. Método según la reivindicación 13, en donde dicho tejido sólido es tejido cerebral.

20

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:

- 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,

25

(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:

- 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.

30

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:

- (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

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:

- (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

en donde la citosina metilada en dicha posición se ha convertido a uracilo o a otra base que es distingible 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)

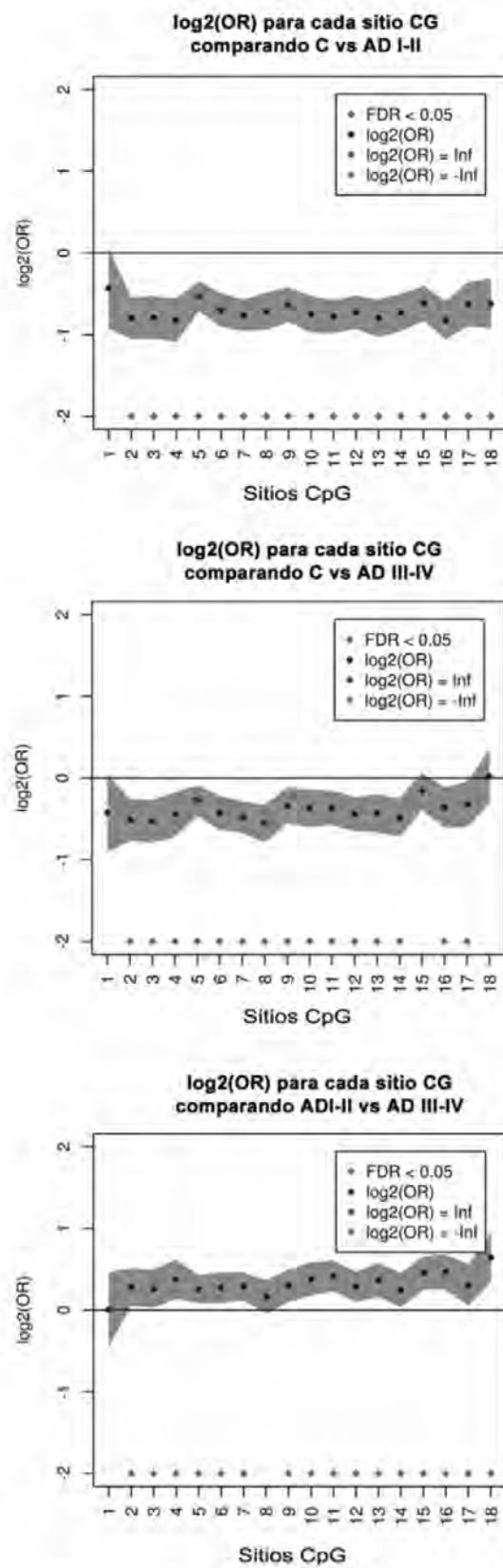
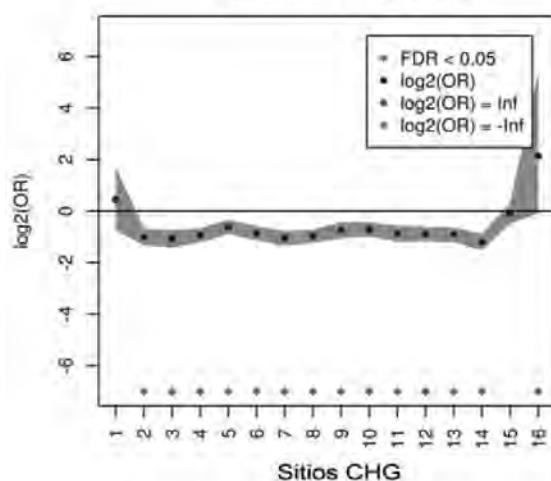


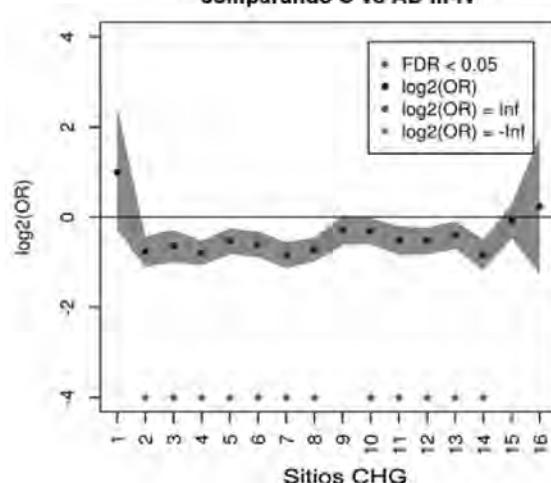
Figura 1

B)

log₂(OR) para cada sitio CHG
comparando C vs AD I-II



log₂(OR) para cada sitio CHG
comparando C vs AD III-IV



log₂(OR) para cada sitio CHG
comparando ADI-II vs AD III-IV

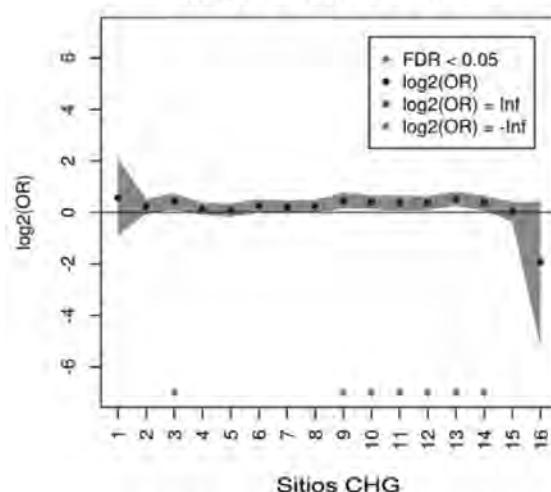
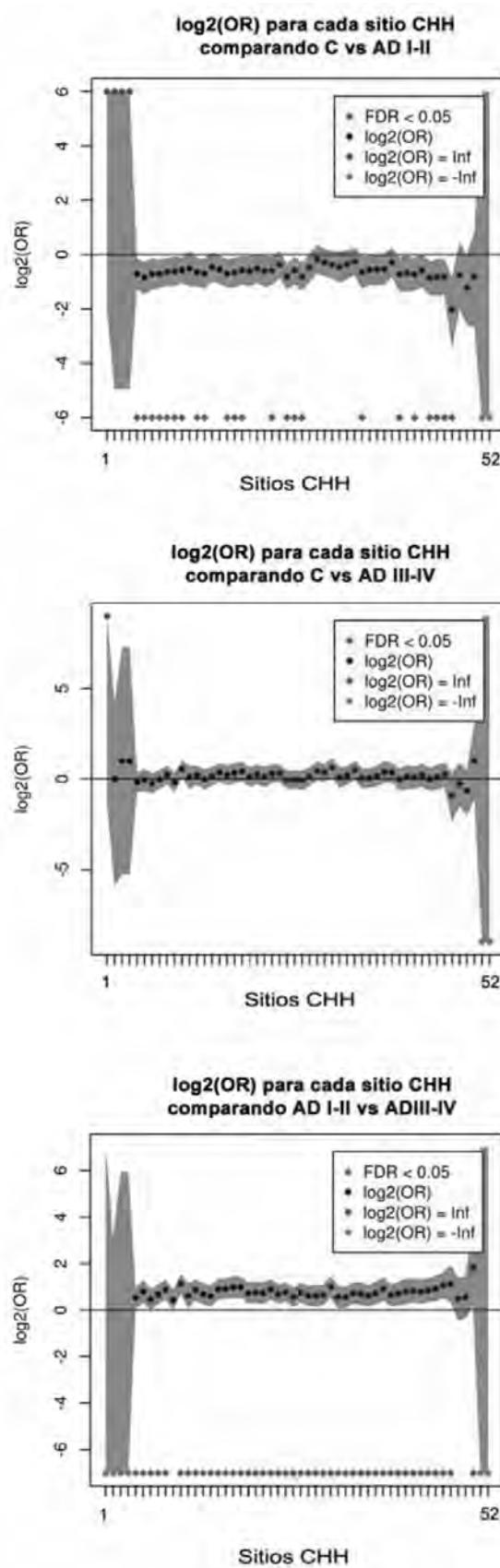


Figura 1 (cont.)

C)

**Figura 1 (cont.)**

A)

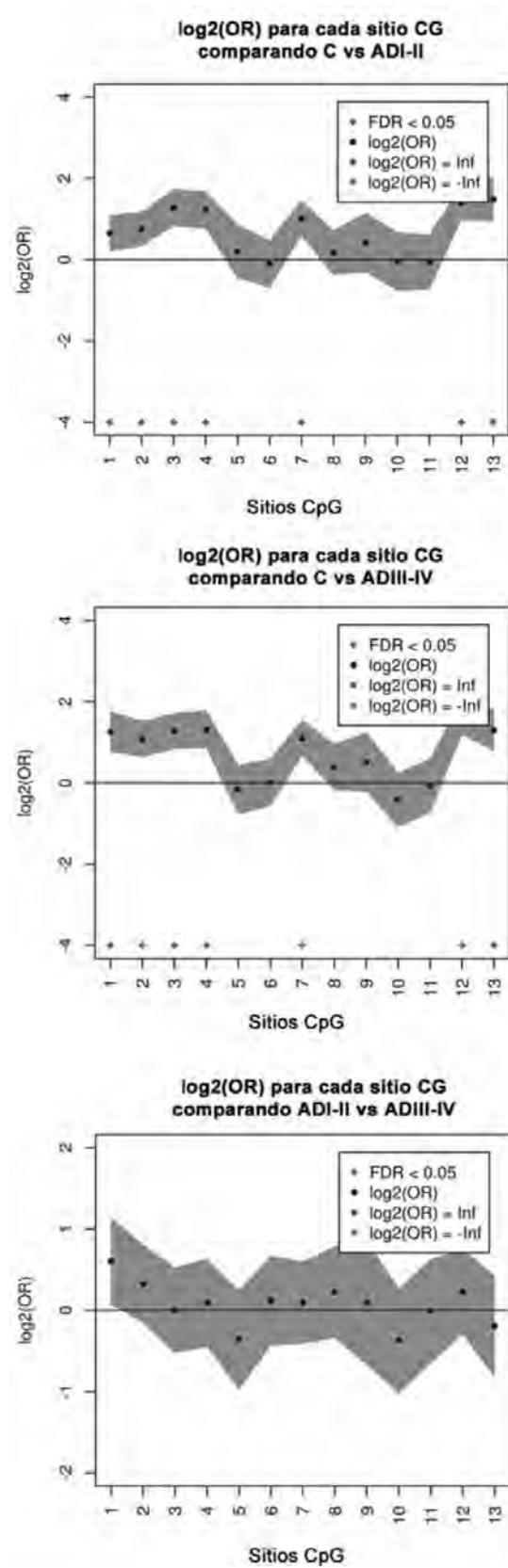
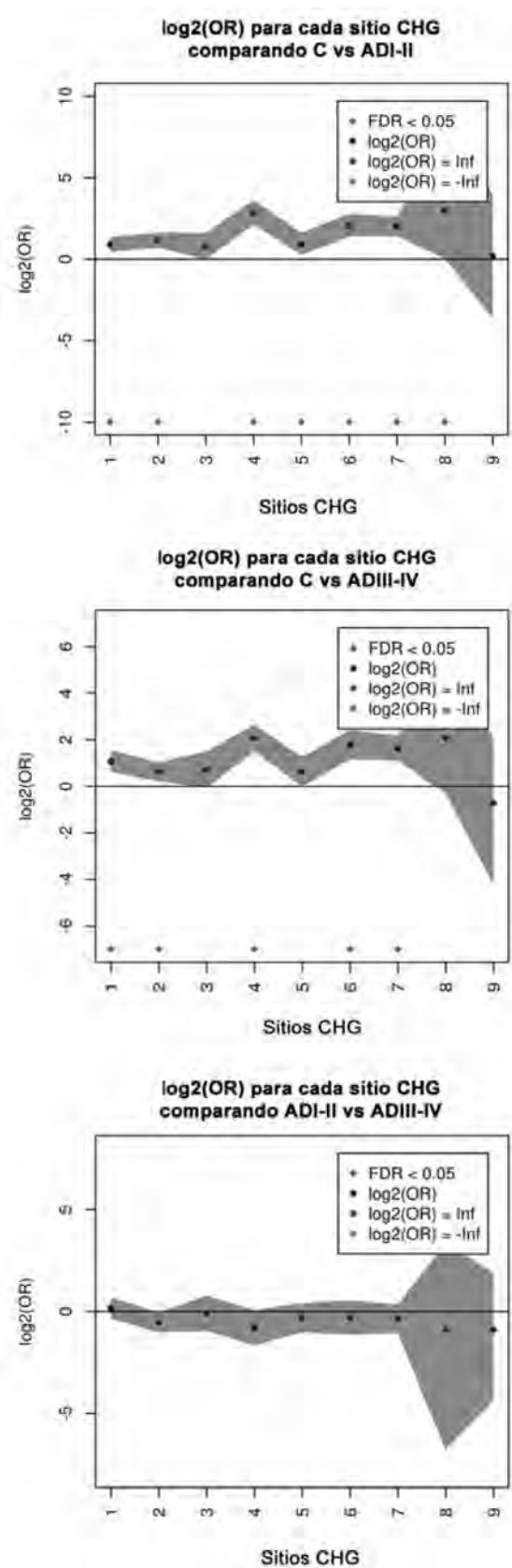


Figura 2

B)

**Figura 2 (cont.)**

C)

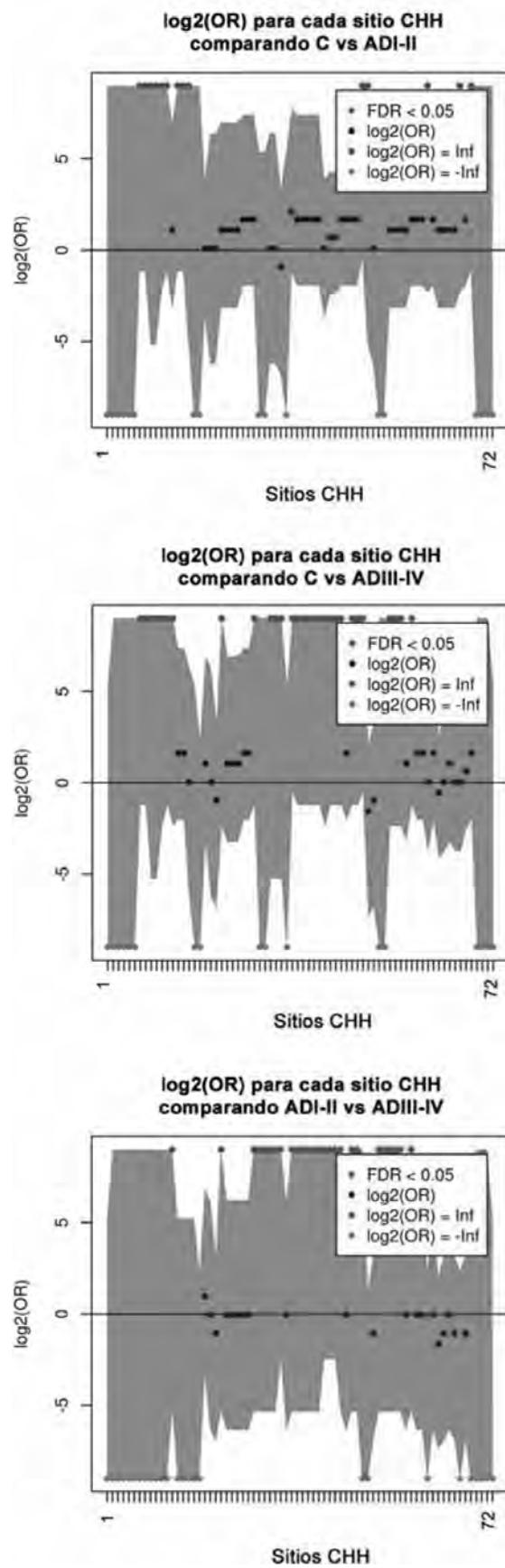


Figura 2 (cont.)

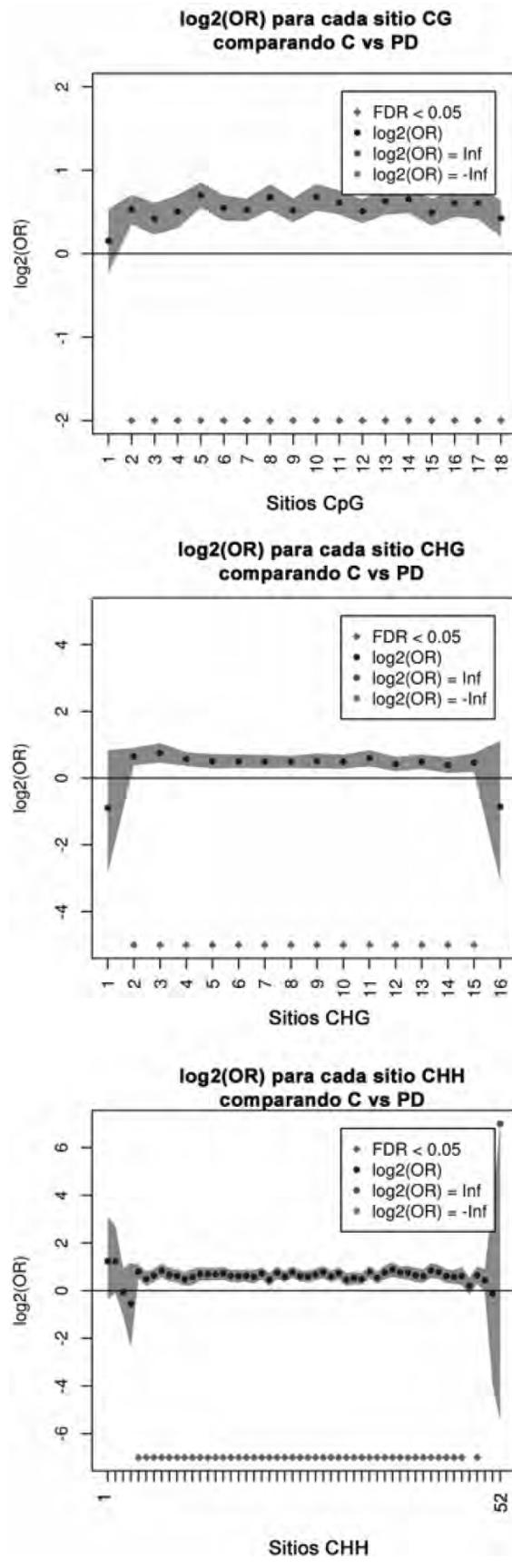


Figura 3

ES 2 546 743 B1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> INSTITUT D' INVESTIGACIÓ BIOMÉDICA 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 es a, c, g, or t

<400> 1
gatcacaggt ctatcacccct attaaccact cacgggagct ctccatgcat ttggtatttt 60
cgtctggggg gtatgcacgc gatagcattg cgagacgctg gagccggagc accctatgtc 120
gcagtatctg tctttgattc ctgcctcattc ctattattta tcgcacccat gttcaatattt 180
acaggcgaac atacttacta aagtgtgtta attaattaat gcttgttagga cataataata 240
acaattgaat gtctgcacag ccactttcca cacagacatc ataacaaaaa atttccacca 300
aaccccccct ccccccgttc tggccacagc acttaaacac atctctgcca aaccccaaaa 360
acaaagaacc ctaacaccag cctaaccaga tttcaaattt tatctttgg cggtagcact 420
ttttaacagt caccggccaa ctaacacatt atttccctt cccactccca tactactaat 480
ctcatcaata caaccccccgc ccattcattacc cagcacacac acaccgtgc taacccata 540
ccccgaacca accaaacccc aaagacaccc cccacagttt atgttagctta cctcctcaaa 600
gcaatacact gaaaatgttt agacgggctc acatcacccc ataaacaaat aggtttggtc 660
ctagccttcc tattagctct tagtaagatt acacatgcaa gcatccccgt tccagttagt 720
tcaccctcta aatcaccacg atcaaaaaggaa acaagcatca agcacgcagc aatgcagctc 780
aaaacgctta gcctagccac acccccacgg gaaacagcag tgattaacct ttagcaataa 840
acgaaagttt aactaagcta tactaaccac aggggtggtc aatttcgtgc cagccaccgc 900
ggtcacacga ttaacccaag tcaatagaag ccggcgtaaa gagtgttta gatcacccccc 960
tcccccaataa agctaaaact cacctgagtt gtaaaaaaact ccagttgaca caaaatagac 1020
tacgaaagtg gcttaacat atctgaacac acaatagcta agacccaaac tgggattaga 1080
taccccaacta tgcttagccc taaacctcaa cagttaaatc aacaaaactg ctcgcccagaa 1140

ES 2 546 743 B1

cactacgagc cacagcttaa aactcaaagg acctggcggt gcttcatatac cctctagagg 1200
agcctgttct gtaatcgata aaccccgatc aacctcacca cctcttgctc agcctatata 1260
ccgcccattt cagcaaaccc tcatggc tacaaagtaa gcgcaagtac ccacgtaaag 1320
acgttaggtc aaggtgttagc ccatgaggtg gcaagaaatg ggctacattt tctaccccg 1380
aaaactacga tagcccttat gaaacttaag ggtcgaagggt ggatttagca gtaaaactaag 1440
agtagagtgc ttatgttgc acggccctga agcgcgtaca caccggccgt caccctcctc 1500
aagtatactt caaaggacat ttaactaaaa cccctacgca ttttatataga ggagacaagt 1560
cgtaacatgg taagtgtact ggaaagtgc acggacgaa ccagagtgtac gcttaacaca 1620
aagcacccaa ctacactta ggagatttca acttaacttg accgctctga gctaaaccta 1680
gccccaaacc cactccaccc tactaccaga caaccttagc caaaccattt acccaaataa 1740
agtataggcg atagaaatttgc aaacctggcg caatagat agtaccgcaa gggaaagatg 1800
aaaaattata accaagcata atatagcaag gactaaccctt tataccttct gcataatgaa 1860
ttaactagaa ataactttgc aaggagagcc aaagctaaga ccccgaaac cagacgagct 1920
acctaagaac agctaaaaga gcacacccgt ctatgttagca aaatagtggg aagatttata 1980
ggtagaggcg acaaaccctac cgagcctgggt gatagctgggt tgtccaagat agaatcttag 2040
ttcaacttta aatttgccca cagaaccctc taaatcccct tgtaaattta actgttagtc 2100
caaagagggaa cagctctttg gacactagga aaaaaccttg tagagagagt aaaaaattta 2160
acacccatag taggcctaaa agcagccacc aattaagaaa gcgttcaagc tcaacacccca 2220
ctacctaaaa aatcccaaacc atataactga actcctcaca cccaaatttgc ccaatctatc 2280
accctataga agaactaatg ttagtataag taacatgaaa acattctctt ccgcataagc 2340
ctgcgtcaga ttaaaacact gaactgacaa ttaacagccc aatatctaca atcaacccaa 2400
aagtcttttac taccctcact gtcaacccaa cacaggcatg ctcataagga aaggttaaaa 2460
aaagtaaaag gaactcggca aatcttaccc cgcctgttta ccaaaaacat cacctctagc 2520
atcaccagta ttagaggcac cgcctgccc gtgacacatg tttaacggcc gcggtagcc 2580
aaccgtgcaa agtaggcata atcacttgc ttctaaatag ggacctgtat gaatggctcc 2640
acgagggttc agctgtctct tacttttaac cagtgaaatt gacctgccc tgaagaggcg 2700
ggcataacac agcaagacga gaagacccta tggagcttta atttattaaat gcaaacagta 2760
cctaacaaac ccacaggtcc taaactacca aacctgcatt aaaaatttgc gttggggcga 2820
cctcggagca gaacccaaacc tccgagcagt acatgctaag acttcaccag tcaaagcgaa 2880
ctactatact caattgtatcc aataacttgc ccaacggaaac aagttaccct agggataaca 2940

ES 2 546 743 B1

gcgcaatcct	attctagagt	ccatatcaac	aatagggttt	acgacctcga	tgttggatca	3000
ggacatcccg	atggtgcagc	cgctattaaa	ggttcggttg	ttcaacgatt	aaagtccctac	3060
gtgatctgag	ttcagaccgg	agtaatccag	gtcggttct	atctacnttc	aaattcctcc	3120
ctgtacgaaa	ggacaagaga	aataaggcct	acttcacaaa	gcmccttccc	cgtaaatga	3180
tatcatctca	acttagtatt	atacccacac	ccacccaaga	acagggttg	ttaagatggc	3240
agagcccggt	aatcgataa	aactaaaaac	tttacagtca	gaggttcaat	tcctttctt	3300
aacaacatac	ccatggccaa	cctcctactc	ctcattgtac	ccattctaat	cgcaatggca	3360
ttcctaattgc	ttacccgaacg	aaaaattcta	ggctatatac	aactacgcaa	aggccccaaac	3420
gtttaggccc	cctacgggct	actacaaccc	ttcgctgacg	ccataaaaact	cttcaccaaa	3480
gagccctaa	aacccgccac	atctaccatc	accctctaca	tcaccgcccc	gaccttagct	3540
ctcaccatcg	ctcttctact	atgaacccccc	ctcccccatac	ccaacccct	ggtcaacctc	3600
aacctaggcc	tcctatttat	tctagccacc	tctagcctag	ccgttactc	aatcctctga	3660
tcagggtgag	catcaaactc	aaactacgcc	ctgatcggcg	caactgcgagc	agtagcccaa	3720
acaatctcat	atgaagtcac	cctagccatc	attctactat	caacattact	aataagtggc	3780
tccttaacc	tctccaccct	tatcacaaca	caagaacacc	tctgattact	cctgccatca	3840
tgacccttgg	ccataatatg	atttatctcc	acactagcag	agaccaaccg	aaccccttc	3900
gaccttgccg	aaggggagtc	cgaactagtc	tcaggcttca	acatcgaata	cgccgcaggc	3960
cccttcgccc	tattcttcat	agccgaatac	acaacattta	ttataataaa	caccctcacc	4020
actacaatct	tccttaggaac	aacatatgac	gcactctccc	ctgaactcta	cacaacatat	4080
tttgcacca	agaccctact	tctaaccctcc	ctgttcttat	gaattcgaac	agcataacccc	4140
cgattccgct	acgaccaact	catacaccc	ctatgaaaaa	acttcctacc	actcacccta	4200
gcattactta	tatgatatgt	ctccataaccc	attacaatct	ccagcattcc	ccctcaaacc	4260
taagaaatat	gtctgataaa	agagttactt	tgatagagta	aataatagga	gcttaaacc	4320
ccttatttct	aggactatga	gaatcgaacc	catccctgag	aatccaaaat	tctccgtgcc	4380
acctatcaca	ccccatccta	aagtaaggc	agctaaataa	gctatcgggc	ccataacccg	4440
aaaatgttgg	ttataccctt	cccgtaactaa	ttaatcccct	ggcccaaccc	gtcatctact	4500
ctaccatctt	tgcaggcaca	ctcatcacag	cgctaagctc	gcactgattt	tttacctgag	4560
taggcctaga	aataaacatg	ctagcttta	ttccagttct	aaccaaaaaa	ataaacccctc	4620
gttccacaga	agctgccatc	aagtatttcc	tcacgcaagc	aaccgcattc	ataatccttc	4680
taatagctat	cctcttcaac	aatatactct	ccggacaatg	aaccataacc	aatactacca	4740
atcaatactc	atcatattaata	atcataatag	ctatagcaat	aaaactagga	atagccccc	4800

ES 2 546 743 B1

ttcacttctg agtcccagag gttacccaag gcacccctct gacatccggc ctgcttcttc	4860
tcacatgaca aaaactagcc cccatctcaa tcatatacca aatctctccc tcactaaacg	4920
taaggcttct cctcactctc tcaatcttat ccatcatagc aggcagttga ggtggattaa	4980
accaaaccct gctacgcaaa atcttagcat actcctcaat tacccacata ggatgaataa	5040
tagcagttct accgtacaac cctaacadtaa ccattcttaa tttaactatt tatattatcc	5100
taactactac cgcatcccta ctactcaact taaactccag caccacgacc ctactactat	5160
ctcgcacctg aaacaagcta acatgactaa cacccttaat tccatccacc ctccctctccc	5220
taggaggcct gcccccgcta accggcttt tgcccaaatg ggccattatc gaagaattca	5280
caaaaaacaa tagcctcatc atccccacca tcatagccac catcaccctc cttaacctct	5340
acttctacct acgcctaatt tactccaccc caatcacact actccccata tctaacaacg	5400
taaaaataaa atgacagttt gaacatacaa aacccacccc attcctcccc acactcatcg	5460
cccttaccac gctactccta cctatctccc cttttatact aataatctta tagaaattta	5520
ggttaaatac agaccaagag cttcaaaagc cctcagtaag ttgcaatact taatttctgt	5580
aacagctaag gactgcaaaa ccccactctg catcaactga acgcaaatac gccactttaa	5640
ttaagctaag cccttactag accaatgggaa cttaaacccaa caaacactta gttaacagct	5700
aagcacccta atcaactggc ttcaatctac ttctcccgcc gccgggaaaa aaggcgggag	5760
aagccccggc aggttgaag ctgcttcttc gaatttgcaa ttcaatatga aaatcacctc	5820
ggagctggta aaaagaggcc taacccctgt cttagattt acagtccat gcttcactca	5880
gccattttac ctcaccccca ctgatgttcg ccgaccgttg actattctct acaaaccaca	5940
aagacattgg aacactatac ctattattcg ggcacatgac tggagtccat ggcacagctc	6000
taaggcctcct tattcgagcc gagctggcc agccaggcaa ccttcttaggt aacgaccaca	6060
tctacaacgt tatcgtcaca gcccacatgc ttgtataat cttcttcata gtaataacccaa	6120
tcataatcgg aggcttggc aactgactag ttcccctaatt aatcggtgcc cccgatatgg	6180
cgtttccccc cataaacaac ataagcttct gactcttacc tccctctctc ctactcctgc	6240
tcgcacatctgc tatagtgag gccggagcag gaacaggttg aacagtctac cttcccttag	6300
cagggacta ctcccacccct ggagcctccg tagacctaac catcttctcc ttacacctag	6360
caggtgtctc ctctatctta gggccatca atttcatcac aacaattatc aatataaaac	6420
cccccgtccat aacccaaatac caaacgcccc tcttcgtctg atccgtccat atcacagcag	6480
tcctacttct cctatctctc ccagtcctag ctgctggcat cactatacta ctaacagacc	6540
gcaacacctaa caccaccttc ttgcaccccg ccggaggagg agacccatt ctataccaac	6600

ES 2 546 743 B1

acctattctg attttcggc caccctgaag tttatattct tattcctacca ggottcggaa	6660
taatctccca tattgttaact tactactccg gaaaaaaaga accatttgga tacataggtta	6720
tggtctgagc tatgatatca attggcttcc tagggtttat cgtgtgagca caccatata	6780
ttacagtagg aatagacgta gacacacgag catattcac ctccgctacc ataatcatcg	6840
ctatccccac cggcgtcaaa gtathtagct gactcgccac actccacgga agcaatatga	6900
aatgatctgc tgcaagtgc tgagccctag gattcatctt tctttcacc gtaggtggcc	6960
tgactggcat tgtatttagca aactcatcac tagacatcgt actacacgac acgtactacg	7020
ttgttagccca cttccactat gtcctatcaa taggagctgt atttgccatc ataggaggct	7080
tcattcactg atttccccta ttctcaggct acaccctaga ccaaacctac gccaaaatcc	7140
atttcactat catattcatc ggcgtaaatc taactttctt cccacaacac tttctggcc	7200
tatccggaat gccccgacgt tactcggact accccgatgc atacaccaca tgaaacatcc	7260
tatcatctgt aggctcattc atttctctaa cagcagtaat attaataatt ttcatgattt	7320
gagaagcctt cgcttcgaag cgaaaagtcc taatagtaga agaaccctcc ataaacctgg	7380
agtgactata tggatgcccc ccaccctacc acacattcga agaaccctga tacataaaat	7440
ctagacaaaaa aaggaaggaa tcgaaccccc caaagctggt ttcaagccaa ccccatggcc	7500
tccatgactt tttcaaaaag gtatttagaaa aaccattca taactttgtc aaagttaaat	7560
tataggctaa atcctatata tcttaatggc acatgcagcg caagtaggtc tacaagacgc	7620
tacttccct atcatagaag agcttattcac ctccatgat cacgcccctca taatcatttt	7680
ccttatctgc ttccctagtcc tgtatgccct ttccctaaca ctcacaacaa aactaactaa	7740
tactaacatc tcagacgctc aggaaataga aaccgtctga actatcctgc ccgccatcat	7800
cctagtcctc atcgccctcc catccctacg catccttac ataacagacg agtcaacga	7860
tccctccctt accatcaaat caattggcca ccaatggtac tgaacctacg agtacaccga	7920
ctacggcggg ctaatttca actcctacat acttccccca ttattcctag aaccaggcga	7980
cctgcgactc cttgacggttg acaatcgagt agtactcccg attgaagccc ccattcgtat	8040
aataattaca tcacaagacg tcttgcactc atgagctgtc cccacattag gctaaaaaac	8100
agatgcaatt cccggacggtc taaaccaaac cactttcacc gctacacgac cgggggtata	8160
ctacggtcaa tgctctgaaa tctgtggagc aaaccacagt ttcatgcca tcgtcctaga	8220
attaattccc ctaaaaatct ttgaaatagg gcccgtattt accctatacg acccccctcta	8280
ccccctctag agcccactgt aaagctaact tagcattaac ctttaagtt aaagattaag	8340
agaaccaaca cctctttaca gtgaaatgcc ccaactaaat actaccgtat ggcccaccat	8400
aattacccccc atactcctta cactattcct catcacccaa ctaaaaatata taaacacaaaa	8460

ES 2 546 743 B1

ctaccaccta cctccctcac caaagcccat aaaaataaaa aattataaca aaccctgaga	8520
acccaaaatga acgaaaatct gttcgcttca ttcattgccc ccacaatcct aggcctaccc	8580
gccgcagtagc tgatcattct atttccccct ctattgatcc ccacacctaa atatctcatc	8640
aacaaccgac taatcaccac ccaacaatga ctaatcaaac taacctcaaa acaaatacgata	8700
accatacaca acactaaagg acgaacctga tctcttatac tagtacccctt aatcattttt	8760
atggccacaa ctaacccctt cggactcctg cctcaactcat ttacaccaac cacccaaacta	8820
tctataaacc tagccatggc catccctta tgagcgggca cagtgattat aggcttcgc	8880
tctaagatta aaaatgccct agcccacttc ttaccacaag gcacacccatc acccccttatac	8940
cccatactag ttattatcga aaccatcagc ctactcattc aaccaatacg cctggccgta	9000
cgcctaaccg ctaacattac tgcaggccac ctactcatgc acctaattgg aagcgccacc	9060
ctagcaatat caaccattaa cttccctct acacttatca tcttcacaat tctaattcta	9120
ctgactatcc tagaaatcgc tgtcgcctta atccaaggct acgtttcac acttctagta	9180
agcctctacc tgcacgacaa cacataatga cccaccaatc acatgcctat catatagtaa	9240
aacccagccc atgaccctta acaggggccc tctcagccct cctaatgacc tccggcctag	9300
ccatgtgatt tcacttccac tccataacgc tcctcataact aggctacta accaacacac	9360
taaccatata ccaatgatgg cgcgatgtaa cacgagaaag cacataccaa ggccaccaca	9420
caccacctgt cccaaaaggc cttcgatacg ggataatcct atttattacc tcagaagttt	9480
ttttcttcgc aggattttc tgagcctttt accactccag cctagccctt accccccaat	9540
taggagggca ctggccccc acaggcatca ccccgctaaa tcccctagaa gtccactcc	9600
taaacacatc cgtattactc gcatcaggag tatcaatcac ctgagctcac catagtctaa	9660
tagaaaacaa ccgaaaccaa ataattcaag cactgcttat tacaatttta ctgggtctct	9720
attttaccct cctacaagcc tcagagtact tcgagtcctc cttcaccatt tccgacggca	9780
tctacggctc aacattttt gtagccacag gcttccacgg acttcacgac attattggct	9840
caactttcct cactatctgc ttcatccgcc aactaatatt tcactttaca tccaaacatc	9900
actttggctt cgaagccgac gcctgatact ggcattttgt agatgtggtt tgactatttc	9960
tgtatgtctc catctattga tgagggctt actcttttag tataaatagt accgttaact	10020
tccaaattaac tagtttgac aacattcaaa aaagagtaat aaacttcgac ttaattttaa	10080
taatcaacac cctccctagcc ttactactaa taatttattac attttgacta ccacaactca	10140
acggctacat agaaaaatcc accccttacg agtgcggctt cgaccctata tccccggccc	10200
gcgtccctt ctccataaaa ttcttcttag tagctattac cttcttatta tttgatctag	10260

ES 2 546 743 B1

aaattgccct cctttaccc ctaccatgag ccctacaaac aactaacctg ccactaatag	10320
ttatgtcatc cctcttatta atcatcatcc tagccctaag tctggctat gagtgactac	10380
aaaaaggatt agactgaacc gaattggtat atagttaaa caaaacgaat gatttcgact	10440
cattaaatta tgataatcat atttaccaa tgccctcat ttacataaat attatactag	10500
catttaccat ctcacttcta ggaatactag tatatcgctc acacctcata tcctccctac	10560
tatgcctaga aggaataata ctatcgctgt tcattatagc tactctcata accctcaaca	10620
cccactccct cttagccaat attgtgccta ttgccatact agtcttgcc gcctgcgaag	10680
cagcggtggg cctagcccta ctatgcctaa tctccaacac atatggctaa gactacgtac	10740
ataacacctaaa cctactccaa tgctaaaact aatcgcccaca acaattatata tactaccact	10800
gacatgactt tccaaaaaac acataatttg aatcaacaca accacccaca gcctaattat	10860
tagcatcatc cctctactat ttttaacca aatcaacaac aacctattta gctgttcccc	10920
aacctttcc tccgacccccc taacaacccc cctcctaata ctaactacct gactcctacc	10980
cctcacaatc atggcaagcc aacgccactt atccagtgaa ccactatcac gaaaaaaaaact	11040
ctacctctct atactaatct ccctacaaat ctccttaatt ataacattca cagccacaga	11100
actaatcata ttttatatct tcttcgaaac cacacttacccc cccaccttgg ctatcatcac	11160
ccgatgaggc aaccagccag aacgcctgaa cgccaggcaca tacttcctat tctacaccct	11220
agtaggctcc cttccctac tcatcgact aatttacact cacaacaccc taggctact	11280
aaacattcta ctactcactc tcactgcca agaactatca aactcctgag ccaacaactt	11340
aatatgacta gcttacacaa tagttttat agtaaagata cctcttacg gactccactt	11400
atgactccct aaagccccatg tcgaagccccc catcgctggg tcaatagtagc ttggcgagtt	11460
actcttaaaaa ctagggcgct atggtataat acgcctcaca ctcatttcac accccctgac	11520
aaaacacata gcctacccct tccttgact atccctatga ggcataatata taacaagctc	11580
catctgccta cgacaaacag acctaaaatc gctcattgca tactcttcaa tcagccacat	11640
agccctcgta gtaacagcca ttctcatcca aacccctga agttcacccg ggcaggcat	11700
tctcataatc gcccacgggc ttacatcctc attactattc tgcctagcaa actcaaacta	11760
cgaacgcact cacagtcgca tcataatcct ctctcaagga cttcaaactc tactcccact	11820
aatagcttt tgatgacttc tagcaagcct cgctaacctc gccttacccc ccactattaa	11880
cctactggga gaactctctg tgcttagtaac cacgttctcc tgatcaaata tcactctcct	11940
acttacagga ctcaacatac tagtcacagc cctatactcc ctctacatata ttaccacaac	12000
acaatggggc tcactcaccc accacattaa caacataaaa ccctcattca cacgagaaaa	12060
caccctcatg ttcatacacc tatccccat tctcctccta tccctcaacc ccgacatcat	12120

ES 2 546 743 B1

taccgggttt tcctcttgc aatatagttt aaccaaaaca tcagattgt aatctgacaa	12180
cagaggctta cgaccctta tttaccgaga aagctcacaa gaactgctaa ctcatcccc	12240
catgtctaac aacatggctt tctcaacttt taaaggataa cagctatcca ttggtcttag	12300
gccccaaaaa ttttggtgca actccaaata aaagtaataa ccatgcacac tactataacc	12360
accctaacc acccttaacc tgacttccct aattcccccc atccttacca ccctcgtaa ccctaacaaa	12420
aaaaactcat acccccatta tgtaaaatcc attgtcgcat ccacctttat tatacgatctc	12480
ttccccacaa caatattcat gtgcctagac caagaagtta ttatctcgaa ctgacactga	12540
gccacaaccc aaacaacccca gctctcccta agcttcaaac tagactactt ctccataata	12600
ttcatccctg tagcattgtt cgttacatgg tccatcatag aattctcaact gtgatataata	12660
aactcagacc caaacattaa tcagttcttc aaatatctac tcatacttccct aattaccata	12720
ctaattcttag ttaccgctaa caacctattc caactgttca tcggctgaga gggcgttagga	12780
attatatcct tcttgctcat cagttgatga tacgcccggag cagatgccaa cacagcagcc	12840
attcaagcaa tcctatacaa ccgtatcggc gatatcggtt tcatacctcgc ctttagcatga	12900
tttattcctac actccaactc atgagaccca caacaaatag cccttctaaa cgctaattcca	12960
agcctcaccc cactactagg ctcctcccta gcagcagcag gcaaattcagc ccaatttaggt	13020
ctccacccct gactccctc agccatagaa ggccccaccc cagtcgtcgc cctactccac	13080
tcaagcacta tagttgttagc aggaatcttc ttactcatcc gcttccaccc cctagcagaa	13140
aatagcccac taatccaaac tctaacaacta tgcttaggctg ctatcaccac tctgttcgca	13200
gcagtctgctg cccttacaca aaatgacatc aaaaaaatcg tagccttctc cacttcaagt	13260
caactaggac tcataatagt tacaatcggc atcaaccaac cacaccttagc attcctgcac	13320
atctgtaccc acgccttctt caaagccata ctatttatgt gctccgggtc catcatccac	13380
aaccttaaca atgaacaaga tattcgaaaa ataggaggac tactcaaaac catacctctc	13440
acttcaacct ccctcaccat tggcagccta gcattagcag gaataccctt cctcacaggt	13500
ttctactcca aagaccacat catcgaaacc gcaaacatata catacacaata cgcttgagcc	13560
ctatctatta ctctcatcgc tacctccctg acaagcgcct atagcactcg aataattctt	13620
ctcaccctaa caggtcaacc tcgcttcccc acccttacta acattaacga aaataacccc	13680
accctactaa accccattaa acgcctggca gccggaagcc tattcgcagg atttctcatt	13740
actaacaaca tttcccccgc atcccccttc caaacaacaa tccccctcta cctaaaactc	13800
acagccctcg ctgtcacttt cctaggactt ctaacagccc tagacctcaa ctacctaacc	13860
aacaaactta aaataaaatc cccactatgc acatttatt tctccaacat actcgattc	13920

ES 2 546 743 B1

taccctagca tcacacacccg cacaatcccc tatctaggcc ttcttagcag ccaaaacctg	13980
cccctactcc tccttagacct aacctgacta gaaaagctat tacctaaaac aatttcacag	14040
caccaaatct ccacctccat catcacctca acccaaaaag gcataattaa actttacttc	14100
ctctctttct tcttcccact catcctaacc ctactcctaa tcacataacc tattccccg	14160
agcaatctca attacaatat atacaccaac aaacaatgtt caaccagtaa ctactactaa	14220
tcaacgccc a taatcataca aagccccgc accaatagga tcctccgaa tcaaccctga	14280
ccccctctcct tcataaaatta ttcagcttcc tacactatta aagtttacca caaccaccac	14340
cccatcatac tctttcaccc acagcaccaa tcctacctcc atcgctaacc ccactaaaac	14400
actcaccaag acctcaaccc ctgaccccca tgcctcagga tactcctcaa tagccatcgc	14460
tgttagatat ccaaagacaa ccatcattcc ccctaaataa attaaaaaaa ctattaaacc	14520
catataacct cccccaaaat tcagaataat aacacacccg accacaccgc taacaatcaa	14580
tactaaaccc ccataaatag gagaaggctt agaagaaaac cccacaaacc ccattactaa	14640
acccacactc aacagaaaca aagcatacat cattattctc gcacggacta caaccacgac	14700
caatgatatg aaaaaccatc gttgtatttc aactacaaga acaccaatga ccccaatacg	14760
caaaactaac cccctaataa aattaattaa ccactcattc atcgacctcc ccacccatc	14820
caacatctcc gcatgatgaa acttcggctc actccttggc gcctgcctga tcctccaaat	14880
caccacagga ctattcctag ccatgcacta ctcaccagac gcctcaacccg cctttcatc	14940
aatcgcccac atcactcgag acgtaaattha tggctgaatc atccgctacc ttacgccaa	15000
tggcgctca atattttta tctgccttt cctacacatc gggcgaggcc tatattacgg	15060
atcatttctc tactcagaaa cctgaaacat cggcattatc ctcctgcttg caactatagc	15120
aacagccttc ataggctatg tcctccctg aggccaaata tcattctgag gggccacagt	15180
aattacaaac ttactatccg ccatccata cattgggaca gacctagttc aatgaatctg	15240
aggaggctac tcagtagaca gtcccaccc cacacgattc tttaccttcc acttcatctt	15300
gcccttcatt attgcagccc tagcaacact ccacccctta ttcttgacacg aaacggatc	15360
aaacaacccc ctaggaatca cctcccatc cgataaaatc accttccacc cttactacac	15420
aatcaaagac gccctcggt tacttctctt ctttctctcc ttaatgacat taacactatt	15480
ctcaccagac ctcctaggcg acccagacaa ttatacccta gccaacccct taaacacccc	15540
tccccacatc aagccgaat gatatttcct attgcctac acaattctcc gatccgtccc	15600
taacaaacta ggaggcgtcc ttgcctatt actatccatc ctcattcttag caataatccc	15660
catcctccat atatccaaac aacaaagcat aatatttcgc ccactaagcc aatcacttta	15720
ttgactccta gccgcagacc tcctcattct aacctgaatc ggaggacaac cagtaagcta	15780

ES 2 546 743 B1

ccctttacc atcattggac aagtagcatc cgtactatac ttcacaacaa tcctaattcct	15840
aataccaact atctccctaa ttgaaaacaa aatactcaaa tgggcctgtc cttgttagtat	15900
aaactaatac accagtcttg taaaccggag atgaaaacct tttccaagg acaaattcaga	15960
gaaaaagtct ttaactccac cattagcacc caaagctaag attctaattt aaactattct	16020
ctgttcttgc atgggaagc agatttgggt accacccaag tattgactca cccatcaaca	16080
accgctatgt atttcgtaca ttactgccag ccaccatgaa tattgtacgg taccataat	16140
acttgaccac ctgttagtaca taaaaaccca atccacatca aaacccctc cccatgctta	16200
caagcaagta cagcaatcaa ccctcaacta tcacacatca actgcaactc caaagccacc	16260
cctcacccac taggatacca acaaacctac ccacccttaa cagtagatag tacataaago	16320
catttaccgt acatagcaca ttacagtcaa atcccttctc gtccccatgg atgacccccc	16380
tcagataggg gtcccttgac caccatcctc cgtgaaatca atatccgca caagagtgct	16440
actctcctcg ctccgggccc ataacacttg gggtagcta aagtgaactg tatccgacat	16500
ctggttccta cttcagggtc ataaagccta aatagcccac acgttccct 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 tttt 25

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

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

<400> 3
acaaacattc aattattattt attatatcct 30

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

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

<400> 4		
atggtaatt ttttattttt tattgtattt		30
<210> 5		
<211> 30		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Secuencia específica de molde para el amplicón ND1		
<400> 5		
taatttaaat ttaatactca ccctaataaa		30
<210> 6		
<211> 10		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Secuencia MID		
<400> 6		
acgagtgcggt		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	
agcactgttag	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	
cgtgtctctta	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	10
tcctctatgcg	
<210> 16 <211> 10 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> Secuencia MID	
<400> 16	10
tgataacgtct	
<210> 17 <211> 10 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> Secuencia MID	
<400> 17	10
tactgagcta	
<210> 18 <211> 10 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> Secuencia MID	
<400> 18	10
catatgtatgt	
<210> 19 <211> 10 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> Secuencia MID	
<400> 19	10
cgagagatac	

<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
tctacgttagc 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
cgttagactag 10

<210> 27
<211> 10
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Secuencia MID

<400> 27
tacgagttatg 10

<210> 28
<211> 10
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Secuencia MID

<400> 28
tactctcgtag 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 acctacccac ccttaacagt acatagtaca taaagccatt taccgtacat 60
agcacattac agtcaaatcc cttctcggtcc ccatggatga ccccccctcag ataggggtcc 120
cttgaccacc atcctccgtg aaatcaatat cccgcacaag agtgctactc tcctcgctcc 180
gggcccataa cacttgggg tagctaaagt gaactgtatc cgacatctgg ttctacttc 240
agggtcataa agcctaaata gcccacacgt tccccttaaa taagacatca cgatggatca 300
caggtctatc accctattaa ccactcacgg gagctctcca tgcatttggt atttcgtct 360
gggggtatg cacgcgatag cattgcgaga cgctggagcc ggagcacccct atgtcgca 420
atctgtctt gattcctgcc tcatcctatt atttatcgca cctacgttca atattacagg 480
cgaacatact tactaaagt tg 502

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

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

<400> 31
ataccaacaa acctacccac cc 22

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

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

<400> 32
ggcgaacata cttactaaag tgtg 24

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

<220>
<223> Cebador A

<400> 33
cgatatgcct ccctcgcc a 21

ES 2 546 743 B1

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

<220>
<223> Cebador B

<400> 34
ctatgcgcct 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 TECNICA

⑤1 Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥6	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
--	----------------------------------	---------------



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

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	⑥6 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 divultan diferentes marcadores genéticos y epigenéticos asociados con la enfermedad de Alzheimer.

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

En D06-D09 se describen marcadores en el ADN mitocondrial (ADNm) 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 ADNm 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 ADNm 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 ADNm 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 ADNm (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 ADNm 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.